



Efectes de la reperfusió després de la isquèmia cerebral: proteïnes d'estrès cel·lular, estrès oxidatiu i activació del complement

Xavier de la Rosa i Siles



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència **Reconeixement 3.0. Espanya de Creative Commons.**

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia **Reconocimiento 3.0. España de Creative Commons.**

This doctoral thesis is licensed under the **Creative Commons Attribution 3.0. Spain License.**

Universitat de Barcelona

Facultat de Medicina

**EFECTES DE LA REPERFUSIÓ DESPRÉS DE LA ISQUÈMIA
CEREBRAL: PROTEÏNES D'ESTRÈS CEL·LULAR, ESTRÈS
OXIDATIU I ACTIVACIÓ DEL COMPLEMENT**

Xavier de la Rosa i Siles

Universitat de Barcelona

Facultat de Medicina



EFFECTES DE LA REPERFUSIÓ DESPRÉS DE LA ISQUÈMIA CEREBRAL: PROTEÏNES D'ESTRÈS CEL·LULAR, ESTRÈS OXIDATIU I ACTIVACIÓ DEL COMPLEMENT

Memòria presentada per Xavier de la Rosa i Siles per optar al grau de Doctor de la
Universitat de Barcelona dins del programa de doctorat en Biomedicina

Aquesta tesi ha estat realitzada sota la direcció de la Dra. Anna M. Planas i Obradors i el
Dr. Àlvaro Cervera i Álvarez al Departament d'Isquèmia Cerebral i Neurodegeneració,
de l'Institut d'investigacions Biomèdiques de Barcelona.

Xavier de la Rosa i Siles Dra. Anna M. Planas i Obradors Dr. Àlvaro Cervera i Álvarez

Barcelona, octubre de 2013

A l'avi

*And... Always look on the bright side of life...
Always look on the light side of life...*

(Monty Python)

AGRAÏMENTS

Penso en aquests últims anys de tesi, i només tinc paraules d'agraïment.

En primer lloc voldria agrair als directors l'Àlvaro i l'Anna, per la seva direcció i recolzament durant aquests anys, en especial a l'Anna que gràcies a ella he tingut la oportunitat de fer la tesi al seu laboratori, i per tenir-la d'exemple de la seva incansable i tenaç forma de treballar. Per la seva confiança dipositada en la feina que feia i la llibertat en que he pogut desenvolupar el treball, llibertat de la bona, la que permet aprendre dels errors comesos.

A la institució IiBB, i els col·laboradors dels diversos treballs d'aquesta tesi, de l'institut de ciències fotòniques: Anna K, Claudia, Hari i Turgut. Del servei de microscòpia de la UB: Maria, Elisabet, Anna. I la universitat de Bordeaux Franck, Pierre-Yves.

També, a tota la gent del 610 que hi ha passat: Ester V., Roser, Anna S., Miriam, Elvira, Bea, Itxazo, Noa, Miguel B., Maria, Nacho, Glòria, Fer, Noe.

I a tots els que encara hi sou: Tomàs, Lluïsa, Núria, Valerie, Emili, Ester P., Leti, Raúl, Xavi i Pau.

Pels bons moments entre cafès, sopars, viatges i sortides, Carles, Lupe, Isabel.

I molts moments compartits entre cases rurals, excursions, calçotades, sopars, barbacoes, celebracions, festa i molt més... Ana G., Ester, Leo, Laura, Cedric, Armelle, Angèlica, Vanessa, Maura, Francesc, Paqui, Alba, Unai, Jesús i Berta.

També a tots els que hem viscut moments fora del laboratori, festivals de música, viatges, gresca i xerinola amb l'Ana, Ivan, Laia, Muna, Aloa, Jordi, Nadia, Doro, Eder, Miguel S., Jèssica i Santi. Als gironins Carles, Blanca, Germàn, Elsa i Pau. I als lloretencs, Marta, Edu, Tania, Pardo, Helen, Puertas, Robert, Alberto i Anna H.

En especial vull agrair a la meva família per l'amor i suport incondicional que sempre he rebut.

I per últim, i no per això menys important, a la Naiara que sense ella al costat jo seria molt diferent, i que és estant amb ella quan em sento millor persona i recolzat.

Per tot això, gràcies a tots!

ÍNDEX

ÍNDEX

ÍNDEX

ÍNDEX	5
ABREVIATURES	9
INTRODUCCIÓ	15
1. <i>L'ICTUS</i>	17
1.1. Factors de Risc	20
1.2. Isquèmia/reperfusió: la trombòlisi	21
1.3. Estudis experimentals	23
1.3.1. Models d'isquèmia en animals	23
1.3.2. Tècniques de neuroimatge	27
2. <i>Inflamació i immunitat en la isquèmia</i>	31
2.1. Unitat Neurovascular	31
2.1.1. Astròcits	32
2.1.2. Cèl·lules vasculars	33
2.1.3. La làmina basal	34
2.2. Cèl·lules implicades en la resposta immune	35
2.2.1. Micròglia	35
2.2.2. Leucòcits infiltrants	39
2.3. Resposta immune sistèmica	42
2.4. Activació del complement	44
2.4.1. La via clàssica	44
2.4.2. La via alternativa	45
2.4.3. La via de les lectines	45
2.4.4. Via independent de C3	47
3. <i>Respostes a la reperfusió</i>	48
3.1. Inducció de neuroprotecció endògena: proteïnes d'estrès	48
3.2. El dany per reperfusió	50
3.2.1. Estrès oxidatiu i antioxidants	51
3.2.2. Activació del complement	54
OBJECTIUS	55
ARTICLES	59
Article 1	61
Article 2	77
Article 3	95
DISCUSSIÓ	125
CONCLUSIONS	139
BIBLIOGRAFIA	143

ÍNDEX

ABREVIATURES

ABREVIATURES

ABREVIATURES

ACM	Artèria cerebral mitja
ACTH	Hormona adrenocorticotropina
ADC	Coefficient de difusió aparent
ADP	Adenosina difosfat
AGEs	Productes finals de glicosilació avançada
AIF	<i>L'apoptosis-inducing factor</i>
Apaf-1	<i>Apoptosi protease-activating factor-1</i>
APC	Cèl·lules presentadores d'antigen
AQP4	Aquaporina-4
ATP	Adenosina trifosfat
Bcl-2	B-cell lymphoma 2
BHE	Barrera hematoencefàlica
BM	Moll de l'os
CINC	<i>Cytokine-induced neutrophil chemoattractant-1</i>
COX-2	Ciclooxigenasa 2
CR-6	3,4-dihidro-6-hidroxy-7-methoxy-2,2-dimethyl-1(2H)benzopyran
CT	Tomografia computeritzada
CTE	Cadena de transport electrònic
DAMP	Patrons associats a molècules endògenes
DWI	Imatge de difusió
E	Epinefrina
ECM	Matriu extracel·lular
EPO	Eritropoietina
FDA	<i>Food & Drug Administration</i>
GCs	Glucocorticoids
HPA	Hipotalàmic pituïtària adrenal
Hsp-70	Proteïna per estrès de calor -70
HT	Hipotàlem
I/R	Isquèmia/Reperfusió

ABREVIATURES

iCAM-1	Molècula d'adhesió intercel·lular-1
Ig	Immunoglobulina
IL	Interleucina
INF-γ	Interferó- γ
iNOS	Nitrit òxid sintasa induïble
IκB	Inhibidor κ B
JaK	<i>Janus kinases</i>
LFA-1	<i>Lymphocyte Function-associated Antigen-1</i>
LPS	Lipo-polisacàrid
MAC-1	Antigen macròfag-1
MAC	<i>Membrane attack complex</i>
MASP	<i>MBL-associated protein</i>
MBL	Lectina d'unió a manosa
MCP-1	Proteïna quimioattractant de monòcits-1
MHC II	Complex major d'histocompatibilitat II
MMP	Metal·lo proteïnasa de matriu
MMP	Proteases de la matriu extracel·lular
MN	Metanefrina
NE	Norepinefrina
NFκ-B	L'inhibidor del factor nuclear κ -B
NINDS	<i>National Institute of Neurological Disorders and Stroke</i>
NK	Cèl·lules natural killer
NMDA	N-metil-D-aspartat
NMN	Normetanefrina
NO	Òxid nítric
NOX	NADPH oxidasa
NST	Nucli del tracta
OFR	Radicals lliures d'oxigen
P2X7	Receptor purinèrgic 7

ABREVIATURES

PAI	Inhibidor d'activador de plasminogen activador
PAMP	Patrons associats a molècules patògenes
PCD	Mort cel·lular programada
PVN	Nucli para ventricular
PWI	Imatge de perfusió
RM	Ressonància magnètica
ROS	Espècies d'oxigen reactives
rtPA	Activador del plasminogen tissular recombinant
SCID	<i>Severe Combined Immundeficiency</i>
SNC	Sistema nerviós central
SOD	Super òxid dismutases
STAT	Senyal transductor i activador de transcripció
TCR	Receptor limfòcit T
TGF- β	<i>Transforming growth factor -β</i>
TIMP	Inhibidor de metal·lo proteïnases de matriu tissular
TLR	Receptor toll-like
TNF-α	Factor de necrosi tumoral α
tPA	Activador de plasminogen tissular
Treg	Cèl·lules T reguladores
uPA	Activador de plasminogen urokinasa
vCAM-1	Molècula vascular d'adhesió cel·lular-1
VEGF	Factor de creixement endotelial vascular
Wnt	<i>Wingless-integration</i>
$\Delta\Psi_m$	Potencial de membrana mitocondrial

ABREVIATURES

INTRODUCCIÓ

INTRODUCCIÓ

1. L'ICTUS

L'ictus és la major causa d'invalidesa i la segona major causa de mort al món, amb 6,2 milions de morts per any segons l'Organització Mundial de la Salut (<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en/>). De fet, es preveu que la incidència de l'ictus augmenti en paral·lel a l'augment en l'esperança de vida mitja, amb aproximadament 14 milions de casos nous d'ictus als Estats Units en els següents 18 anys, suposant un cost sanitari pel 2030 d'uns 143 bilions de dòlars. Es creu que només a Alemanya, es donaran 3,5 milions de nous casos d'ictus en els propers 20 anys, amb un cost de 110 bilions d'euros. Aquestes importants xifres econòmiques contrasten amb el fet que només existeix un sol tractament per l'ictus isquèmic que és la trombòlisi, i que només és aplicable en les primeres fases de la trombosis (3-4,5h). Tot i la gran activitat investigadora, més de 286 assajos clínics d'isquèmia cerebral en humans han fracassat (<http://www.strokecenter.org/trials/>)

El cervell és un òrgan altament depenent del continu aport de glucosa i oxigen. La interrupció d'aquest aport, ja sigui per un vessament o obstrucció vascular, pot comportar la mort cel·lular i neuronal en pocs minuts (Hossmann, 2006). El cervell rep el subministrament del flux sanguini des de quatre grans artèries, les caròtides i les artèries vertebrals, que s'uneixen a la base de l'encèfal per formar el polígon de Willis (Mamatha et al., 2012). Les artèries naixents d'aquesta estructura voregen la superfície del cervell, donant lloc a les artèries pials (Iadecola and Nedergaard, 2007). Aquestes artèries es bifurquen en vasos més petits, que penetren al parènquima cerebral donant lloc a les arterioles i artèries penetrants (figura 1) que finalment ramifiquen en vasos més petits fins arribar als capil·lars que és on té lloc l'aport de nutrients a les cèl·lules neurals.

INTRODUCCIÓ

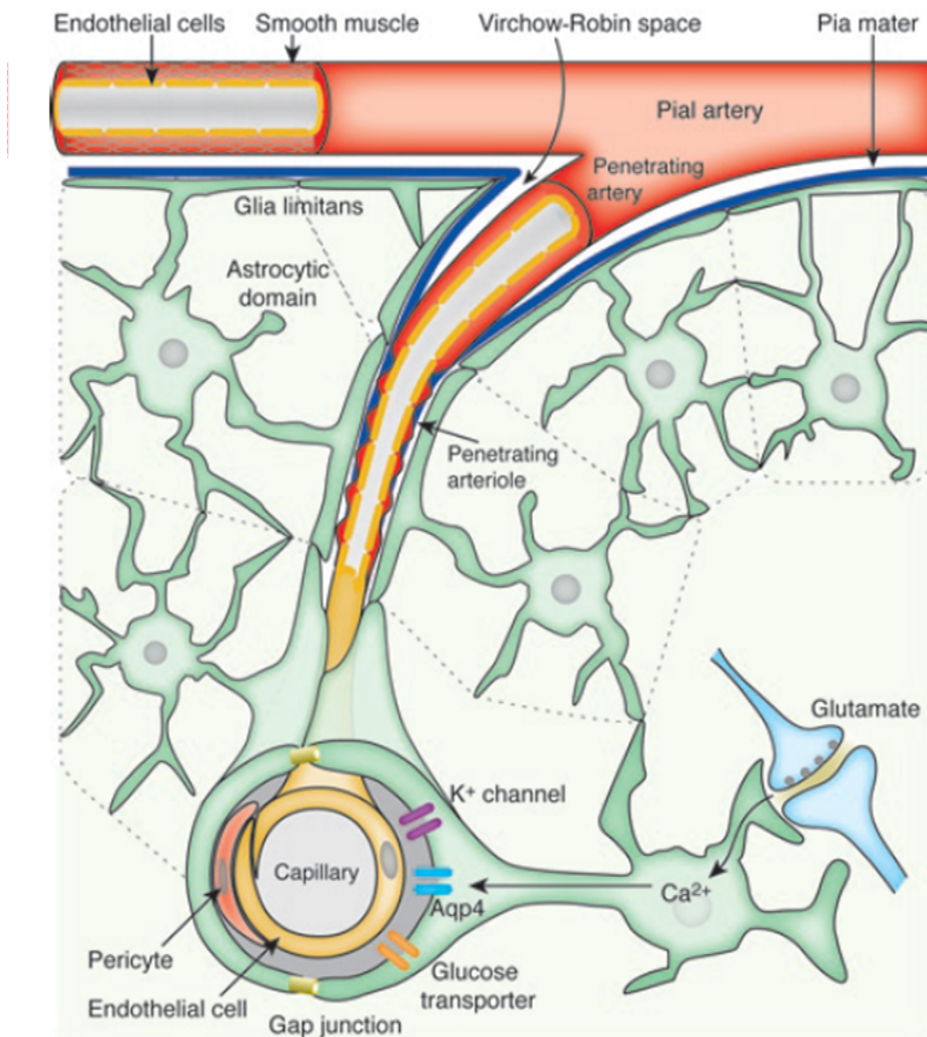


Figura 1. Estructura arterial. Els astròcits es troben a prop dels vasos cerebrals i les sinapsis nervioses. Les artèries pials descansen en les cèl·lules glia limitans, que envolten la superfície del cervell. Les arterioles penetrants estan envoltades pels peduncles dels astròcits que expressen proteïnes especialitzades que contribueixen a la homeòstasi cerebral (Extret de *Iadecola C & Nedergaard M, 2007*).

El metge del segle XVII Johan Jakob Wepfer va descriure per primer cop el fenomen de la isquèmia (*Historiae apoplectorum, 1658*). La isquèmia consisteix en la davallada sobtada del flux sanguini cerebral que si té una durada suficient comporta mort neuronal (Dirnagl et al., 1999). Les neurones són més vulnerables que la glia i les cèl·lules vasculars, i quan pateixen hipòxia-isquèmia esdevenen ràpidament disfuncionals i moren (Lipton, 1999).

INTRODUCCIÓ

Aproximadament el 80% dels ictus són isquèmics fruit d'una oclusió d'una artèria cerebral, mentre que el 20% restant són hemorràgics o vessaments (trencaments de vasos cerebrals)(Adibhatla and Hatcher, 2008). És freqüent la isquèmia produïda per l'obstrucció de l'artèria cerebral mitja (ACM). En la isquèmia focal, que afecta un territori arterial cerebral concret, el dany és més ràpid i intens en el centre del territori infartat, anomenat nucli isquèmic, on el flux és més baix i moren ràpidament les neurones majoritàriament per un procés de necrosi (Moskowitz et al., 2010). En funció del grau de disminució del flux sanguini en el nucli isquèmic, les neurones d'aquesta zona poden ser irrecuperables, i per tant no hi ha una finestra terapèutica que podem aplicar per salvar-les.

A la perifèria de la regió isquèmica, anomenada penombra, la mort neuronal s'esdevé més lentament perquè el flux sanguini provinent de la vasculatura adjacent (flux colateral) manté la perfusió cerebral per sobre del llindar de la mort cel·lular immediata. En aquest territori la mort cel·lular normalment va lligada a vies de senyalització pro-apoptòtiques. Clínicament, les neurones perifèriques al nucli isquèmic tenen la funcionalitat afectada però es mantenen viables durant un temps després de la reperfusió. El fet que la mort neuronal esdevingui de forma més tardana en la zona de penombra, dóna més marge d'acció per poder fer intervencions destinades a prevenir la pèrdua neuronal (Liebeskind and Sanossian, 2012).

Just després de l'oclusió arterial es produeixen mecanismes de excitotoxicitat que danyen les neurones i la glia. Posteriorment aquests fenòmens desencadenen tot un seguit de respostes, com respostes inflamatòries i immunitàries, i s'activen vies de senyalització de mort programada, que poden contribuir a la mort del teixit (Dirnagl et al., 1999). Per una altra banda, el teixit cerebral és capaç de respondre a la majoria d'aquestes senyals nocives induint mecanismes protectors com l'activació de mecanismes d'anti-excitotoxicitat, l'activació de vies anti-inflamatòries, anti-apoptòtiques, de reparació i finalment induint la regeneració. Però aquests mecanismes protectors no són suficients per contrarestar els senyals de mort (figura 2).

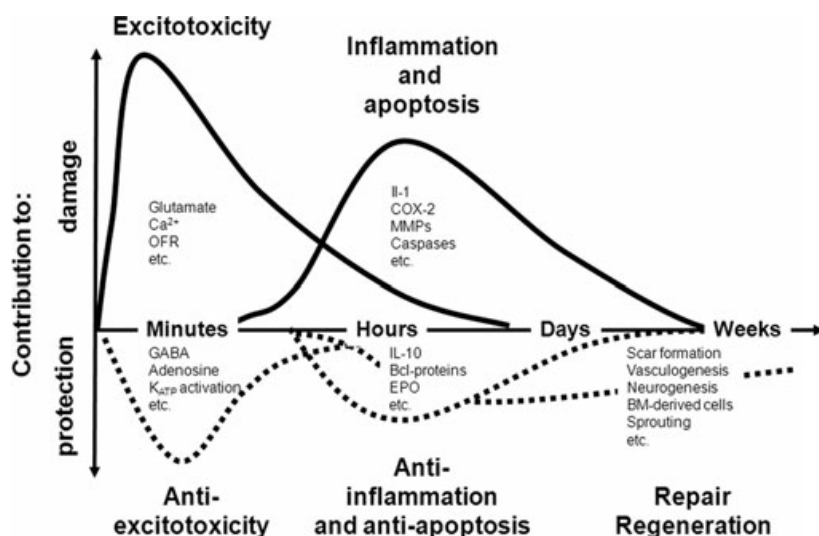


Figura 2: Contribucions perjudicials i beneficioses després d'un accident cerebrovascular en el temps. *BM*, moll de l'os; *COX-2*, ciclooxigenasa 2; *EPO*, eritropoietina; *IL-1*, interleucina-1; *MMP*, proteases de la matriu extracel·lular; *OFR*, radicals lliures d'oxigen (Extret de Dirnagl U, 2012).

1.1. Factors de Risc

L'ictus està associat a la presència de factors de risc. Un d'ells és l'edat, que correlaciona amb una major mortalitat i pitjor pronòstic (Fromm et al., 2011). Un altre dels riscos associats és el sexe, ja que els homes presenten una major incidència d'isquèmia comparat amb dones de la mateixa edat (Roger et al., 2012). Tot i així, en les dones que pateixen un ictus cerebral, aquest és més greu i presenten una pitjor recuperació i major grau d'invalidesa (Appelros et al., 2009; Niewada et al., 2005). Evidències experimentals en ratolins de la mateixa edat, posen de manifest que les femelles presenten una menor inflamació, fet que s'ha atribuït, al menys en part, a l'efecte beneficiós dels estrògens que desapareix amb la menopausa (Liu et al., 2009).

Altres factors de risc fortament associats a la isquèmia són la diabetis (Huxley et al., 2011; VanGilder et al., 2009), la hipertensió (Vasilevko et al., 2010) i l'obesitat (Stapleton et al., 2010).

1.2. Isquèmia/reperfusió: la trombòlisi

Si l'ictus isquèmic és diagnosticat ràpidament, es pot restablir el flux sanguini restituint la circulació de nutrients i oxigen (Sanderson et al., 2013). La recanalització dels vasos ocluíts es pot aconseguir amb l'administració d'agents trombolítics (l'activador del plasminogen tissular recombinant, rtPA), retirant la obstrucció arterial mecànicament, o bé per combinació de les dues (Amaro et al., 2013).

La reperfusió és la millor manera de protegir el cervell del dany isquèmic, i la trombòlisi amb rtPA és l'únic tractament aprovat a Europa i els Estats Units pel tractament de l'ictus isquèmic. En models experimentals també s'ha demostrat que l'oclusió transitòria de la ACM seguida de reperfusió causa menys dany que l'oclusió permanent en un model en rata (Memezawa et al., 1992; Rogers et al., 1997), indicant la importància de recanalitzar l'artèria a temps.

Tant l'administració dels agents trombolítics intra-arterials com la recanalització mecànica van demostrar millor pronòstic que l'administració intravenosa sola (Mazighi et al., 2009; Nogueira et al., 2012), però encara s'ha de fer més estudis que demostrin el benefici de la trombòlisi intra-arterial, que no està absenta de riscos.

Els primers assajos clínics pel tractament de la isquèmia cerebral aguda amb agents trombolítics van començar el 1987. L'estudi més fonamental per tal d'establir l'eficàcia del tractament amb l'activador del plasminogen tissular recombinant (rtPA), dut a terme al *National Institute of Neurological Disorders and Stroke* (NINDS), va ser completat i publicat el 1995 (Marler, 1995) amb l'aprovació com a tractament per la *Food & Drug Administration* (FDA) el 1996. Un gran nombre d'estudis van sorgir posteriorment establint l'eficàcia i la generalització d'aquest tractament.

Per tant a la dècada dels 90, la "*decade of the brain*", amb l'ajut de molts estudis arreu del món es va poder determinar una finestra de tractament trombolíctic per a la isquèmia que es limitava a les primeres 3 h després de l'inici dels símptomes i que posteriorment es va estendre a 4,5 h (Hacke et al., 2008).

INTRODUCCIÓ

La trombólisi fa referència a la transformació de plasminogen a plasmina i a una cascada subseqüent d'esdeveniments que comporta la degradació de coàguls de fibrina (Vassalli et al., 1991). El plasminogen és una glicoproteïna de cadena simple abundant al plasma sanguini humà i en fluids extracel·lulars.

Els activadors de plasminogen *tissue plasminogen activator* (tPA) o bé *urokinase plasminogen activator* (uPA) catalitzen la conversió proteolítica del zimogen plasminogen a la proteasa plasmina activa, que pot degradar fibrina i altres proteïnes de la matriu extracel·lular. L'activitat de uPA i tPA pot ser inhibida per dos inhibidors dels activadors del plasminogen, PAI-1 i PAI-2, i l'activitat de plasmina pot ser inhibida per la α -2-antiplasmina (Hovsepian and Karceski, 2013).

El plasminogen s'uneix a receptors cel·lulars específics. Aquesta unió a la cèl·lula té un nombre important de conseqüències. En primer lloc, es produeix la proteòlisi del plasminogen a plasmina activa. Aquesta plasmina activa romandrà unida a la cèl·lula, guiant una cascada proteolítica que remodelarà la matriu extracel·lular. En segon lloc, la unió de plasmina a la membrana cel·lular la fa inaccessible als inhibidors fisiològics que solen inactivar la plasmina soluble, com la α -2-antiplasmina o la α -2-macroglobulina. Finalment, el plasminogen s'uneix a receptors específics permetent que la cèl·lula reguli la proteòlisi. Alterant l'expressió i/o distribució de receptors específics pel plasminogen, la cèl·lula pot temporal i espaiament regular la potenciació de l'activitat de plasmina a la seva superfície.

El tPA i el sistema plasminogen/plasmina té funcions en situacions normals i fisiològiques i patològiques (Cesarman-Maus and Hajjar, 2005; Hacke et al., 2008; Sakharov et al., 1999; Samson and Medcalf, 2006; Strickland, 2001; Tsirka et al., 1995; Yepes and Lawrence, 2004). Així, s'expressa de manera elevada en hipocamp, hipotàlem, cerebel, i amígdala (Friedman and Seeds, 1994). A més, es coneix que el tPA modula la mort neuronal en models d'isquèmia, excitotoxicitat, i estrès oxidatiu (Yepes et al., 2009).

El tPA és l'únic tractament disponible per a la isquèmia cerebral. Degut a les seves propietats fibrinolítiques, però, el tPA té diversos efectes en cervell, a nivell tant de plasticitat sinàptica com de destí cel·lular (Minor et al., 2009). Per

tant, durant la isquèmia, el tPA promou la trombòlisi però hi ha evidències experimental que suggereixen que també pot incrementar la mort neuronal. El tPA pot interactuar sobre receptors de N-metil-D-aspartate (NMDA), promovent excitotoxicitat, mort neuronal i pot activar la micròglia (Gasche et al., 2006). Per una altra banda, també pot provocar trencament de barrera hematoencefàlica BHE, alterant les concentracions en plasma de metal·lo proteïnases de matriu (MMPs) i d'inhibidor de metal·lo proteïnases de matriu tissular, (TIMPs) fent que el tPA contribueixi al dany (Michalski et al., 2012).

Tenint en compte els possibles efectes adversos del tPA, s'han fet estudis moleculars per tal d'inhibir aquests efectes perjudicials. Recentment s'ha patentat una estratègia interessant on els autors han trobat que las proteïnes que consten d'un domini kringle o anticossos que s'uneixen específicament en el domini aminoterminal de la subunitat NR1 del receptor de NMDA (també anomenat com l'anticòs anti-ATD-NR1) són actius a dues dianes rellevants pel comportament del tPA : la BHE i el receptor de NMDA, presentant activitat vasoprotectora i neuroprotectora. Aquest anticòs i la proteïna que contenen dominis kringle, funciona com un inhibidor de tPA (Lopez-Atalaya et al., 2008; Petersen and Vivien, 2011; Spuch and Navarro, 2010).

1.3. Estudis experimentals

1.3.1. Models d'isquèmia en animals

Els models experimentals d'isquèmia es poden classificar segons una àmplia varietat de factors com poden ser l'espècie, els mecanismes d'oclusió, l'etiologia de l'ictus o òrgan infartat, presència o absència de reperfusió (isquèmia transitòria o permanent), regió infartada o territori vascular afectat i finalment, una combinació de tots ells (Braeuninger and Kleinschnitz, 2009).

Podem fer una sub-classificació atenent al fet que la isquèmia sigui global, focal o multifocal (figura 3). Dins aquesta classificació els podem dividir segons si

INTRODUCCIÓ

són intravasculars o extravasculars i a més també, si són transitoris o permanents (Braeuninger and Kleinschnitz, 2009).

Cerebral Ischemia	Etiology	Reperfusion (transient ischemia) or permanent ischemia	Examples
Global (complete or incomplete) = model of circulatory arrest or severe hypotension	Intravascular	Transient or permanent	Cardiac arrest with or without cardiopulmonary resuscitation
	Extravascular	Transient or permanent	Cervical compression by neck cuff; ligation of several brain-supplying arteries
Focal	Intravascular	Transient or permanent	Intraluminal thread middle cerebral artery occlusion model
	Extravascular	Transient or permanent	Surgical middle cerebral artery occlusion models using ligation, clipping, electrocauterization etc.; endothelin-1-induced middle cerebral artery occlusion
Multifocal	Intravascular	Transient (spontaneous lysis or thrombolytic therapy possible in blood clots) or permanent	Embolization models using blood clots, microspheres or other embolus material

Figura 3: Resum dels models experimentals d'isquèmia cerebral
(Extret de S Braeuninger et al., 2009).

S'han descrit molts models d'isquèmia en diferents espècies animals com en jerbus (Levine and Payan, 1966), cabra (Torregrosa et al., 1998), ovella (Terlecki et al., 1967), gat (Nakahara et al., 1991), gos (Fisk et al., 1969), primats (Hudgins and Garcia, 1970), conill (Zhang et al., 1995), rata (Brint et al., 1988) o ratolí (Connolly et al., 1996).

El model d'oclusió de l'artèria cerebral mitja s'utilitza des de l'any 1975 (Robinson et al., 1975). El nostre laboratori n'ha fet ús per tal d'estudiar la patologia a través dels models d'isquèmia intraluminal transitoris i permanents de rata i ratolí (Hossmann, 1998). En la rata el model inicialment més emprat va estat descrit per Tamura i col·laboradors l'any 1981 (Tamura et al., 1981). Aquest model requereix realitzar craniotomia i per tant és molt invasiu, per això es va modificar posteriorment per assolir l'oclusió de l'artèria cerebral mitja sense craniotomia a través d'un mètode d'oclusió intraluminal (Longa et al., 1989).

INTRODUCCIÓ

El model intraluminal transitori consisteix en introduir un filament de niló a través de l'artèria caròtida comuna fins a ocluir l'inici de la base de l'artèria cerebral mitja. Transcorreguts els minuts necessaris d'oclusió, es retira el filament i es re-canalitza el vas per tal de restablir el flux sanguini al cervell.

El desenvolupament de models d'isquèmia cerebral animal és imprescindible per a l'estudi de la patofisiologia i de l'eficàcia de diversos tractaments. Tot i així, aquests models presenten un cert nombre de limitacions. Principalment, els models reproduïxen només alguns aspectes de la patologia humana i normalment es porten a terme en animals joves i prèviament sans, mentre que l'ictus succeeix predominantment en persones d'edat avançada, i amb factors de risc com la hipertensió arterial, arteriosclerosi, diabetis, obesitat, tabaquisme, entre altres.

Una altra de les limitacions dels models animals és la diferència en les respostes immunes i moleculars entre rosegadors i humans. En humans predominen els neutròfils circulants (50-70%) mentre que en rosegadors predominen els limfòcits (75%-90%) (Mestas and Hughes, 2004). Per una altra banda, moltes de les molècules relacionades amb la resposta immune com nitrit òxid sintasa induïble (iNOS), receptor purinèrgic 7 (P2X7), receptor toll-like TLR2, proteïnes de presentació d'antigen, immunoglobulines o quimosines, són diferencialment expressades en ratolí i humà, o fins i tot, són presents en una espècie i no en l'altra (Mestas and Hughes, 2004). Conseqüentment, la resposta immunitària inicial pot diferir quantitativa i qualitativament entre humans i ratolins. L'impacte d'aquestes variacions s'ha de considerar a l'hora d'extrapolar en humans els resultats trobats en models animals.

Per tant, a l'hora de plantejar un assaig preclínic d'isquèmia, cal tenir en compte les consideracions següents (Braeuninger and Kleinschnitz, 2009).

1) A l'hora d'escollir l'espècie, els rosegadors, com ratolins i rates, presenten molts avantatges relacionats amb les consideracions ètiques, el seu baix cost comparatiu amb altres espècies, i la seva practicabilitat. L'obtenció de resultats prometedors en aquesta i altres espècies requerirà considerar la possibilitat de realitzar estudis

INTRODUCCIÓ

en primats. Aquests presenten l'avantatge principal de trobar-se molt propers evolutivament a l'humà, amb més similituds amb el cervell humà donat que tenen el gir encefàlic.

2) Dins d'una mateixa espècie animal, els resultats (tant positius com negatius) obtinguts en una soca haurien de confirmar-se en altres soques.

3) Els estudis es faran en primer lloc en animals mascles joves, que presenten avantatges com l'homogeneïtat i la reproductibilitat de resultats. A continuació, es repetiran en femelles i en animals més vells que presenten diferents comorbiditats, més propers a la situació real que s'observa en la clínica.

4) A l'hora d'escollir el model d'isquèmia, cal triar aquell més idoni per al tipus de fàrmac a testar. Així, és preferible triar un model tromboembòlic per a l'avaluació de fàrmacs trombolítics. També cal destacar que és preferible l'ús de models de reperfusió per davant de models isquèmics permanents, ja que el primer és el més comú en humans amb la implantació, cada vegada més estesa, del tractament trombolític en pacients. Tot i així, és convenient provar els tractaments en ambdós models.

5) En el cas del mètode anestèsic, l'anestèsia inhalatòria sol ser millor que la d'administració intravenosa o intraperitoneal, donat que sol ser més ràpida tant en la inducció com a l'hora de despertar l'animal. En general, és preferible evitar l'ús de barbitúrics, donat que poden interferir amb l'estudi.

6) Cal definir criteris d'inclusió-exclusió previs a l'estudi.

7) És important realitzar estudis farmacocinètics i establir corbes dosi-resposta. D'aquesta manera es pot determinar la millor dosi i finestra terapèutica.

8) Cal treballar amb emmascarament dels grups experimentals, tant pel que fa al tractament com als diferents animals transgènics. Aquest mètode implica no conèixer quin fàrmac s'administra, ni el genotip dels animals que s'estan utilitzant

INTRODUCCIÓ

fins al final de l'estudi, encara que en alguns casos les diferències fenotípiques aparents fan aquesta premissa impracticable.

9) Monitoritzar paràmetres fisiològics rellevants per tal de minimitzar la variabilitat pot ser important per l'estudi, ja que poden aportar informació extra i afavorir una millor interpretació dels resultats.

10) Cal considerar el volum d'infart, realitzar avaluacions neurològiques i de comportament, avaluacions histològiques, bioquímiques i moleculars.

11) Idealment es faran estudis a temps curts i a temps llargs. L'ús de la imatgeria per ressonància magnètica pot ser molt útil perquè no és nociva per l'animal, permet extreure'n moltes dades informatives i permet fer estudis longitudinals que donen informació d'un mateix individu al llarg del temps.

12) El protocol d'administració farmacològica ha de ser rellevant per la posterior aplicació en humans, afavorint la medicina translacional.

13) Considerar teràpies combinatòries com fàrmacs neuroprotectors i trombòlisi.

14) És necessari publicar els resultats, ja siguin positius o negatius.

15) Es requereix d'una confirmació dels resultats en altres laboratoris.

16) Finalment, cal coordinar la investigació clínica i els estudis preclínics.

1.3.2. Tècniques de neuroimatge

La finestra temporal tan reduïda del tPA fa necessari que el pacient sigui diagnosticat ràpidament per poder descartar els ictus hemorràgics per tal d'aplicar el tractament trombolític. Segons el moment en què ens trobem després de l'oclusió del vas i dels fenòmens cel·lulars que ocorren tant en la part infartada com en el

INTRODUCCIÓ

parènquima del voltant, podem realitzar estudis de ressonància magnètica amb diferents tècniques i seqüències d'escaneig.

Isquèmia aguda menys de 12 hores després del ictus

Avui en dia es pot diagnosticar ràpidament i els nous escàners d'alta resolució d'última generació augmenten la capacitat d'estudiar zones determinades (Marks and McNeil, 2009; Tomandl et al., 2003).

La tomografia computeritzada (CT) és una tècnica ràpida i àmpliament utilitzada en hospitals, que permet detectar la isquèmia aguda. Permet identificar les hemorràgies i per tant seleccionar als pacients que poden beneficiar-se d'una reperfusió primerenca (Ambrose et al., 2011).

La imatge de difusió (DWI) permet quantificar amb els mapes de coeficient de difusió aparent (ADC) el volum del nucli isquèmic (teixit afectat no rescatable), mentre que la combinació d'imatges de DWI i de perfusió (PWI) permet identificar la penombra o teixit potencialment candidat a ser salvat (Lev et al., 2001) que manifesta alteracions de PWI però no de DWI. S'estableix que una diferència entre DWI/PWI >5-6 segons és relativament predictiva del teixit afectat que esdevindrà infartat si aquest no és recanalitzat (Olivot et al., 2009).

Els primers símptomes d'isquèmia es manifesten amb un augment d'aigua en el teixit infartat que es tradueix en un enfosquiment de la imatge d'ADC comparat amb les estructures no afectades o teixit sa (Minematsu et al., 1992; Moseley et al., 1990). En els primers minuts, la isquèmia ja es detecta en els mapes ADC. Aquest paràmetre mesura el moviment brownià de l'aigua. La caiguda en els nivells d'ATP durant la isquèmia resulta en canvis en les bombes de sodi-potassi que provoca un increment d'aigua intracel·lular, causant finalment una contracció de l'espai extracel·lular. Aquests canvis originen una disminució en el moviment brownià que pot ser detectat (Gonzalez et al., 1999; Schaefer et al., 2000; Stejskal and Tanner, 1965).

L'augment d'aigua en el teixit resulta en un augment del temps de relaxació en imatges de tipus T1 i T2. El paràmetre T2 és més sensible a aquests canvis que T1,

INTRODUCCIÓ

donat que a 24h el 90% dels pacients mostren canvis en imatges T2 i només el 50% mostren canvis en imatges T1 (Marks and McNeil, 2009).

Fase subaguda (2 dies-2 setmanes):

Degut al trencament de la BHE i a la presència de cèl·lules necròtiques es produeix un augment de fluids extracel·lulars. Aquest fenomen té lloc durant les primeres 18-24h i esdevé màxim entre les 48-72h (Yang and Rosenberg, 2011).

En aquesta fase, les imatges mostren un major edema vasogènic i una possible cicatriu depenent de la localització i mida de l'infart. Per a les imatges T1, el seu màxim d'intensitat o moment òptim és a finals de la primera setmana, mentre que els valors d'ADC presenten una caiguda durant al voltant 3-5 dies. En els següents dies, aquest valor incrementarà i finalment es normalitzarà a les 2-4 setmanes (Sotak, 2002).

Fase crònica (2 setmanes-2 mesos):

En aquesta fase s'inicia la restauració de la BHE, es resol l'edema i es "neteja" el teixit de cèl·lules necròtiques. Patològicament, aquesta fase es caracteritza per una atrofia local del cervell, l'aparició de la cicatriu glial, la formació de cavitat o pèrdua de teixit, i l'expansió/dilatació del ventricle adjacent (Marks and McNeil, 2009; Tomandl et al., 2003).

L'anàlisi amb mapes T2* permet detectar la calcificació i deposició de productes de la sang. Amb histopatologia s'ha detectat l'aparició d'una banda cortical de necrosi amb neurones mortes, glia i degradació al voltant de vasos sanguinis (Kemper et al., 2010). La imatgeria de ressonància magnètica T1 i seqüències FLAIR mostren una hiperintensitat en el còrtex que es fa evident a partir de les 2 setmanes després de la isquèmia i que és més notòria al cap de 1-3 mesos (Sitburana and Koroshetz, 2005).

Per tant, quan un pacient arriba a l'hospital, immediatament se li practica una CT o una ressonància magnètica (RM) per determinar si l'ictus és isquèmic o hemorràgic i avaluar l'extensió de la lesió. L'angiografia mostra l'anatomia vascular

INTRODUCCIÓ

mentre que la CT i la RM aporten paràmetres com processos fisiològics, el volum de lesió i fins hi tot el flux sanguini cerebral. La informació obtinguda amb la CT o RM permet decidir si s'aplica o no la recanalització i si cal donar el tractament de tPA per tal de recanalitzar el vas (Lev et al., 2001).

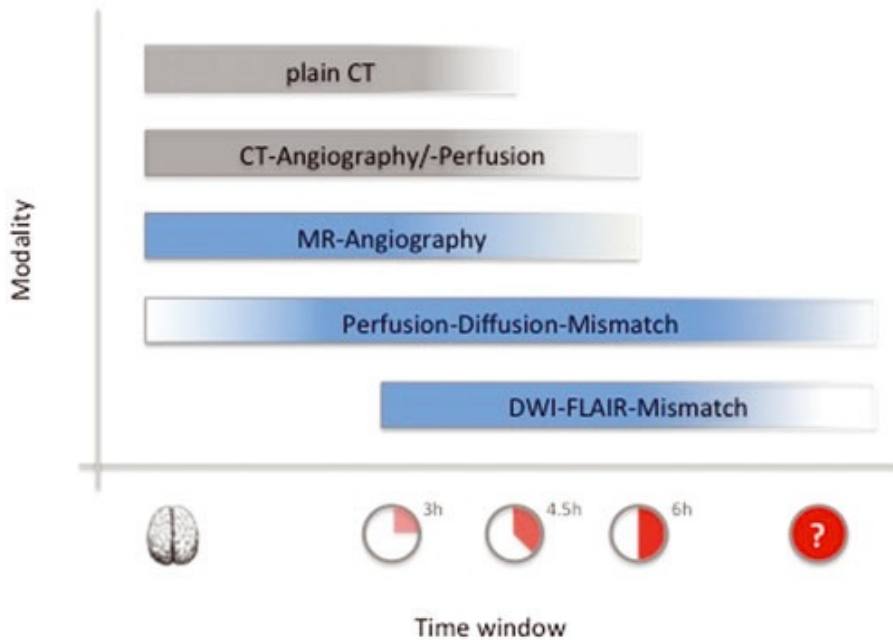


Figura 4: Selecció de la modalitat d'escaneig segons el temps d'oclusió (*Extret de Hametner C, 2012*).

2. Inflamació i immunitat en la isquèmia

2.1. Unitat Neurovascular

El fracàs en molts dels assajos clínics en malalts d'ictus s'ha atribuït en part al fet que molts d'ells s'han adreçat a la millora de la unitat fonamental del cervell que és la neurona. La tendència actual consisteix en l'anàlisi des d'una perspectiva global del cervell i sistèmica de l'individu. D'aquesta manera neix, doncs, el concepte d'unitat neurovascular (figura 5), que posa èmfasi al fet que les neurones, astròcits, cèl·lules musculars de la vasculatura, cèl·lules endotelials, perícits, làmina basal i matriu extracel·lular interactuen de manera dinàmica en la patologia de la isquèmia (del Zoppo, 2009). Però per poder identificar el paper que juga cadascun d'aquests elements en la malaltia, cal un anàlisi detallat de la patologia i funcions de cada tipus cel·lular.

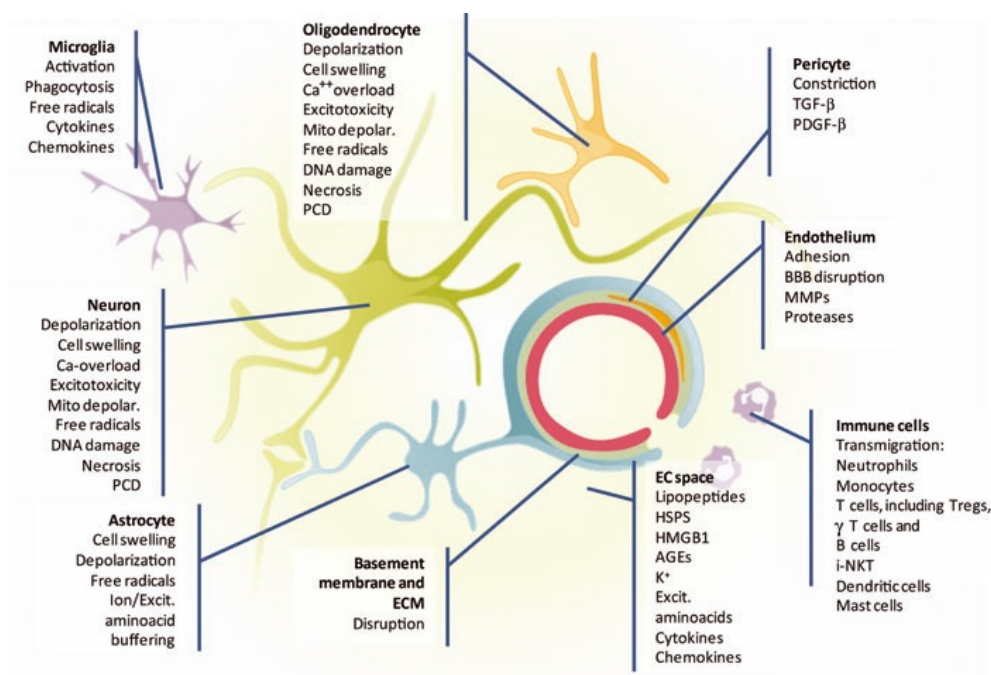


Figura 5: La unitat neurovascular. El complex patobiològic de la lesió i protecció després de l'accident cerebrovascular. *AGEs*, productes finals de glicosilació avançada; *BBB*, barrera hematoencefàlica; *ECM*, matriu extracel·lular; *HSPs*, proteïnes d'estrès de calor; *MMPs*, metal·lo proteïnases de matriu; *PCD*, mort cel·lular programada (Extret de Dirnagl U, 2012).

2.1.1. Astròcits

Els astròcits són les cèl·lules més abundants del Sistema Nerviós Central (SNC) i desenvolupen diverses funcions imprescindibles pel correcte funcionament del cervell (Molofsky et al., 2012). Participen en la transmissió sinàptica mantenint l'homeòstasi extracel·lular (Parpura and Haydon, 2009), promouen la supervivència neuronal en el context de la neuroinflamació (Saijo et al., 2009) i la hipòxia (Vangeison and Rempe, 2009) i participen en la regulació metabòlica (Barreto et al., 2011).

A més, els astròcits tenen un paper estructural i funcional junt amb els perícits i les cèl·lules endotelials, ja que els seus peduncles són un component crucial de la BHE (Ballabh et al., 2004). Aquesta estructura, que comprèn la vasculatura cerebral, les cèl·lules d'astroglia i perícits que l'envolten així com la matriu extracel·lular que forma la làmina basal, constitueix una barrera pel pas lliure de molècules, ions i cèl·lules del torrent sanguini cap al parènquima cerebral i viceversa (Molofsky et al., 2012).

Els astròcits tenen unions intercel·lulars de tipus gap i adherents que suposen un mode de comunicació entre ells, (formant una xarxa de comunicació intercel·lular) amb l'endoteli i amb les cèl·lules circumdants. En aquest sentit, els astròcits juguen un paper important en la regulació del flux sanguini cerebral i la permeabilitat de la BHE (Attwell et al., 2010; Takano et al., 2006). Així, el mal funcionament dels astròcits pot alterar la integritat de la BHE mitjançant factors secretats i modificant el volum d'aigua a través dels canals d'aquaporina que expressen en la membrana (Gundersen et al., 2013). La importància d'aquest tipus de canals s'ha descrit sobre tot pel que fa a l'aquaporina-4 (AQP4), a la que s'atribueix un paper fonamental en la formació de l'edema cerebral que s'observa després d'un episodi isquèmic en animals d'experimentació (Nicchia et al., 2003).

Altres respostes específiques dels astròcits a la isquèmia inclouen la sobre expressió de factors glicolítics i angiogènics (Ohab et al., 2006). Per tant, els astròcits són candidats potencials per intervenció en la isquèmia i s'estan convertint en dianes prometedores per una teràpia eficaç en la isquèmia cerebral.

2.1.2. Cèl·lules vasculars

Els vasos cerebrals reaccionen a la isquèmia amb respostes inflamatòries. En estadis inicials es produeixen citocines, com factor de necrosi tumoral α (TNF- α) o Interleucina 1 β (IL-1 β), en cèl·lules vasculars i perivasculars. Posteriorment, s'indueix l'expressió de molècules d'adhesió com molècula d'adhesió intercel·lular-1 (iCAM-1) i E-selectina (Zhang et al., 2009; Zhang et al., 1997). Aquestes integrines promouen el *rolling* leucocitari i en faciliten l'adhesió (Zhang et al., 1998).

Per altra banda, en les cèl·lules endotelials, l'estrès oxidatiu redueix la disponibilitat d'òxid nítric (NO), un potent vasodilatador i un inhibidor de l'agregació plaquetària i l'adhesió leucocitària. La pèrdua de les propietats beneficioses del NO fa que el dany per isquèmia s'exacerbi degut a la reducció de flux sanguini en el territori isquèmic (Atochin et al., 2007). En condicions d'estrès oxidatiu, el NO pot donar lloc a peroxi nitrats que poden nitrar proteïnes modificant-les irreversiblement (Tajes et al., 2013).

Les cèl·lules endotelials dels capil·lars sanguinis estan envoltades per cèl·lules perivasculars anomenades perícits. Aquests són essencials pel funcionament de la unitat neurovascular, per l'estabilització i maduració dels capil·lars, així com també per la formació de la BHE (Dore-Duffy et al., 2006; Kamouchi et al., 2011). Alguns estudis revelen que aquestes cèl·lules presenten activitat pluripotencial (Brachvogel et al., 2005) suggerint que podrien tenir un paper regenerador (Kamouchi et al., 2012).

Després d'un accident vascular cerebral s'ha descrit que els perícits migren a la zona peri-infartada, rodejant el teixit necròtic (Renner et al., 2003) i col·laborant en la reparació del cervell danyat (Kamouchi et al., 2011; Kokovay et al., 2006; Lamagna and Bergers, 2006). La majoria de perícits són reclutats del moll de l'os a través de la sang perifèrica o de l'ambient local (Kokovay et al., 2006).

Després de la isquèmia, es produeix una sobre-expressió de gens relacionats amb la angiogènesis i de factors angiogènics, com el factor de creixement endotelial vascular (VEGF) en el cervell (Hayashi et al., 2004; Zhang and Chopp, 2002). Per tant, és probable que els perícits contribueixin a reparar el teixit

danyat i controlin l'angiogènesi, neurogènesi i el correcte funcionament de la BHE.

2.1.3. La làmina basal

La matriu extracel·lular que envolta la part ab-luminal dels vasos és un component important de la unitat neurovascular. La làmina basal es pot degradar per proteïnes activades després de l'ictus com són les metal·lo proteïnases de matriu MMPs. La expressió de MMPs és complexa i és un procés molt ben regulat (Gasche et al., 2006). Aquestes proteases poden degradar proteïnes extracel·lulars com el col·lagen, i estan involucrades en la remodelació de la matriu extracel·lular (Dejonckheere et al., 2011). Les MMPs contenen un domini N-terminal que presenta una cisteïna conservada quelada amb un àtom de Zn^{2+} . En el estadi de proforma, la metal·lo proteasa es manté inactiva, majoritàriament en el citosol (Jacob-Ferreira et al., 2013). Les proformes de les MMPs poden ser processades per proteases com plasmina i altres MMPs i passar a l'estat actiu en el que s'ha descrit que poden danyar l'estructura i funció de la BHE (Rosenberg, 2002).

Al cervell un dels majors productors de MMPs després de la isquèmia, especialment de MMP-3 i MMP-9, és la micròglia (del Zoppo et al., 2007). Durant la isquèmia es diferencien dues fases d'alteració de la BHE una primera fase que té lloc en les hores que segueixen a l'ictus i una fase més tardana en el dia 2. El trencament de la BHE pot anar seguit de posterior hemorràgia i edema. Estudis experimentals indiquen que el trencament de BHE i l'hemorràgia són el resultat de l'expressió i activació de MMPs (del Zoppo, 2006; Lo et al., 2004; Lo et al., 2003). En concret, la MMP-9 té efectes citotòxics i pot desestructurar la BHE (Candelario-Jalil et al., 2009). No obstant, la font més important de MMPs després de la isquèmia són els neutròfils infiltrants (Justicia et al., 2003)

El paper de les MMPs en isquèmia encara és quelcom complex i calen més estudis per esbrinar-lo. S'ha descrit que la inhibició de MMP-9 24h després d'oclusió de l'arteria cerebral mitja seguida de reperfusió, en rates, provoca una reducció del volum d'infart. Aquest benefici es perd quan el tractament s'inicia a dia 3, i el volum d'infart augmenta encara més quan es tracta a dia 7 (Zhao et al., 2006; Zlokovic, 2006). Aquests estudis suggereixen que la inhibició de MMPs pot

ser una diana terapèutica viable, en la fase aguda però pot inhibir processos de neuroregeneració en fases més tardanes.

2.2. Cèl·lules implicades en la resposta immune

2.2.1. Micròglia

Les cèl·lules de micròglia deriven del sistema hematopoietic i constitueixen les cèl·lules d'immunitat innata residents del SNC (Ginhoux et al., 2010; Lassmann et al., 1993), que contribueix a la resposta inflamatòria (Suzumura, 2013). La micròglia s'encarrega del continu monitoratge de l'espai extracel·lular i adjacent a la superfície cel·lular, per tal de detectar pertorbacions o canvis en la homeòstasi cerebral (Colton, 2013).

L'activació de la micròglia es pot detectar visualment com un canvi morfològic des d'una forma extremadament ramificada a una altra de més ameboide (figura 6). Anàlisis d'expressió gènica demostren que la via *Wingless-integration* o Wnt (Halleskog et al., 2011) així com l'equilibri entre el lligand CD200 i el seu receptor (Matsumoto et al., 2007), podrien intervenir en aquest canvi estructural. L'activació de la micròglia correlaciona amb la inducció de la senyalització pro-inflamatòria (Vexler and Yenari, 2009).

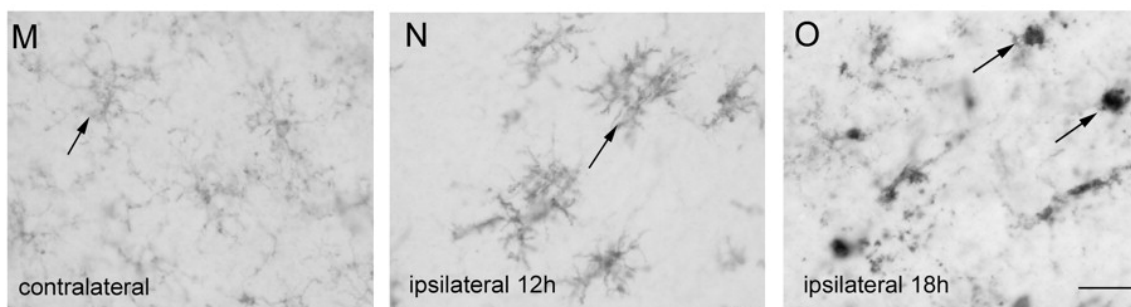


Figura 6: Micròglia activada en rata, després d'isquèmia transitòria (1h) i reperfusió 12h (n) i 18h (o), control (m). Tinció de CD11b (OX-42) (Extret de Rojas S et al 2006).

INTRODUCCIÓ

Després d'isquèmia la micròglia produeix superòxid que és generat per la NADPH oxidasa (NOX). Estudis *in vitro* del laboratori de Giffard RG et al., mostren com la micròglia pot potenciar el dany a les cèl·lules constituents de la BHE a través de NOX en models d'isquèmia cerebral (Yenari et al., 2006). Per tant, les espècies reactives d'oxigen derivades de la micròglia podrien sumar-se a les generades per altres cèl·lules i agreujar el dany ocasionat per la isquèmia.

Una altre de les vies implicades en la resposta inflamatòria és la via JaK/STAT. Les proteïnes *Janus kinases* (JaK) i els transductors de senyals i activadors de transcripció (STAT) estan de forma inactiva lligades al domini intracel·lular de molts receptors de citosines de membrana. JaK/STAT s'expressen normalment en el cervell (Justicia et al., 2000; Planas et al., 1997) i els seus nivells augmenten després d'isquèmia focal en rata, particularment en astròcits i micròglia, indicant que JaK/STAT té un paper important com a mediador de la inflamació després d'isquèmia. En micròglia reactiva es produeix una forta expressió de STAT3 i STAT1 des de les poques hores d'isquèmia (Stephanou, 2004) i apareix un pic de màxima expressió als 4 dies, que coincideix amb la màxima resposta immunitària. Estudis previs del grup han demostrat que en condicions d'isquèmia, la citosina antiinflamatòria IL-10 indueix l'activació de STAT3, però no de STAT1, mentre que senyals pro-inflamatòries com interferó- γ (INF- γ) indueixen l'activació de STAT1 però no de STAT3. Per una altra banda, ambdues STAT3 i STAT1 s'activen amb la interleucina IL-6 (Gorina et al., 2005).

Així doncs, la micròglia pot modular el dany isquèmic mitjançant la bateria de molècules ROS generades, el trencament de la BHE, l'activació de les vies JaK/STAT, i d'altres relacionades amb inflamació. La seva funció per excel·lència és la que realitza en la resposta d'immunitat innata, alertant al seu entorn mitjançant la resposta inflamatòria.

La resposta microglial inflamatòria pot ser explicada en tres passos (figura 7). En primer lloc, es dona la detecció de senyals extracel·lulars a través d'una àmplia varietat de receptors extracel·lulars i intracel·lulars. En segon lloc, es produeix la transducció d'aquesta senyal, que depèn directament de la duració, intensitat i tipus de senyals detectats, i finalment, es produeix l'activació de diverses respostes inflamatòries (Yenari et al., 2010).

INTRODUCCIÓ

La micròglia inicia la resposta immune innata i alhora la resposta immune secundària (Abbas and Lichtman, 2010) a través de diversos receptors. Els patrons associats a molècules patògenes (PAMP) són molècules exògenes provinents de patògens mentre que, els patrons moleculars associats a senyals de perill endògens (DAMP) són receptors de dany tissular o de patrons interns (Boche et al., 2013). Tots ells activen els mateixos receptors de membrana que estan presents en cèl·lules de micròglia.

S'hipotetitza que la mort necròtica provocada per la isquèmia, pot alliberar molècules internes al parènquima extracel·lular. Aquestes poden ser reconegudes pels receptors de membrana de les cèl·lules gials que reconeixen els DAMPs. Posteriorment al reconeixement, s'iniciarà la resposta immunitària (Song and Lee, 2012).

La subfamília dels receptors de DAMP, receptors *Toll-like* (TLR) són proteïnes transmembranes de reconeixement d'epítops pro-inflamatoris. Els TLRs s'activen en la isquèmia a través d'un mecanisme no del tot conegut (Tang et al., 2007), tot i que s'ha observat la producció de lligands endògens de TLRs que activen la resposta inflamatòria durant la isquèmia, com l'àcid hialurònic, la fibronectina, proteïnes d'estrès (HSPs) o sulfat d'heparina (Dirnagl et al., 1999). En concret, TLR4 s'ha vist implicat en la resposta inflamatòria de ratolins nounats després d'hipòxia/isquèmia (Lehnardt et al., 2003) i se sap que contribueix al dany cerebral posterior al dany isquèmic focal (Caso et al., 2007).

L'activació d'aquests receptors desencadena una resposta intracel·lular que té com a conseqüència la producció de citocines i molècules pro-inflamatòries (Yenari et al., 2010). Les citocines són molècules solubles de baix pes molecular que actuen com a senyals extracel·lulars i reguladors humorals (Lambertsen et al., 2012). Originàriament, es van descriure com a mediadors en la regulació del sistema de la immunitat innata i adaptativa. Les citocines són missatgers químics i inclouen molècules com el TNF- α , interleucines (IL), quimosines, i factors de creixement (Lambertsen et al., 2012).

INTRODUCCIÓ

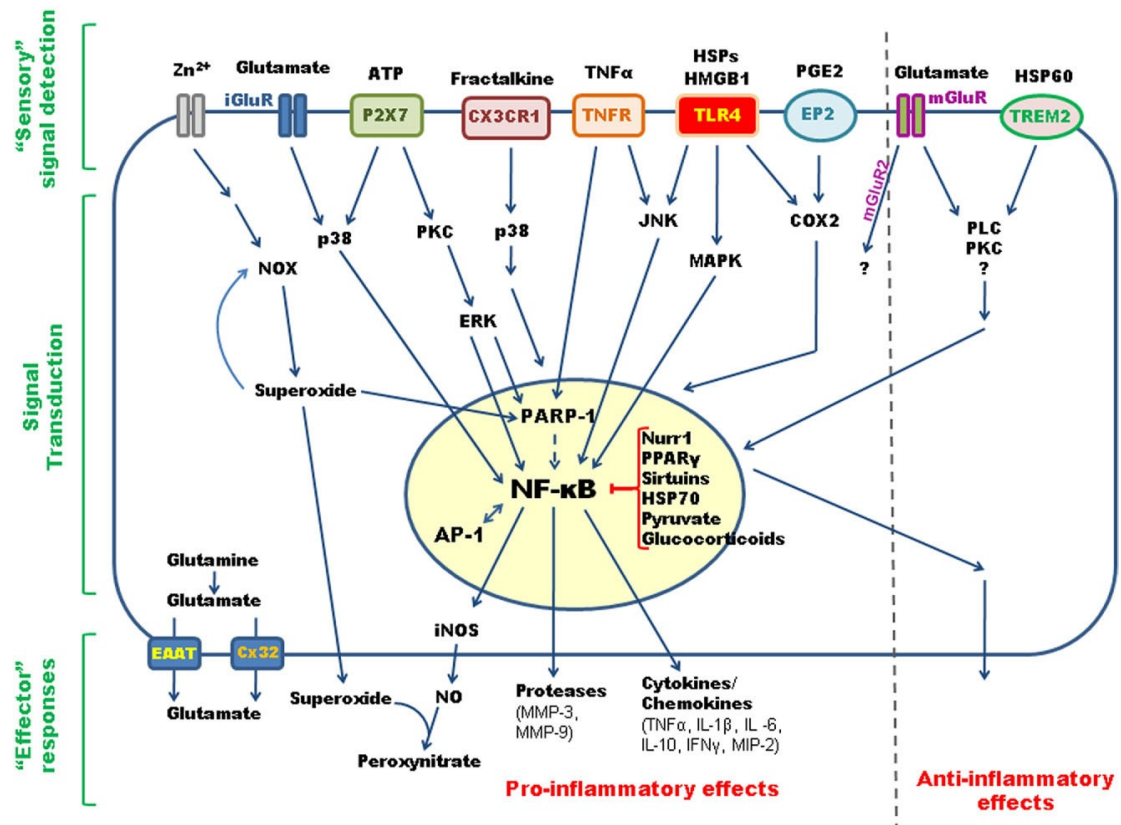


Figura 7: La resposta microglial en la isquèmia cerebral. Aquesta resposta pot ser conceptualitzada en tres components: un component sensorial, un component de transducció de senyal i un component efector. *COX2* cicloxigenasa-2; *HSP* proteïna d'estrès de calor; *IFN- γ* interferó- γ ; *IL* interleucina; *iNOS* nitrit òxid sintasa induïble; *MMP* metal·lo proteïnasa de matriu; *NF- κ B* factor nuclear - κ B; *NO* òxid nítric; *TLR4* receptor toll-like 4; *TNF- α* factor de necrosi tumoral- α (Extret de Yenari MA et al 2010).

La biologia de les citocines és particularment complexa. Algunes citocines actuen en un nombre diferent de cèl·lules i receptors (pleiotròpiques); algunes poden desencadenar diferents funcions (multifuncionals), mentre que diferents citocines poden desencadenar la mateixa funció (redundants). La redundància és deguda, en part, al paper de les citocines com a molècules activadores de vies de senyalització compartides intracel·lularment (Esmaili et al., 2012).

2.2.2. *Leucòcits infiltrants*

La lesió isquèmica provoca l'alliberació de senyals de perill, en primer lloc per part de les cèl·lules sota condicions d'estrès i a continuació, per part de les cèl·lules necròtiques. Aquestes senyals activen receptors purinèrgics i receptors DAMP que indueixen una resposta inflamatòria en les cèl·lules residents del cervell i leucòcits infiltrants.

Les cèl·lules presentadores d'antigen (APC) disminueixen en la perifèria i es concentren en la zona isquèmica, tant en models de ratolí (Felger et al., 2010; Gelderblom et al., 2009) com en humana (Yilmaz et al., 2010). Aquestes cèl·lules APC proteolitzen antigens estranys per les cèl·lules i els presenten en la superfície formant un complex amb la proteïna complex major d'histocompatibilitat II (MHC II) (Abbas and Lichtman, 2010). El complex MHC II-antigen serà reconegut pel receptor dels limfòcits T (TCR) i posteriorment donarà lloc a l'activació de les cèl·lules T CD4+. Tot seguit, aquestes inicien l'expansió clonal en els òrgans limfoides, un procés promogut per IL-2 (Abbas and Lichtman, 2010).

Les cèl·lules CD4+ esdevenen T *helpers* perquè no presenten funcions citotòxiques, però coordinen i modulen la resposta immune. Depenent de les senyals moleculars del microentorn, es poden desenvolupar diferents subpoblacions efectores, que es caracteritzaran per una secreció concreta de citocines (Huang et al., 2013).

Així, el subtipus Th tipus 1 (Th1) secreten principalment IFN- γ i TNF- α . El seu desenvolupament és promogut per la IL-12 i tenen una funció de caire pro-inflamatori. Th tipus 2 (Th2) secreten IL-4, IL-5, IL-9, IL-10 i IL-13, que són molècules amb un rol anti-inflamatori (Wan, 2010).

Les cèl·lules T reguladores (Treg o cèl·lules T supressores) estan presents constitutivament, o bé poden desenvolupar-se a partir de cèl·lules Th quan es troben en presència de (*transforming growth factor- β*) TGF- β . Les cèl·lules Treg indueixen immunosupressió a través de la producció de IL-10 i de TGF- β (Wan, 2010). Les Treg són crítiques pel manteniment de la homeòstasi del sistema immune ja que poden equilibrar l'efecte destructiu de la inflamació excessiva, i podrien oferir un rol protector en el dany per isquèmia (Li et al., 2012).

INTRODUCCIÓ

La presència de cèl·lules T s'ha identificat per immunohistoquímica en cervells isquèmics 24h després de reperfusió, concretament als vasos sanguinis perifèrics de la zona afectada (Jander et al., 1995; Schroeter et al., 1994). El tractament amb un anticòs selectiu d'integrina 4, que inhibeix la infiltració limfocitària, provoca una protecció contra la patologia (Wagner et al., 1997). No obstant, la importància dels limfòcits T i el rol que poden jugar en la isquèmia està lluny de ser resolt.

Encara es coneix menys sobre el paper dels limfòcits B en el procés inflamatori. S'ignora si presenten antígens als limfòcits T o bé produeixen anticossos en la zona de penombra. D'acord amb aquesta hipòtesi, animals SCID (*Severe Combined Immundeficiency*) que no presenten limfòcits T ni B, presenten protecció en front de la isquèmia/reperfusió (Yilmaz et al., 2006). Per una altra banda, s'ha observat en animals una reducció en els volum d'òrgans del sistema immunitari com la melsa i el timus (Offner et al., 2009).

En conclusió, l'aparició de necrosi tissular alerta al sistema inflamatori innat del cervell (figura 8). Això provoca l'expressió de molècules d'adhesió que afavoriran fenòmens de rodament (*rolling*) dels leucòcits circulants. Aquests seran activats i a través de la secreció de quimosines o citocines, alertaran el sistema immunitari provocant la infiltració de leucòcits circulants a la zona afectada començant per la penombra (Offner et al., 2009).

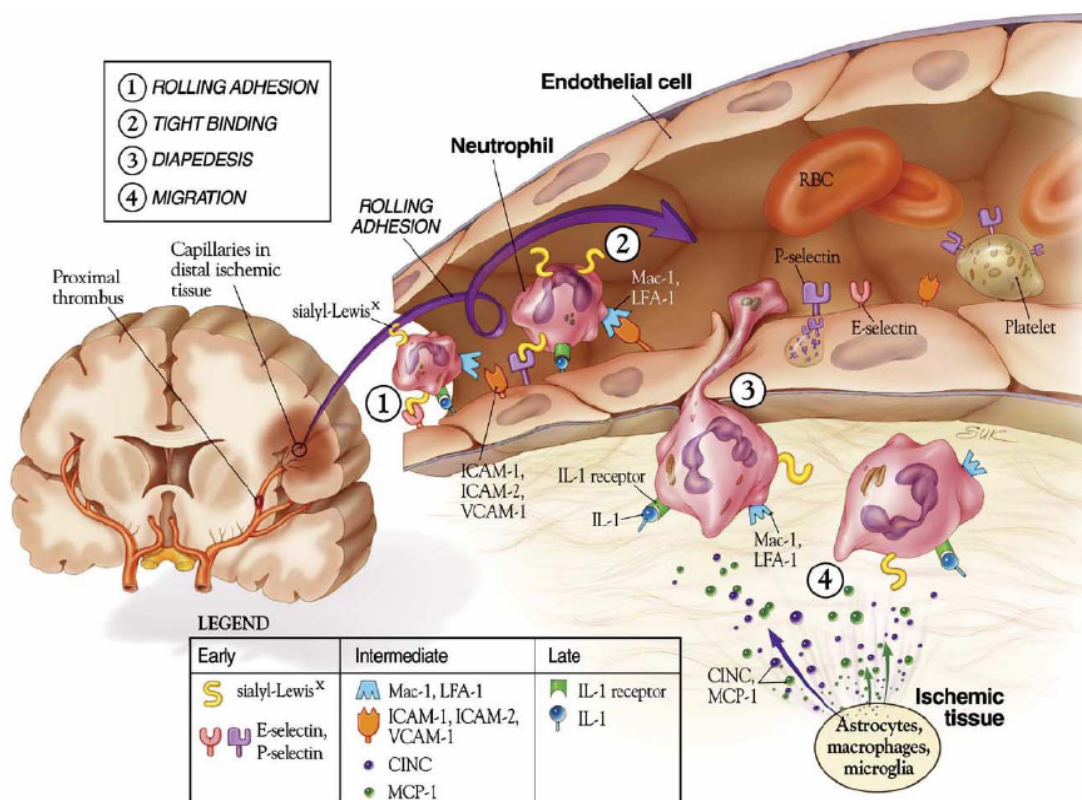


Figura 8. Resposta inflammatòria després d'isquèmia/reperfusió. (1) L'oclusió per un coàgul proximal esdevé en una cascada inflammatòria del teixit isquèmic als capil·lars distals. La P-selectina pre-formada és alliberada dels llocs d'emmagatzematge i, juntament amb E-selectina, s'uneix a sialyl-Lewis X per promoure l'adhesió de neutròfils. (2) La isquèmia induïx l'expressió de IL-1 en les cèl·lules infiltrants que a continuació induïxen l'expressió de ICAM-1 a la superfície de les cèl·lules endotelials. Les integrines macròfag antígen-1 MAC-1 i LFA-1 (*Lymphocyte Function-associated Antigen-1*) dels leucòcits s'uneixen a ICAM-1, ICAM-2 i VCAM-1 provocant una forta unió. (3 i 4) Els astròcits, els macròfags i la micròglia del teixit cerebral isquèmic alliberen *cytokine-induced neutrophil chemoattractant-1* (CINC) i proteïna quimioattractant de monòcits-1 (MCP-1) en resposta a les citocines induïdes per la isquèmia. Aquestes quimosines provoquen la migració en el parènquima, liderant la destrucció del teixit. (Extret de Huang J et al 2006).

2.3. Resposta immune sistèmica

La inflamació post-isquèmia es caracteritza per una seqüència d'events ordenats que involucren el cervell, els vasos, la sang circulant i els òrgans limfoides (figura 9) (Chamorro et al., 2007). L'ictus provoca hipòxia tissular, canvis en l'estrès cel·lular (Eltzschig and Carmeliet, 2011), i producció d'espècies reactives d'oxigen i nitrogen que desencadenen l'activació del complement de plaquetes i de cèl·lules endotelials (Hayon et al., 2012) i activen la coagulació (Peerschke et al., 2010). Els efectes pro-coagulants provoquen l'acumulació de fibrina intravascular, que atrapa plaquetes i leucòcits induint oclusions en la microvasculatura. (del Zoppo and Mabuchi, 2003) Minuts després de la isquèmia, la molècula d'adhesió P-selectina transloca a la superfície de les plaquetes i les cèl·lules endotelials, mitjançant l'adhesió de leucòcits circulants a les parets vasculares (Yilmaz and Granger, 2010).

A l'espai perivascular, la isquèmia/reperfusió (I/R) activa els macròfags perivasculars i mastòcits (Lindsberg et al., 2010). Els mastòcits alliberen mediadors vasoactius (histamina), proteases, i TNF- α , mentre que els macròfags alliberen sobre tot citocines pro inflamatòries (Strbian et al., 2006). Aquests mediadors pro inflamatoris contribueixen a l'expressió de molècules d'adhesió en l'endoteli i provoquen dany a la BHE, promovent la infiltració de leucòcits circulants com neutròfils, limfòcits i monòcits (Konsman et al., 2007).

Com ja hem descrit, el sistema nerviós central (SNC) i el sistema immune són dos supersistemes altament relacionats (Elenkov et al., 2000). Aquesta unió estreta podria comportar manifestacions immunològiques sistèmiques pel fet de patir dany cerebral, i viceversa. El SNC modula l'activitat del sistema immune a través de complexes vies humorals i neurals que inclouen l'eix hipotalàmic pituitària adrenal (HPA), el nervi vagus i el sistema nerviós simpàtic (Elenkov et al., 2000). L'eix HPA està compost pel nucli para ventricular (PVN) del hipotàlem, el lòbul anterior de la glàndula pituitària, i el còrtex de la glàndula adrenal. Aquestes vies connecten els diferents òrgans amb el cervell. Així, l'estimulació directa del nervi vagus eferent inhibeix la síntesis de TNF- α en diferents òrgans durant l'endotoxèmia experimental i en animals sota I/R (Bernik et al., 2002).

INTRODUCCIÓ

Chamorro i col·laboradors van mostrar com la via neural colinèrgica, l'adrenèrgica, la glàndula medul·lar adrenal i els òrgans limfoides estan funcionalment connectades, demostrant com el sistema immunitari respon a la isquèmia cerebral (figura 9).

També s'ha descrit que la isquèmia s'associa amb una major incidència d'infeccions en pacients (Mattila et al., 1998), especialment amb infeccions pulmonars com la pneumònia (Kwan et al., 2006), i amb un risc de mortalitat més elevat. Una possible causa d'això és la limfopènia que s'ha descrit després del fenomen isquèmic. Aquest fet s'associa a una reducció de limfòcits T i cèl·lules natural killer NK circulants en sang perifèrica, generant un estat d'immunosupressió (Chamorro et al., 2007; Meisel et al., 2005; Prass et al., 2003).

Així doncs, la modificació o modulació del sistema immunitari en aquesta malaltia podria ser una teràpia prometedora que requereix d'un estudi en profunditat.

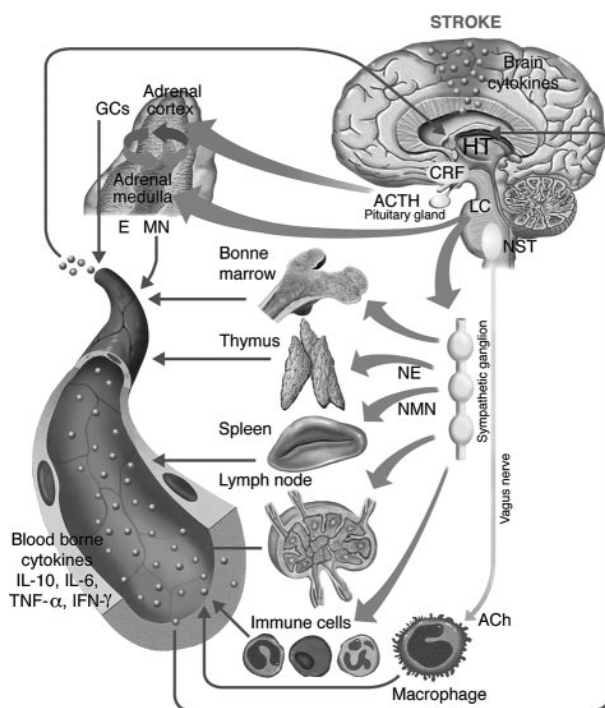


Figura 9: Representació esquemàtica de la comunicació entre les diferents vies del sistema nerviós central i el sistema immunitari. *ACTH* hormona adrenocorticotropina; *E*, epinefrina; *GCs*, glucocorticoides; *HT*, hipotàlem; *MN*, metanefrina; *NE*, norepinefrina; *NMN*, normetanefrina; *NST*, nucli del tracta. (Extret de Chamorro A et al 2007).

2.4. Activació del complement

Des del seu descobriment els anys 1880s, el complement, es va identificar com una maquinària de reconeixement i destrucció de patògens. Però des d'aleshores, diversos autors han descrit altres rutes en les quals pot estar involucrat (Ricklin and Lambris, 2013) que inclouen la interconnexió amb el sistema de coagulació (Mastellos and Lambris, 2002).

El sistema del complement involucra proteïnes, la majoria de les quals són inactives, i que requereixen ser seqüencialment tallades i activades. En aquesta cascada proteolítica hi intervenen diferents subunitats, de C1 a C9. Finalment, la via culmina en la lisi de la cèl·lula per la formació d'un porus gràcies a l'acció de C9 en el complex d'atac a la membrana (*membrane attack complex* o MAC) (Laursen et al., 2012). El sistema del complement s'activa per tres vies conegudes: la clàssica, l'alternativa i la de les lectines.

2.4.1. La via clàssica

El complex C1 és un complex multimèric format per les subunitats C1q, C1r i C1s (figura 10). Aquestes molècules poden unir-se a les fraccions Fc (regió de fragment cristal·litzable) de les immunoglobulines IgG i IgM. L'activació de C1s i C1r té lloc quan C1q s'uneix a Fc. A continuació, C1s talla C4 i C2 per formar la convertasa C3, C4bC2b (Wallis et al., 2010). L'activitat C3 convertasa, que es troba en les formes C4bC2b i C3bBb, talla C3 per donar C3a (anafilatoxina) i C3b. C3b col·labora en l'amplificació de la senyal d'activació del complement i en la fagocitosi (Hourcade and Mitchell, 2011). Per una altra banda, C3b forma complexos amb C3 convertasa (C3bBbC3b i C4bC2bC3b) per tal de generar activitat C5 convertasa. La C5 convertasa talla C5, originant C5a (anafilatoxina) i C5b. El porus MAC (C5b-9) és iniciat amb la unió de C6 i C7 a C5b i posteriorment a C8. En darrer lloc, múltiples molècules de C9 s'uniran al complex C5bC6C7. El complex MAC forma un porus a la membrana, i com a resultat provocarà la lisi de la cèl·lula.

2.4.2. La via alternativa

Aquesta ruta és iniciada per carbohidrats, lípids i proteïnes que es troben típicament a la superfície d'agents patògens (Qu et al., 2009). C3 és constantment hidrolitzat de manera espontània en molt petites quantitats originant C3b, que s'unirà a dianes com per exemple bacteris. A continuació, es recluta el factor B que s'uneix a C3b per formar C3 convertasa o C3Bb (figura 10). Aquest complex inestable s'estabilitza en unir-se amb la proteïna plasmàtica properdina (Kemper et al., 2010). Properdina és majoritàriament produïda per neutròfils, tot i que també es troba en macròfags i limfòcits T. Aquesta proteïna estabilitza C3Bb unint-se a C3. A més a més, estudis recents suggereixen la possibilitat que properdina pugui actuar mitjançant unió directa amb cèl·lules apoptòtiques i necròtiques (Kemper et al., 2010). Contràriament a l'acció de la properdina, els factors H i I promouen la degradació proteolítica del complex C3bBb i atenuen l'activació de la via alternativa (Kouser et al., 2013).

2.4.3. La via de les lectines

Aquesta ruta és activada per la proteïna lectina d'unió a les manoses MBL o bé la ficolina (figura 10). Aquestes molècules s'uneixen a carbohidrats de la superfície de patògens com llevats, bacteris, paràsits i virus. Ambdues MBL i Ficolina circulen en el sèrum com complexos amb *MBL-associated proteins* o MASPs (Wallis, 2007). L'activació de MBL es dona gràcies a les MASPs. En concret, la MASP-2 és essencial pel tall de C4 i C2 que origina la C3 convertasa (Dommett et al., 2006). Existeixen quatre tipus de MASPs diferents: MASP1, MASP2, MASP3 i la MASP2 truncada, coneguda com MAP19 (Sorensen et al., 2005). Quan MASP2 s'uneix als patògens, es produeix un canvi conformacional que l'auto-activa. Aleshores, MASP2 pot tallar C4 en les formes C4a i C4b. C4b s'uneix a la superfície dels patògens induint la unió de C2, que podrà ser tallada per MASP2 per formar C2b i C2a. C4b junt amb C2b tenen activitat enzimàtica per formar la C3 convertasa o C4bC2b (Dommett et al., 2006). El paper de les altres MASPs és

INTRODUCCIÓ

encara desconegut, tot i que s'ha descrit que MASP1 pot tallar C2 però no C4 (Wallis, 2007), afavorint l'activació del complement per unió dels complexos. MBL pot també reconèixer i unir-se a cèl·lules hoste (Ogden et al., 2001) i és possible que aquest reconeixement es doni també en cèl·lules danyades del SNC (Cervera et al., 2010). El gen de la MBL humana presenta diferents variants resultants de diversos polimorfismes que comporten nivells circulants baixos de MBL (Garred et al., 2003; Garred et al., 2006). Aquests polimorfismes tenen una incidència d'entre el 5-30% de la població que varia notablement en funció de la raça (Madsen et al., 1998).

S'ha suggerit que el dany que media el complement en la I/R cerebral podria ser independent de C1q (la via clàssica). Aquest fet centra l'atenció en qualsevol de les dues altres vies, tant l'alternativa com la de les lectines (De Simoni et al., 2004). Estudis en models murins d'I/R on s'administren inhibidors de C1, suggereixen que la MBL és la responsable d'aquest efecte protector (Gesue et al., 2009). La via de les lectines s'ha descrit que contribueix al dany per I/R en un model d'isquèmia al mesenteri donat que s'ha observat protecció significativa en animals deficientes en MBL i s'ha identificat les IgM naturals com activadors de la via de les lectines (Zhang et al., 2006b). En pacients d'ictus, el nostre equip ha descrit prèviament que els nivells baixos de MBL en sang correlacionen amb un bon pronòstic i un menor volum d'infart als 3 mesos, i que els ratolins deficientes en els gens de la MBL (en ratolí dos gens codifiquen per MBL, mentre que només un gen codifica per la MBL humana) també presentaven menors volums d'infart i menor afectació neurològica després de la isquèmia cerebral amb reperfusió, comparats amb els ratolins silvestres (Cervera et al., 2010) (Orsini et al., 2012)

Aquest fet posa de manifest la importància d'inhibir de forma selectiva l'activació del complement, tenint en compte que una inhibició sistèmica podria incrementar el risc d'infecció. Algunes estratègies que inhibeixen el sistema del complement en estats primerencs (al nivell d'iniciació dels complexos, C1, MBL-MASPs i ficolin-MASP) bloquegen selectivament una o dues vies deixant les altres intactes. Aquesta pot ésser la millor estratègia per modular el sistema del complement.

2.4.4. Via independent de C3

El sistema del complement, el de coagulació, kallikrein-kinin i el sistema fibrinolític són funcional i evolutivament propers, donat que comparteixen moltes proteases i inhibidors (Markiewski et al., 2007). La coagulació, com el complement, és un sistema altament conservat compost per diversos factors que s'activen seqüencialment i amplifiquen el procés, resultant en la formació final d'un coàgul de fibrina insoluble. Addicionalment, s'ha descrit que les proteases MASPs, concretament MASP2, pot activar protrombina a trombina i iniciar la coagulació *in vitro*, fet que podria explicar el mecanisme pel qual la trombina és produïda en animals C3 deficientes (Krarup et al., 2007).

A més de les 3 vies anteriors, els neutròfils i macròfags també poden activar el complement a través de l'alliberació de proteases o factors com Kallikrein-kinin, plasmina i factor XIIa (Bottazzi et al., 2010; Ward and Zvaifler, 1973). Així, la trombina, un component de la via de coagulació, pot generar localment C5a en animals deficientes en C3, que no són capaços de formar C5 convertasa (C3bBbC3b i C4bC2bC3b) a través de la ruta convencional (Huber-Lang et al., 2006). Un dels objectius d'aquesta tesi ha consistit en l'estudi de la implicació de la via de les lectines en la lesió cerebral després d'isquèmia/reperfusió.

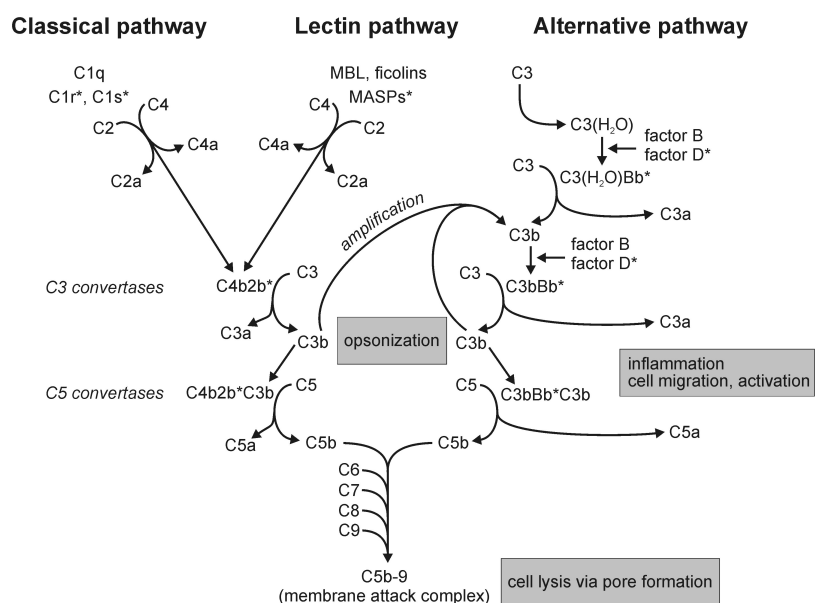


Fig.10 Activació del complement i les seves funcions. Les tres rutes d'activació del sistema del complement (Extret de Józsi M et al, 2011).

3. Respostes a la reperfusió

3.1. Inducció de neuroprotecció endògena: proteïnes d'estrès

L'estrès cel·lular provoca l'expressió de gens que responen a canvis en l'entorn cel·lular com altes temperatures, isquèmia, exposició a toxines, i d'altres que resulten en la desnaturalització de proteïnes (Giffard et al., 2004; Sharp et al., 1999). Uns d'aquests gens que s'indueixen són els de les proteïnes d'estrès de calor (Hsps), que mantenen la integritat i viabilitat cel·lular en condicions d'estrès. Les Hsps prevenen la desnaturalització de proteïnes i la incorrecte agregació de polipèptids durant l'exposició a canvis fisicoquímics. No obstant, també estan involucrades en la presentació d'antigen, el trànsit intracel·lular, la unió a receptors nuclears i l'apoptosi (Giffard and Yenari, 2004; Kiang and Tsokos, 1998).

La proteïna induïble per estrès Hsp-70, és una xaperona que s'ha detectat en poblacions de cèl·lules del sistema nerviós com neurones, glia i en cèl·lules endotelials en condicions d'estrès (Foster and Brown, 1997). S'indueix en diverses situacions que inclouen el xoc de calor (Mosser et al., 1997), l'estrès oxidatiu (Bellmann et al., 1996), estímuls apoptòtics (Buzzard et al., 1998; Jaattela et al., 1998) i isquèmia (Popp et al., 2009). És una proteïna que s'uneix als pèptids naixents i col·labora en el seu correcte plegament, a més d'afavorir el transport entre el diferents compartiments cel·lulars (Wegele et al., 2004).

La seva expressió s'associa a fenòmens de supervivència cel·lular (Kinouchi et al., 1993a). La inducció natural de Hsp-70 està associada amb supervivència neuronal després de la isquèmia cerebral (Planas et al., 1997; Rajdev et al., 2000). L'expressió de Hsp-70 s'ha detectat en neurones de la perifèria del nucli isquèmic després de 24h d'oclusió de l'ACM, mentre que en el nucli isquèmic es troba en vasos sanguinis (Popp et al., 2009). La seva dinàmica d'expressió després de la inducció d'isquèmia suggereix que és expressada per les neurones viables de la penombra (Kinouchi et al., 1993b). A més, s'ha demostrat que en zones amb supressió de la síntesi proteica però amb prou ATP, l'Hsp-70 s'indueix fortament en la penombra de la isquèmia després de la reperfusió del vas (Hata et al., 2000). En estudis més recents del grup de Koji Abe, s'ha demostrat l'expressió de la

INTRODUCCIÓ

proteïna a diferents temps en un model transitori en rata, i no és fins a les 12h després de la reperfusió que augmenta la seva expressió amb un pic màxim a 24h, i una disminució a les 48h (Zhan et al., 2010).

Aquest paper protector de la Hsp-70 podria explicar-se pel fet que pot participar en una àmplia varietat de vies metabòliques. Entre d'elles, intervé en la cascada proteica apoptòtica incrementant l'expressió de la proteïna antiapoptòtica cèl·lula B del limfoma 2 (Bcl-2) (Kelly et al., 2002) i inhibint l'alliberació de citocrom C del mitocondri (Creagh et al., 2000). S'ha demostrat que interfereix amb l'activitat de factors pro-apoptòtics com el factor 1 activador de proteasa apoptòtica-1 (Apaf-1) per tal de prevenir el reclutament de procaspasa-9 en l'apoptosoma (Beere et al., 2000; Saleh et al., 2000) i també pot unir-se i segrestar el factor inductor de l'apoptosi (AIF) (Matsumori et al., 2005). Totes aquestes proteïnes tenen un rol efector en etapes inicials de la ruta metabòlica d'apoptosi. És probable que la millora i protecció en isquèmia que aporta Hsp-70 sigui deguda al seu paper anti-apoptòtic des de fases inicials (Yenari et al., 2005).

A més del seu paper en l'apoptosi, Hsp-70 també pot alterar altres proteïnes o gens involucrats en la resposta inflamatòria. S'ha suggerit que Hsp-70 podria interactuar amb l'inhibidor del factor nuclear κ -B (NF κ -B), l'inhibidor I κ B, prevenint la seva fosforilació i la dissociació del complex NF κ -B (Ran et al., 2004). Així, diversos estudis ressalten que Hsp-70 té efectes antiinflamatoris. Estudis d'endotoxèmia recurrent en un model porcí de shock inflamatori demostren que l'expressió prèvia de Hsp-70 redueix els mediadors inflamatoris (Hayashi et al., 2002) i protegeix contra el shock inflamatori letal de TNF- α (Ding et al., 2001). Per una altra banda, Feinstein i col·laboradors van realitzar estudis en cèl·lules glials transfectades amb Hsp-70 i exposades a estrès per calor i tot seguit estimulades amb lipo-polisacàrid (LPS). Aquestes cèl·lules mostraven menys translocació de NF κ -B al nucli i, en conseqüència, menys expressió de iNOS (Feinstein et al., 1996). Finalment, el laboratori de Lee va descriure una reducció *in vitro* de la producció de MMP-9 en astròcits exposats a retirada de glucosa i oxigen, i aquests que sobre-expressaven Hsp-70 (Lee et al., 2004).

Totes aquestes evidències experimentals suggereixen que Hsp-70 podria reduir la inflamació i la neurotoxicitat en la isquèmia. No obstant, els mecanismes

d'aquesta protecció encara són desconeguts.

3.2. El dany per reperfusió

La reperfusió comporta una sèrie de riscos associats, com les transformacions hemorràgiques i el dany ocasionat per edema, que pot ser atribuït, en part, al dany per reperfusió (Schaller and Graf, 2004). El dany ocasionat per la reperfusió del teixit està molt ben documentat en l'ictus cardíac, però en cervell humà ha estat més complicat de posar de manifest pel propi benefici que comporta la reperfusió (Kutala et al., 2007).

Models intraluminals d'isquèmia transitòria seguida de reperfusió en rata han mostrat que a 6h d'oclusió de l'artèria cerebral mitja o isquèmia permanent es produeix menys dany que a 3h d'oclusió transitòria i 3h hores de reperfusió (Yang and Betz, 1994). Aronowski va descriure al 1997 que rates de la soca Lewis presentaven més dany amb oclusions transitòries de 2 ó 5 h seguides de reperfusió a 24h, que no pas les que patien isquèmia permanent 24h (Aronowski et al., 1997). Aquests estudis demostren que el dany isquèmic i el dany per reperfusió són depenents de factors com el grau i temps d'oclusió, o factors genètics. Això suggereix que el dany per reperfusió en humans pot ser variable, i que factors genètics i de comorbiditat hi poden estar-hi involucrats. En pacients la isquèmia pot ser diferent en termes de la duració, grau, localització i reducció del flux sanguini.

Així, el dany per reperfusió s'atribueix a diferents factors com l'estrès oxidatiu (Chan, 1996), el trencament de la barrera hematoencefàlica (del Zoppo and Mabuchi, 2003), l'acumulació de leucòcits en sang (del Zoppo et al., 1991) i la seva infiltració en el parènquima del cervell (Zhang et al., 1994), l'activació del complement (D'Ambrosio et al., 2001), plaquetes (Chong et al., 2001) i transformacions hemorràgiques (Pan et al., 2007). També pot causar un augment del flux sanguini per sobre dels nivells basals, com s'ha descrit en models d'isquèmia animal (Tsuchidate et al., 1997) i en pacients (Kidwell et al., 2001).

3.2.1. Estrès oxidatiu i antioxidants

El cervell és un òrgan molt sensible a l'estrès oxidatiu degut al seu elevat consum d'oxigen, el seu contingut en ferro i lípids insaturats i a la seva capacitat antioxidant relativament baixa (Flamm et al., 1978). En aquest sentit, el mitocondri juga un paper crític en la patogènesi de la isquèmia cerebral, no només a través de la generació de ROS, sinó també a través de la disfunció mitocondrial i apoptosi (tipus II) mitocondrial (Sanderson et al., 2013).

En condicions normals, el mitocondri allotja les proteïnes involucrades en la cadena de transport electrònic, que s'encarreguen del transport d'electrons i mantenen el potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) en un rang de 80-140mV (Sanderson et al., 2013). Aquest estat respiratori condueix a una producció òptima i màxima d'ATP (figura 11).

La isquèmia indueix una desfosforilació de les proteïnes de la cadena de transport electrònic, afavorint la hiper-activitat d'aquests complexos. Però per una altra banda, també provoca una disminució dels nivells d'oxigen. Aquest fet és el responsable de l'aturada de l'activitat de la cadena de transport d'electrons (CTE) degut a la manca del substrat terminal per la respiració (figura 11).

Com s'ha explicat més amunt, el tractament per prevenir i reduir el dany neurològic en pacients que han patit un ictus isquèmic és restaurar el flux sanguini del teixit afectat amb la trombòlisi el més aviat possible per tal d'evitar un major deteriorament neurològic. Paradoxalment, la restauració del flux sanguini o reperfusió pot causar dany addicional i exacerbar el dèficit cognitiu (Roberts et al., 2013).

Aquest fet es pot explicar perquè la recanalització del vas provoca un increment sobtat d'oxigen que re-inicia el transport d'electrons, el bombeig de protons i la síntesi d'ATP (Kalogeris et al., 2012). En aquest estat es produeix una hiperpolarització del potencial de membrana a $>150\text{mV}$, causant un increment exponencial d'espècies d'oxigen reactives (ROS) als complexos I i/o III de la cadena mitocondrial (figura 11). Aquest augment explosiu en els nivells de ROS pot actuar com a senyal catalitzador de l'apoptosi, un procés de mort cel·lular

INTRODUCCIÓ

controlada que es caracteritza per la formació de porus a la membrana mitocondrial, la peroxidació de cardiolipina o l'activació de caspases (Drose, 2013).

Adicionalment, la producció de superòxid, òxid nítric o peroxi nitrit facilita l'activació d'un cercle viciós que incorre en major dany mitocondrial, excitotoxicitat, peroxidació lipídica i inflamació (Crack and Taylor, 2005). Això origina la sobre-expressió de citocines, molècules d'adhesió endotelials i MMPs, augmentant encara més l'estrès oxidatiu i el dany tissular (Jian Liu and Rosenberg, 2005).

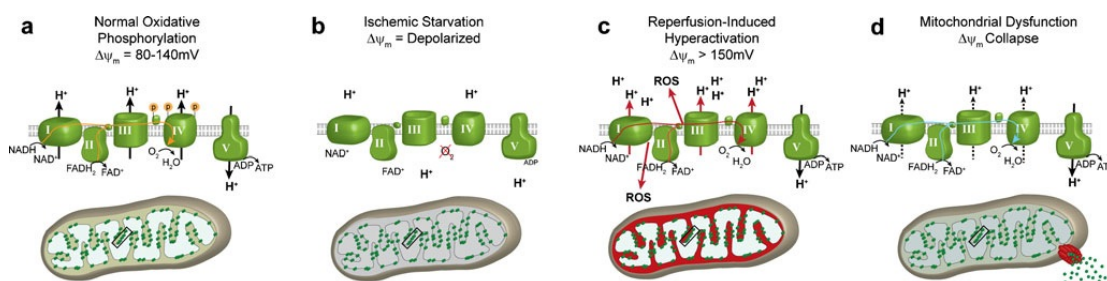


Figura 11: Progressió del dany causat per isquèmia/reperfusió. (a) Condicions normals, cèl·lula no estressada. (b) La isquèmia produeix un estat d'hipòxia on la cadena de transport d'electrons no pot funcionar degut a la insuficiència d' O_2 . (c) La reintroducció d' O_2 gràcies a la reperfusió inicia la transferència d'electrons, el bombeig de protons i la síntesi d'ATP. (d) L'augment en ROS provoca senyalització que promou la mort cel·lular per apoptòsi (Extret de Sanderson TH, 2013).

La primera funció de la CTE, és transportar electrons fins a l'acceptor final de la cadena, que és l' O_2 . Finalment, el complex IV catalitza la donació dels electrons a l' O_2 , promovent la transformació d' O_2 i H^+ a H_2O . El poder reductor dels electrons és transferit a través dels complexos I, III i IV afavorint el bombeig de protons a la membrana mitocondrial interna. Aquest bombeig constitueix la força més important per establir el potencial de membrana mitocondrial, que pot ser utilitzat per l'ATP sintasa (complex V) per convertir el ADP i Pi a ATP. Aquesta reacció proporciona el 90% de l'energia del cervell en condicions normals. No

INTRODUCCIÓ

obstant hi ha un petit percentatge d'electrons que escapen de la CTE, concretament en els complexos I i III. Aquests poden reaccionar amb l'O₂ per formar l'anió superòxid (O₂⁻), un potent agent pro-oxidant ROS. La reducció de les cinètiques de transport d'electrons i del potencial de membrana provocat per aquest ROS, indueix un estat de disfunció mitocondrial que es tradueix en una manca d'energia cel·lular. En aquest sentit, el model proposat per Hüttemann descriu un desequilibri entre l'accessibilitat d'energia i la seva demanda (Sanderson et al., 2013).

El sistema endogen antioxidant està constituït pel conjunt de superòxid dismutases (SOD), que converteixen l'anió O₂⁻ en H₂O₂ que serà processat per altres enzims com la catalasa o glutatió peroxidasa fins a H₂O (Chance et al., 1979). En condicions normals, aquest sistema és suficient per corregir la quantitat de ROS produït i prevenir el dany cel·lular. No obstant, en condicions patològiques els antioxidants endògens s'exhaureixen degut a la producció incontrolada de ROS, i per tant el resultat és que ROS reacciona amb molècules cel·lulars com proteïnes, lípids, àcids nucleics i polisacàrids de forma indiscriminada.

Aquests resultats destaquen el possible ús d'antioxidants exògens en el tractament del dany per reperfusió. Diverses teràpies antioxidants han mostrat efectes neuroprotectors en models experimentals d'isquèmia cerebral (Diener et al., 2008), especialment els que pertanyen a inhibidors o bloquejants de la producció de radicals lliures i activadors de la degradació de radicals (Amaro et al., 2013). Fins i tot, alguns d'aquests antioxidants s'han provat en combinació amb agents trombolítics amb efectes sinèrgics o additius (Amaro et al., 2013).

Així doncs, estudis en models d'isquèmia/reperfusió mostren que els antioxidants exògens tenen un paper beneficiós i poden protegir inhibint el dany per reperfusió. En aquesta tesi hem investigat el paper d'una molècula sintètica, el 3,4-dihidro-6-hydroxy-7-methoxy-2,2-dimethyl-1(2H)-benzopyran (CR-6), com a agent antioxidant. Aquesta molècula simple anàloga a la vitamina E, té la propietat addicional de quelar les espècies reactives de nitrogen. Estudis previs mostren un efecte beneficiós del CR-6 en front el dany oxidatiu *in vitro* (Miranda et al., 2007; Montoliu et al., 1999; Sanvicens et al., 2006).

3.2.2. Activació del complement

S'ha descrit que la reperfusió després de la isquèmia pot activar la via del complement (Mocco et al., 2006). Diversos estudis han mostrat que la inhibició del sistema del complement en casos de dany per I/R es relaciona amb millores en l'infart de miocardi (Walsh et al., 2005), de ronyó (de Vries et al., 2004), intestinal (Hart et al., 2005) i de múscul esquelètic (Chan et al., 2006). Així, estudis on s'inhibeixen totes tres vies d'activació del sistema del complement descriuen una neuroprotecció significativa en la isquèmia cerebral (Akita et al., 2003; Atkinson et al., 2006; Figueroa et al., 2005; Harhausen et al., 2010; Mocco et al., 2006). A més, la inhibició de les tres vies explicades anteriorment també disminueix l'acumulació de neutròfils infiltrants (Storini et al., 2005) així com la producció de radicals lliures i la peroxidació de lípids després d'I/R (Costa et al., 2006).

El sistema del complement és essencial per lluitar contra les infeccions, però recentment s'han presentat estudis indicant que també està involucrat en processos no inflamatoris i en vies de desenvolupament cel·lular. Així, l'activació del complement pot tenir conseqüències negatives sobre el pronòstic de la isquèmia cerebral i en d'altres òrgans, tal i com hem exposat anteriorment (Padilla et al., 2007; Zhang et al., 2006a). Per una altra banda, l'activació del complement també s'ha vist involucrat en el rebuig de transplantament d'òrgans (Elham et al., 2010).

El complement també activa la fagocitosi (opsonització) i pot actuar com a quimiotàctic estimulant les cèl·lules inflamatòries. Després de la isquèmia, el complement és activat i els seus components se sobre-expressen en la glia i en neurones degut al trencament de la BHE (Yanamadala and Friedlander, 2010). La implicació d'aquest sistema en la isquèmia es demostra pel fet que l'eliminació de components inhibitoris endògens del complement augmenten el dany causat al cervell, mentre que la seva sobre-expressió o administració és protectora (Ducruet et al., 2008). L'activació del complement contribueix al dèficit cognitiu i origina volums de lesió cerebral més grans (Atkinson et al., 2006), mentre que la depleció resulta en efectes beneficiosos (Cowell et al., 2003).

OBJECTIUS

OBJECTIUS

OBJECTIUS

OBJECTIUS

La reperfusió és ara per ara la única estratègia per protegir el cervell en malalts d'ictus isquèmic degut a la importància de l'aport de glucosa i oxigen per a la supervivència neuronal. No obstant això, la reperfusió pot induir estrès oxidatiu i promoure processos inflamatoris que poden ocasionar danys secundaris, encara que la seva contribució a la lesió cerebral no està del tot definida.

Aquesta tesi s'ha centrat en la identificació d'alteracions induïdes per la reperfusió després de la isquèmia cerebral. L'objectiu últim és contribuir a dissenyar estratègies protectores, partint de la hipòtesi que el dany per reperfusió es pot prevenir amb tractaments farmacològics beneficiosos.

Els objectius concrets són:

1. Identificar i visualitzar mitjançant tècniques d'imatge òptica mecanismes neuroprotectors endògens que s'activen després de la isquèmia/reperfusió.
2. Valorar la contribució de l'estrès oxidatiu en la lesió per reperfusió: efecte d'un antioxidant (CR-6).
3. Esbrinar si l'activació del complement per la via de les lectines contribueix al dany per reperfusió.

OBJECTIUS

ARTICLES

ARTICLES

ARTICLES

Article 1

- *In vivo* imaging of induction of heat-shock protein-70 gene expression with fluorescence reflectance imaging and intravital confocal microscopy following brain ischaemia in reporter mice.

de la Rosa X, Santalucía T, Fortin PY, Purroy J, Calvo M, Salas-Perdomo A, Justicia C, Couillaud F, Planas AM.

Eur J Nucl Med Mol Imaging. 2013 Feb;40(3):426-38.

ABSTRACT:

La isquèmia cerebral indueix una forta expressió de HSP-70. L'expressió neuronal de HSP-70 es considera un marcador de penombra. El propòsit d'aquest estudi va ser analitzar *in vivo* la inducció de l'expressió gènica de Hsp-70 per estudis d'imatgeria després d'isquèmia cerebral utilitzant un ratolí transgènic. Amb aquesta finalitat, es va utilitzar una seqüència de DNA de Hspa1b com a promotor per tal de generar un vector Hsp70-mPlum que emet en la regió de fluorescència del vermell llunyà. El constructe va ser provat en un sistema cel·lular, la línia de fibroblasts murins NIH3T3. Aquestes cèl·lules es van transfectar de forma transitòria i es va examinar la inducció de mPlum i Hsp-70 després d'un estímul d'estrès. A continuació de la validació del constructe, es van generar animals transgènics. Es va induir isquèmia cerebral focal mitjançant l'oclusió intraluminal transitòria de l'artèria cerebral mitja i el crani intactes dels animals es van analitzar *in vivo* amb *Fluorescence Reflectance Imaging* (FRI). També es van analitzar per microscòpia confocal després d'obrir una finestra cranial.

Les cèl·lules transfectades amb el constructe Hsp70-mPlum presentaven fluorescència atribuïble a mPlum després de l'estimulació. Un dia després de la inducció d'isquèmia, els animals transgènics mostraven senyal FRI localitzada en la zona positiva per HSP-70 dins de l'hemisferi ipsilateral, tal i com es va validar per immunohistoquímica. Per una altra banda, la microscòpia confocal intravital va permetre visualitzar el teixit cerebral a nivell cel·lular. La fluorescència de mPlum s'observava *in vivo* en el còrtex ipsilateral un dia després de la inducció d'isquèmia en neurones. Aquesta expressió és compatible amb la penombra i la viabilitat neuronal. Per una altra banda, també s'observava expressió en vasos sanguinis en el nucli de l'infart.

Aquest estudi mostra la inducció *in vivo* del gen de la Hsp70 en cervells isquèmics d'animals transgènics. La senyal de fluorescència detectada *in vivo* ens indica la inducció de Hsp-70 en neurones de la penombra i en la vasculatura dins el nucli isquèmic.

ARTICLES

In vivo imaging of induction of heat-shock protein-70 gene expression with fluorescence reflectance imaging and intravital confocal microscopy following brain ischaemia in reporter mice

Xavier de la Rosa · Tomàs Santalucía ·
Pierre-Yves Fortin · Jesús Purroy · Maria Calvo ·
Angélica Salas-Perdomo · Carles Justicia ·
Franck Couillaud · Anna M. Planas

Received: 6 August 2012 / Accepted: 4 October 2012 / Published online: 8 November 2012
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2012

Abstract

Purpose Stroke induces strong expression of the 72-kDa heat-shock protein (HSP-70) in the ischaemic brain, and neuronal expression of HSP-70 is associated with the ischaemic penumbra. The aim of this study was to image

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s00259-012-2277-7) contains supplementary material, which is available to authorized users.

X. de la Rosa · T. Santalucía · J. Purroy · A. Salas-Perdomo ·
C. Justicia · A. M. Planas (✉)
Department of Brain Ischemia and Neurodegeneration,
Institute for Biomedical Research of Barcelona (IBB),
Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Institut
d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS),
Rosselló 161, planta 6,
08036 Barcelona, Spain
e-mail: Anna.planas@iibb.csic.es

P.-Y. Fortin · F. Couillaud
Laboratory for Molecular and Functional Imaging:
UMR 5231 CNRS/University Bordeaux Segalen,
Bordeaux, France

M. Calvo
Unitat de Microscòpia Òptica Avançada CCiTUB,
Centres Científics i Tecnològics, School of Medicine
University of Barcelona,
Barcelona, Spain

Present Address:

J. Purroy
Parc Científic Barcelona,
Baldri Reixac 4, Torre R,
08028 Barcelona, Spain

induction of Hsp-70 gene expression in vivo after brain ischaemia using reporter mice.

Methods A genomic DNA sequence of the *Hspa1b* promoter was used to generate an Hsp70-mPlum far-red fluorescence reporter vector. The construct was tested in cellular systems (NIH3T3 mouse fibroblast cell line) by transient transfection and examining mPlum and Hsp-70 induction under a challenge. After construct validation, mPlum transgenic mice were generated. Focal brain ischaemia was induced by transient intraluminal occlusion of the middle cerebral artery and the mice were imaged in vivo with fluorescence reflectance imaging (FRI) with an intact skull, and with confocal microscopy after opening a cranial window.

Results Cells transfected with the Hsp70-mPlum construct showed mPlum fluorescence after stimulation. One day after induction of ischaemia, reporter mice showed a FRI signal located in the HSP-70-positive zone within the ipsilateral hemisphere, as validated by immunohistochemistry. Live confocal microscopy allowed brain tissue to be visualized at the cellular level. mPlum fluorescence was observed in vivo in the ipsilateral cortex 1 day after induction of ischaemia in neurons, where it is compatible with penumbra and neuronal viability, and in blood vessels in the core of the infarction.

Conclusion This study showed in vivo induction of Hsp-70 gene expression in ischaemic brain using reporter mice. The fluorescence signal showed in vivo the induction of Hsp-70 in penumbra neurons and in the vasculature within the ischaemic core.

Keywords Hsp-70 · Reporter mice · Molecular imaging · In vivo imaging · Stroke

Introduction

The inducible 72-kDa heat-shock protein (HSP-70) is a chaperone that binds to nascent polypeptides and supports protein folding and protein trafficking through intracellular compartments [1]. HSP-70 is induced in response to several types of stress situations [2], and it is regarded as a survival molecule that is coupled with functional protein translation [3]. Although it is not expressed in the adult brain under physiological conditions, the expression of HSP-70 is strongly induced by ischaemia [4–6]. Natural induction of HSP-70 after the start of cerebral ischaemia is associated with neuronal survival [7–9]. Very intense expression of HSP-70 is seen in neurons at the periphery of the ischaemic core 24 h after occlusion of the middle cerebral artery (MCA), while this protein is mainly expressed in blood vessels within the core [4–6]. The dynamic features of regional HSP-70 expression after induction of ischaemia suggest that it is expressed by viable penumbral neurons [4–10]. The demonstration of HSP-70 induction in the brain zones with suppressed protein synthesis but preserved ATP has confirmed that HSP-70 is strongly induced in the ischaemic penumbra [11, 12]. The extension of the penumbra region is gradually reduced with time as brain infarction progresses [13]. Short periods of MCA occlusion induce HSP-70 in neurons to a larger extent than more prolonged episodes or than permanent ischaemia [5, 6], which is consistent with the notion that early reperfusion rescues penumbral neurons from death [14–16].

The aim of this study was to develop reporter transgenic (Tg) mice expressing the far-red fluorescent protein mPlum under the transcriptional control of the Hsp-70 gene promoter to visualize Hsp-70 gene expression in vivo after the induction of transient cerebral ischaemia. We examined the living mouse brain by fluorescence reflectance imaging (FRI) and by intravital confocal microscopy. We selected mPlum as the fluorescent reporter to minimize fluorescence absorption and scattering by the cerebral parenchyma.

Methods

Plasmid construction

The Hsp70-mPlum reporter plasmid contains a minigene that expresses mPlum (the excitation and emission peaks are at 590 and 649 nm, respectively) under the control of the mouse *Hspa1b* gene proximal promoter. The minigene was assembled using a multisite gateway three-fragment vector

construction kit (Invitrogen, Carlsbad, CA) according to the manufacturer's instructions. This required prior construction of three entry clones that provided the elements for the construction of the reporter. The first clone, pDONR-P4-P1R-hspa1b, contained a 516-bp DNA fragment of the mouse *Hspa1b* gene comprising positions 21304395 and 21304910 in the C57BL/6 J mouse chromosome 17 genomic contig (NCBI accession number NT_039649.8; the gene runs on the complementary strand). This represents 284 bp of sequence upstream of the transcription initiation site and the complete 5'-UTR of *Hspa1b*. The insert was amplified by PCR from genomic DNA isolated from a Balb/C mouse, with primers that furnished 5' attB4 and 3' attB1 sites, and was cloned into pDONR-P4-P1R. The second entry clone (pDONR221-mPlum) contained the mPlum ORF, which was amplified by PCR from plasmid pBAD-mPlum (a kind gift from Dr. Roger Y. Tsien, UCSD) with primers that provided 5' attB1 and 3' attB2 sites, and was cloned into pDONR221. Finally, a cassette containing the SV40 early polyadenylation signal was amplified from pCDNA3.1 by PCR with primers that furnished 5' attB2 and 3' attB3 sites, and was subsequently cloned into vector pDONR-P2R-P3.

All inserts were amplified through a two-step PCR with two sets of primers that sequentially furnished the appropriate attB sites for each clone. Primer sequences are shown in Supplementary Table 1. PCR-amplified inserts were cloned into the corresponding vectors through BP Clonase-mediated reactions. Clones containing the correct inserts were checked by sequencing. The Hsp70-mPlum reporter vector was obtained as a result of a multisite LR Clonase-mediated recombination reaction between the promoter-less destination vector pDEST-R4-R3 and each of the three entry clones. Clones were analysed by sequencing to ensure the integrity of the minigene's constituents. The Hsp70-mPlum vector was further modified by the introduction of a Kozak sequence (ACCACC), and a rabbit β -globin intron 5' relative to the initiation codon in the mPlum ORF (Norsk Transgen Senter, Oslo, Norway), in order to improve cellular processing of the mRNA expressed from the minigene.

Animals and generation of the reporter Tg mice

Purified DNA containing the minigene was injected into a (C57BL/6 J \times CBA/J)F2 mouse blastocyst at the Norsk Transgen Senter. Four female founders that carried the mPlum minigene, as deduced by PCR genotyping, were obtained. Three of the founder females produced offspring in crosses with wild-type (wt) C57BL/6 J males. Tg female offspring were backcrossed to C57BL/6 J wt males for seven generations. Litters were genotyped to identify male Tg mice to be used in the experiments. A colony of homozygous Tg mice was maintained in the animal house of the

School of Medicine of the University of Barcelona. Double Tg C57BL/6 J mice were obtained by crossing the Hspa1b/mPlum(+/-) mice with the Hspa1b/lucF(+/+) strain [17], and were reared at the University of Bordeaux transgenic facilities. Animal work was conducted in the animal house of the School of Medicine of the University of Barcelona under the approval of the ethics committee of this university (CEEA) and the *Generalitat of Catalunya* according to the directives of Spanish law on this matter, and at the University of Bordeaux under the directives of the French Research Ministry, all in compliance with the regulations of the European Union.

PCR genotyping of Tg mice

DNA from tail clips was extracted and subjected to PCR amplification using an Extract'N'Amp tissue PCR kit (Sigma-Aldrich) according to the manufacturer's instructions. A 524-bp fragment in the Hsp70-mPlum vector was amplified with oligonucleotide primers specifically recognizing the Hsp70-mPlum transgene: 5'-CCTGGGCAACGTGCTGGT TATTGT-3' (forward) and 5'-CGCGCACCTTCACCTTGT AGAT-3' (reverse). The conditions for the PCR were: initial denaturation at 94 °C for 5 min, 30 cycles of amplification with denaturation at 94 °C for 30 s, annealing at 61 °C for 30 s and extension at 72 °C for 45 s. A final extension step was carried out at 72 °C for 5 min. Primers ICAMfw (5'-CTGAGCCAGCTGGAGGTCTCG-3') and ICAMrv (5'-GAGCGGCAGAGCAAAGAAGC-3'), which amplify a 178-bp DNA fragment from the mouse ICAM gene, were included in the PCR master mix in order to provide an internal positive control for each sample. After completion, the PCR reactions were run on 1 % agarose gels and visualized by staining with SYBR safe (Invitrogen). A representative result is shown in Supplementary Fig. 1.

Induction of HSP-70 and mPlum in cell cultures

The NIH3T3 mouse fibroblast cell line was transiently transfected with the Hsp70-mPlum reporter vector. Briefly, 10^5 cells per well seeded in 12-well dishes were transfected with 1.5 µg of Hsp70-mPlum vector and 7.5 µl of Superfect transfection reagent (Qiagen, Crawley, UK) according to the manufacturer's instructions, and 48 h later were exposed for 4 h to 50 µM sodium arsenite (NaAsO₂) [18]. mPlum fluorescence was evaluated 24 h later under an Olympus IX70 inverted epifluorescence microscope (Olympus, Barcelona, Spain). Total cellular extracts were prepared immediately after observation and used in Western blotting experiments. Expression of mPlum (about 27 kDa) and HSP-70 (about 70 kDa) was detected using specific antibodies (see below).

Induction of cerebral ischaemia

Focal brain ischaemia was produced in 22 Tg and 12 wt mice by transient intraluminal occlusion of the right MCA, as described previously [19]. Anaesthesia was induced with 4 % isoflurane in a mixture of 30 % oxygen and 70 % nitrogen protoxide) and maintained with 1–1.5 % isoflurane in the same a mixture with a facial mask. A longitudinal cut was made in the ventral middle line of the neck to expose the right common carotid artery. Next, the submaxillary glands and the omohyoid and sternohyoid muscles were separated, exposing the carotid vessels. A filament (nylon monofilament 6/0; Suturas Arago, Spain) was introduced through the external carotid artery to the level where the MCA branches out. Cerebral blood flow was assessed with laser Doppler flowmetry (Perimed, Järfälla, Sweden). After 60 min, the filament was cautiously removed, and the suture of the ipsilateral common carotid artery was removed to allow reperfusion. Animals were allowed to recover and were killed 1–2 days later. As non-ischaemic controls, eight animals were subjected to a sham operation in which all surgical and anaesthetic procedures were carried out including introduction of the filament through the external and internal carotid arteries but with its immediate removal to avoid ischaemia.

Fluorescence and bioluminescence imaging of live mice

Two days before the study, the posterior part of the mice was shaved with clippers and a depilatory cream to facilitate light propagation. FRI was performed in six mPlum/lucF mice before and 30 h after induction of ischaemia and in two control mice. Fluorescence images of the mice were acquired using a NightOWL II LB 983 system equipped with a NC 100 CCD deep-cooled camera (Berthold Technologies, Bad Wildbad, Germany). The mice were sedated with isoflurane (2 % in air) and fluorescence images (exposure 1 s, binning 1×1, field of view 12.5 × 12.5 cm²) and photographs (100 ms exposure) were obtained in the prone position. Excitation wavelengths of 590 nm/20 nm were used and the fluorescence emission was detected at 680 nm/30 nm in a Berthold chamber. Grey-scale body-surface reference images were acquired so that the FRI images could be superimposed on anatomical maps. Pseudocolour fluorescent images representing the spatial distribution of emitted photons were generated using IndiGO 2 software (Berthold Technologies). The FRI images were analysed manually by placing a small region of interest (ROI) at the level of the area of interest in the ipsilateral and contralateral hemispheres. Within this ROI, the mean light intensity (photons per second per centimetre) was measured. Images were processed with IndiGO 2 software, and measurements taken from the ROIs. At the end-point after in vivo imaging,

animals were killed and the brain was quickly removed from the skull and imaged again *ex vivo* for comparison purposes.

Bioluminescence (BLI) images of mice were acquired using a NightOWL II LB 983 system equipped with a NC 100 deep-cooled CCD camera (Berthold Technologies). Mice received an intraperitoneal (i.p.) injection of D-luciferin (Promega, Madison, WI; 2.9 mg in 100 μ l sterile phosphate buffer). The mice were then sedated with isoflurane (2 % in air), and BLI images (2 min integration period, 4×4 binning) and photographs (100 ms exposure) were obtained 10 min after the luciferin injection. During acquisitions mice were anaesthetized with isoflurane (2 % in air). A low light-emitting standard (Glowell; LUX Biotechnology, Edinburgh, UK) was placed next to the animal during each image acquisition to provide a constant reference for the resulting images. Grey-scale body-surface reference images were acquired so that the BLI images could be superimposed on anatomical maps.

Control experiments evaluating reporter gene expression by BLI (luciferase activity) and FRI (mPlum expression) in double Tg mice were carried out by heating a leg of the mice (45 °C for 8 min, $n=8$) to activate the Hsp1 α b promoter using a previously described water bath method [20]. In these experiments, FRI time-course studies of fluorescence induction were carried out showing a maximum at 30 h, which was the time chosen for FRI in the present work (see Supplementary Fig. 2).

Intravital confocal microscopy

For intravital confocal microscopy a cranial window was opened in the skull of the ipsilateral hemisphere either immediately after ischaemia/reperfusion in six mPlum Tg and three wt animals. The mice were anaesthetized with isoflurane and the cranial window was opened avoiding breaking the dura mater and was then sealed with a coverslip, following a previously described procedure [21]. In brief, a circle of about 5 mm diameter was drilled in the skull and the island of cranial bone removed. A cover glass was placed in the hole and dental cement was applied to seal the glass to the skull. The live cerebral cortex was observed under a high-speed confocal microscope (Leica TCS SP5 confocal resonant scan spectral microscope; Leica Microsystems, Heidelberg, Germany) using a $\times 25$ glycerol water immersion objective (numerical aperture 0.95). For microscopic observations, mice were anaesthetized with an i.p. injection of 100 μ l of a solution of ketamine (0.1 mg/g) and xylazine (0.01 mg/g). A solution of sodium fluorescein (250 mM, 2 μ M/Kg) was injected intravenously for live observation of the blood vessels under the confocal microscope. Some mice also received an i.p. injection of a solution of Hoechst 33342 (10 mg/mL, 12.5 μ g/g) to visualize

the cell nuclei. The excitation and emission wavelengths for observation of mPlum were 594 nm and 649 nm, respectively, for the detection of sodium fluorescein were 490 nm and 515 nm, respectively, and for the detection of Hoechst were 405 nm and 455 nm, respectively. Images were scanned at 8,000 lines/s.

Real-time RT-PCR

Hsp-70 and mPlum mRNA was studied at 24 h after induction of ischaemia in the ipsilateral and contralateral hemispheres. Total RNA was extracted using TRIzol (Invitrogen) from the brain of six Tg and six wt ischaemic mice and from two control mice per group). RNA quantity and purity were determined using a microspectrophotometer (ND-1000; NanoDrop Technologies, Wilmington, DE). Total RNA (500 ng) was reverse-transcribed using a mixture of random primers (high-capacity cDNA reverse transcription kit; Applied Biosystems, Foster City, CA). Real-time quantitative RT-PCR analysis was carried out using SYBR green I dye detection (#11761500, Invitrogen) using an iCycler iQ multicolour real-time detection system (BIO-RAD, Hercules, CA). PCR primers were designed with the aid of Primer3 software to bridge the exon–intron boundaries within the gene of interest to exclude amplification of contaminating genomic DNA. Primers were purchased from IDT (Laboratorios Conda, Torrejon de Ardoz, Spain) and the following sequences were used: forward 5'-GGCTGATCGGCCG CAAGTT-3', reverse 5'-GGAAGGGCCAGTGCTTCAT-3', for Hsp-70; and forward 5'-CCCCGTAATGCAGAA GAAGA-3', reverse 5'-GTCCAGCTTGATGTCCGGTCT-3', for mPlum. Quantification was performed by normalizing Ct (cycle threshold) values with the RPL14 (forward 5'-GGCTTTAGTGGATGGACCCT-3', reverse 5'-ATTGATATCCGCCTTCTCCC-3') control gene Ct, and analysis was carried out using the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method [22].

Assessment of brain infarction

To verify the presence of brain infarction, mice were anaesthetized with isoflurane and killed. The brain was sliced into 1-mm thick coronal sections. After FRI imaging of the sections, they were stained with 1 % 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC) for 10 min at 37 °C.

Immunohistochemistry

Ischaemic mice (24 h; six Tg and three wt) and control mice (three Tg and two wt) were anaesthetized with isoflurane, and their heart perfused with saline followed by paraformaldehyde (PFA, 4 %) in phosphate buffer (pH 7.4). The brain was removed, postfixed with PFA overnight and then kept in phosphate buffer, washed in the same buffer and then

sliced in a vibratome to obtain 30 μm thick coronal sections. In a separate set of experiments 1 mm thick TTC-stained sections (see above) were also used for immunohistochemistry. To this end the TTC brain sections were fixed in PFA overnight, washed in phosphate buffer and sliced in the vibratome. The vibratome brain sections were cryoprotected in a solution containing glycerol and were kept frozen at -20°C . Immunohistochemistry was performed free-floating as previously described [10]. Endogenous peroxidases were blocked with 3 % hydrogen peroxide and 10 % methanol in

PBS for 25 min. Sections were incubated for 2 h in 3 % normal horse or goat serum for mouse monoclonal or rabbit polyclonal antibodies, respectively, to block nonspecific binding sites, washed in T-PBS (PBS containing 0.5 % Triton X-100), and incubated overnight at 4°C with either mouse monoclonal antibody against HSP-70 (HSP01; Calbiochem, San Diego, CA) diluted 1:500, or rabbit polyclonal anti-red fluorescence protein antibody (ab34771; Abcam, Cambridge, UK) diluted 1:400. The sections were then rinsed in T-PBS and incubated for 1 h with a

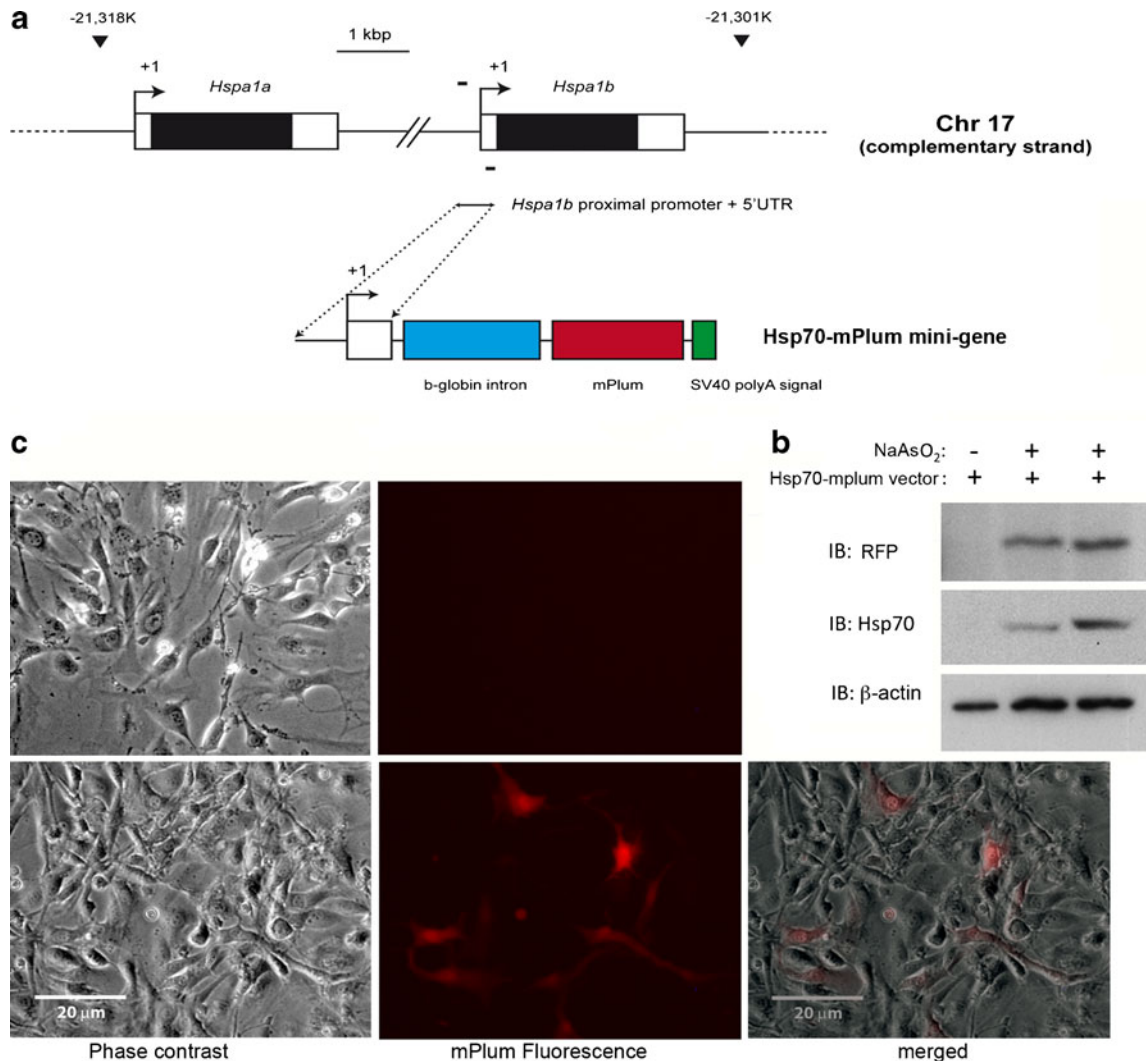


Fig. 1 **a** Genomic structure of the mouse Hspa1b gene. The intron-less Hspa1b gene sequence lies on the complementary strand of chromosome 17, near the almost identical Hspa1a gene. Arrowheads indicate positions in the sequence of mouse strain C57BL/6 J chromosome 17 genomic contig (NT_039649.8). The Hspa1b coding sequence is represented by closed rectangles, while the 5'- and 3'-UTRs are represented by open rectangles. The positions of the PCR primers used for amplification of the proximal promoter and 5'-UTR up to the initiation codon of Hspa1b are represented by dashes above (forward primer) and below (reverse primer) the gene. This fragment (dashed arrows) was used to drive transcription of the

Hsp70-mPlum minigene inserted into the Tg mice. The structure of the minigene is depicted below (for details see the section Plasmid construction in Methods). **b** Western blotting using antibodies against HSP-70 and RFP illustrates induction of both proteins in NIH3T3 cells transfected with the Hsp70-mPlum reporter vector after stimulation with sodium arsenite (NaAsO₂); β -actin is shown as the loading control. **c** NIH3T3 cells (all transfected with the Hsp-70-mPlum reporter vector) express mPlum fluorescence after stimulation with sodium arsenite (bottom row), but not in the absence of stimulation (upper row). Scale bar 20 μm

biotinylated secondary antibody (1:200; Vector Laboratories, Burlingame, CA), followed by incubation with 1 % avidin-biotin-peroxidase complex (ABC kit; Vector Laboratories). The reaction was visualized with 0.05 % diaminobenzidine or with 0.01 % benzidine dihydrochloride and 0.025 % sodium nitroferricyanide in 0.01 M sodium phosphate buffer, pH 6. The reaction was developed after addition of 0.005 % H₂O₂. Immunoreaction controls were included omitting the first or second primary antibodies. Alternatively, immunofluorescence staining was carried out using the same primary antibodies as above, followed by Alexa Fluor®488 and/or Alexa Fluor®546 secondary antibodies (Invitrogen). Hoechst was used to highlight the cell nuclei. Fluorescence was evaluated under an inverted fluorescence microscope (IX70 Olympus).

Western blotting

After a brief wash in PBS, cells were scraped from the wells in 100 µl of 1× loading buffer for sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE; 10 mM phosphate buffer, pH 7, 10 % glycerol, 2.5 % SDS, 0.5 mg/ml DTT, 0.16 mg/ml bromophenol blue). The lysates were spun through Nucleospin filters (Macherey-Nagel,

Düren, Germany) to break denatured chromatin. Ten percent of each sample was denatured at 100 °C for 5 min and then loaded into 10 % polyacrylamide gels. Proteins were then transferred to a polyvinylidene difluoride membrane (Immobilon-P; Millipore, Bedford, MA). The membranes were incubated overnight at 4 °C with the mouse monoclonal antibody against HSP-70 and the rabbit polyclonal antibody against red fluorescence protein (RFP; see the section [Immunohistochemistry](#)) both diluted 1:1,000. On the following day, membranes were incubated for 1 h with an anti-mouse Ig peroxidase-linked secondary antibody (1:2,000; Amersham, GE Healthcare, Little Chalfont, UK). The reaction was visualized using a chemiluminescence detection system based on the luminol reaction. Membranes were then reacted with a control antibody to check for equal protein loading in each lane. A mouse monoclonal antibody against actin (Sigma-Aldrich), diluted 1:50,000, was used as the loading control.

Statistical analyses

Comparisons by surgery (sham vs. ischaemia) and by brain hemisphere (ipsilateral vs. contralateral to MCA occlusion) and time-point were carried out with two-way ANOVA followed by the post-hoc Bonferroni test.

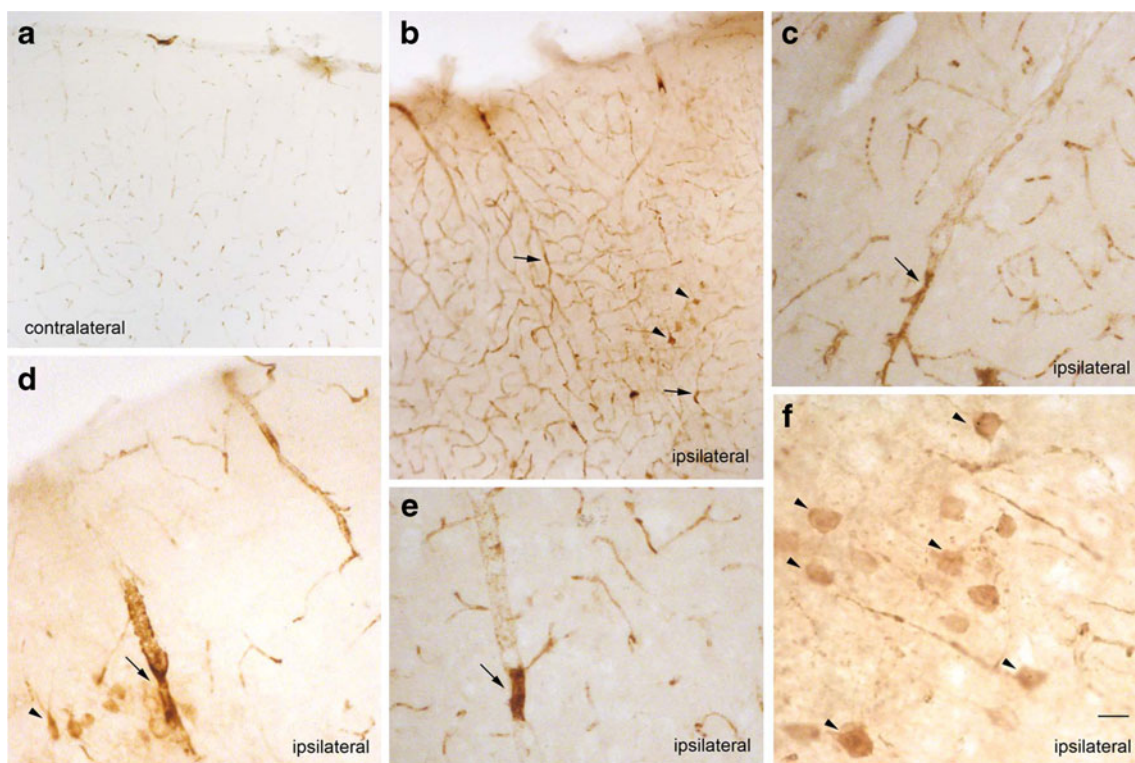


Fig. 2 Brain ischaemia induces HSP-70 as shown by immunohistochemistry in post-mortem tissue at 24 h. HSP-70 immunoreactivity is seen in the ipsilateral hemisphere (**b–f**) but not in the contralateral hemisphere (**a**). Several immunoreactive neurons are seen (**b**, **f**

arrowheads) at the borders of the ischaemic core, which mainly shows immunoreactive vessels (**b–e** *arrows*). *Scale bar a, b* 60 µm; *c–e* 30 µm; *f* 15 µm

Results

In vitro characterization of the mPlum construct

The constructed Hsp-70 (Hspa1b)-mPlum reporter vector is shown in Fig. 1a. NIH3T3 mouse fibroblasts were transfected with the reporter vector and showed mPlum fluorescence after exposure to sodium arsenite, a chemical that induces Hsp-70 gene expression [18]. Total cellular extracts were prepared 24 h after exposure to sodium arsenite for 4 h, and were used in western blotting experiments to detect induction of mPlum and HSP-70 expression using antibodies against RFP and against HSP-70, respectively. RFP (about 27 kDa) and HSP-70 were induced after treatment (Fig. 1b). In addition, after transfecting the cells with the mPlum reporter vector, fluorescence was observed by microscopy in cells treated with arsenite, but not in untreated cells (Fig. 1c).

Expression of *mPlum* and Hsp-70 after brain ischaemia in Tg mPlum mice

The construct described above was used to generate Hsp-70-mPlum Tg mice. Brain ischaemia was induced in Tg mice and the expression of Hsp-70 and mPlum mRNA was examined at 24 h. Induction of these mRNAs was detected in the ipsilateral but not in the contralateral hemisphere of the Tg mice. The level of expression (fold induction versus control) of mPlum mRNA showed a very good correlation (linear regression, $r^2 = 0.95$) with the level of expression of Hsp-70 mRNA in the different mice. Control (sham-operated) mice showed no expression of Hsp-70 or mPlum mRNA (not shown). Ischaemia in wt mice induced Hsp-70 mRNA in the ipsilateral hemisphere, but no expression of mPlum mRNA was detected.

Immunohistochemical studies established that 24 h after induction of ischaemia, HSP-70 protein was expressed in

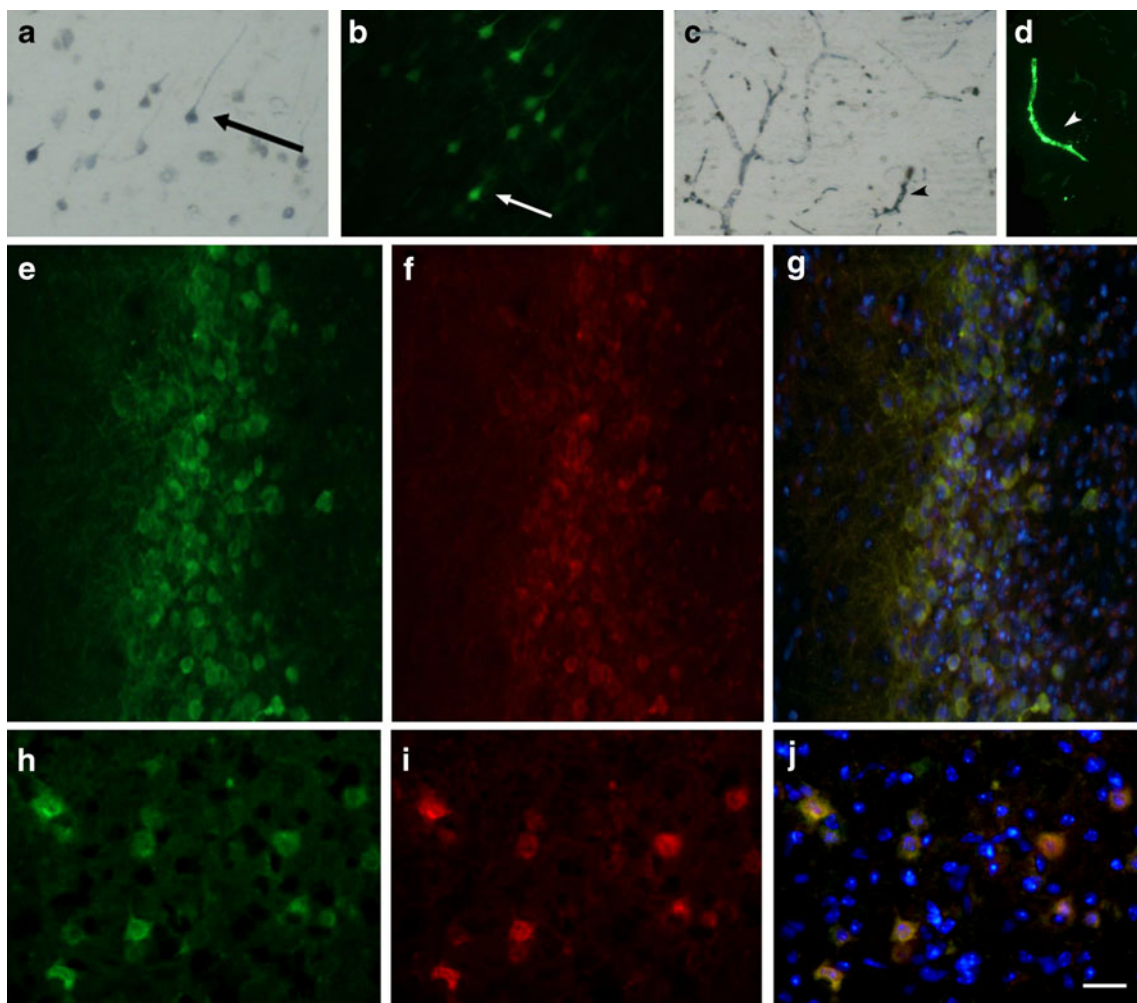


Fig. 3 Immunohistochemistry (a, c) and immunofluorescence (b, d) with antibodies against HSP-70 and RFP (to label mPlum), respectively, reveals the presence of positive neurons (a, b) and blood vessels (c, d). Double immunofluorescence against mPlum (f, i) and HSP-70 (e, h) shows colocalization (g, j). Scale bar a–d 30 μm; e–g 20 μm; h–j 15 μm

cortical neurons located at the border of the infarction and in blood vessels within the ischaemic core (Fig. 2). This cellular and regional pattern of HSP-70 expression agrees with that previously reported [4–6]. Immunohistochemistry and immunofluorescence against RFP with specific antibodies

showed expression of mPlum in cells with the morphology of neurons located around the ischaemic core (Fig. 3a, b) and in blood vessels within the core (Fig. 3c, d). Colocalization of RFP and HSP-70 was observed after double immunohistochemistry (Fig. 3e–j). These findings demonstrate

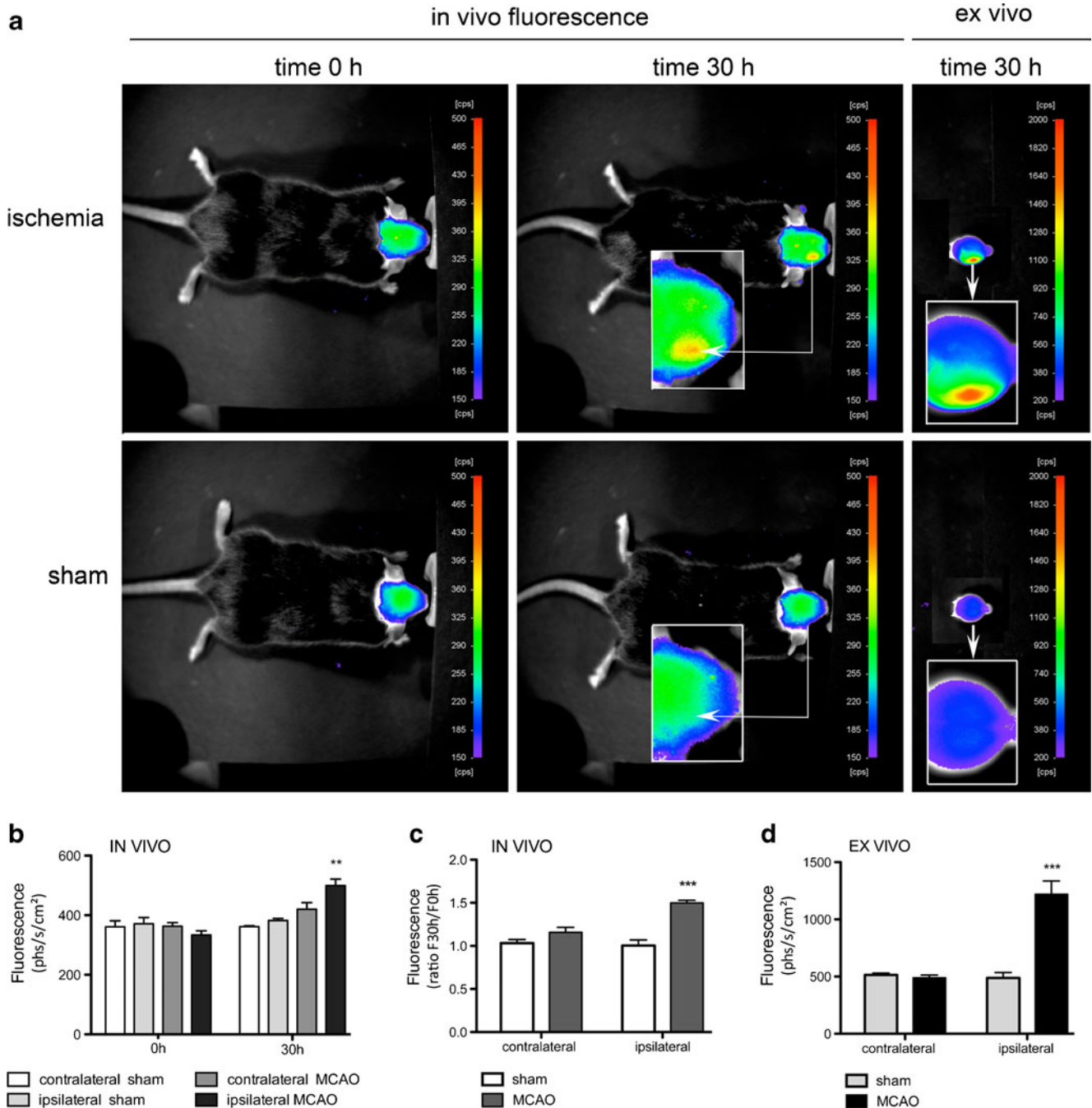


Fig. 4 a Whole-body FRI reveals mPlum fluorescence both in vivo (left and centre) and ex vivo (right) in the ischaemic hemisphere (upper row), but not in the hemisphere of sham-operated mice (bottom row). Colour scales indicate fluorescence intensity (maximum, purple minimum). Insets surface of the brain at higher magnification to illustrate the fluorescent region. **b–d** The fluorescence signal intensities in ROIs placed in the ipsilateral or the contralateral brain hemispheres are

increased in the ipsilateral hemisphere at 30 h after induction of ischaemia ($n = 4$), both in vivo (**b, c**) and ex vivo (**d**), but not in the hemisphere in sham-operated mice ($n=2$). Fluorescence is expressed either in absolute units (photons per second per centimetre, phs/s/cm²; **b, d**) or as the ratio between the fluorescence at 30 h and the fluorescence at 0 h in the same mice (**c**). ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

HSP-70 and mPlum proteins were located in the same cells, and therefore the mPlum transgene is a good reporter for HSP-70 expression.

In vivo imaging mPlum by FRI and BLI

For imaging the head of living mice (with an intact skull) the Hsp70/mPlum/luciferase reporter mouse was used. FRI showed an increase in fluorescence signal intensity in the ipsilateral hemisphere of living double Tg mice the day (30 h) after 60-min MCA occlusion in relation to the signals obtained before ischaemia (at 0 h; Fig. 4a), while no changes were observed in sham-operated mice. Ex vivo imaging of the brain after removal from the skull in the same animals showed similar results, but the intensity of the signals were higher than in vivo (Fig. 4a). The fluorescence intensity signals obtained in vivo were quantified (photons per second per centimetre) in the ipsilateral and the contralateral hemispheres before and after ischaemia. Increases in fluorescence signal intensity were detected in the ipsilateral hemisphere of ischaemic mice compared to that in sham-operated mice ($p < 0.01$; Fig. 4b). For each mouse the ratio between the intensity obtained after ischaemia (time 30 h) and that obtained before ischaemia (time 0 h) was calculated. Statistically significant increases in intensity in the ipsilateral hemisphere of the ischaemic mice were found ($p < 0.001$, two-way ANOVA by condition, i.e. ischaemia versus sham-operation, and hemisphere, i.e. ipsilateral versus contralateral hemispheres; Fig. 4c). The signal intensities in the ex vivo images again showed statistically significant increases ($p < 0.001$) in the ipsilateral hemisphere of the ischaemic mice compared to the contralateral hemisphere and to the signal in the sham-operated mice (Fig. 4d).

The brains of these mice were also imaged ex vivo the day after MCA occlusion after slicing the post-mortem tissue into 1 mm thick coronal sections. After FRI, the tissue sections were stained with TTC to visualize the infarcted core (Fig. 5, pale zone). Good correspondence was found between the location of the infarction and the location of fluorescence emission (Fig. 5). A strong signal intensity focus was observed within the infarcted region. HSP-70 immunohistochemistry on thinner slices (30 μm -thick vibratome sections) obtained from each TTC section showed that the zones with mPlum fluorescence grossly corresponded to the HSP-70-immunoreactive zones (Fig. 5). Nevertheless, it must be emphasized that in reporter mice any differences between the expression and/or localization of the reporter fluorescent protein (mPlum) and the endogenous protein (HSP-70) can be attributed to the fact that the reporter fluorescent protein traces induction of gene expression (Hsp-70 gene). However, the fate, half-life, and cellular trafficking of the reporter (mPlum) and the endogenous (HSP-70) proteins in the cells are not necessarily identical.

The double Tg mice were also imaged for in vivo BLI after induction of brain ischaemia following administration of luciferin. However, no increases in signal intensity were observed in the brain after induction of ischaemia (not shown), even though the Tg animals showed an intense BLI signal in control experiments in which a leg of the mice was heated to induce Hsp-70 expression (see Supplementary Fig. 2). BLI by the firefly luciferase reaction after injection of luciferin relies on the presence of oxygen and ATP, which is the limiting factor in this reaction [23]. Absence of a BLI signal in the ischaemic zone suggests that the availability of ATP or luciferin after induction of ischaemia was insufficient for the luciferase reaction to take place.

Confocal microscopy in the living mice

Intravital confocal microscopy was carried out to image the brain of living mice at the cellular level after opening a cranial window in the skull of the ipsilateral hemisphere (see the section [Intravital confocal microscopy](#)). The brain was examined 24 h after induction of ischaemia. Prior to live observation under the microscope, mice received an intravenous injection of sodium fluorescein to visualize blood vessels and fluorescence extravasation, as an indicator of alterations in the permeability of the blood–brain barrier (BBB). This dye remains inside the blood vessels under normal conditions but

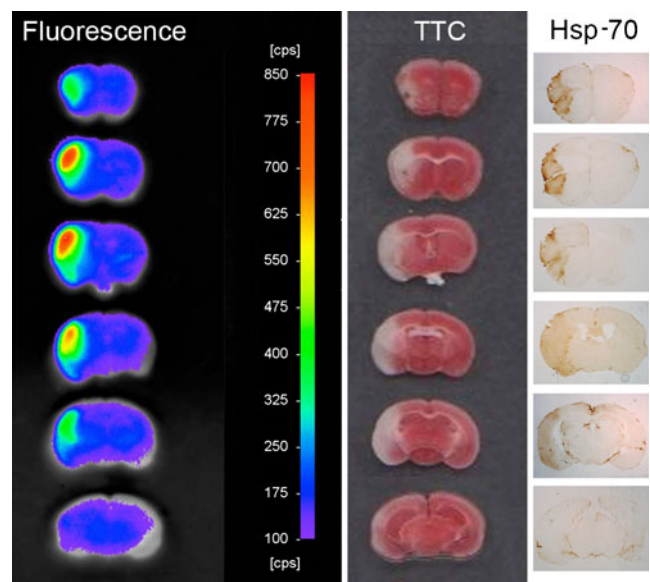


Fig. 5 Ex vivo FRI in coronal brain sections (1 mm thick) of a representative mouse 30 h after induction of ischaemia (*left column*) show fluorescence in the ischaemic hemisphere demonstrating induction of Hsp-70 gene expression. Fluorescence intensity is indicated on the colour-coded scale (*red* maximum, *purple* minimum). The same brain sections stained with TTC after FRI imaging (*middle column*) show the area of brain infarction (pale zone). Sections of thickness 30 μm (*right column*) obtained by slicing the 1-mm sections show corresponding immunoreactivity against HSP-70

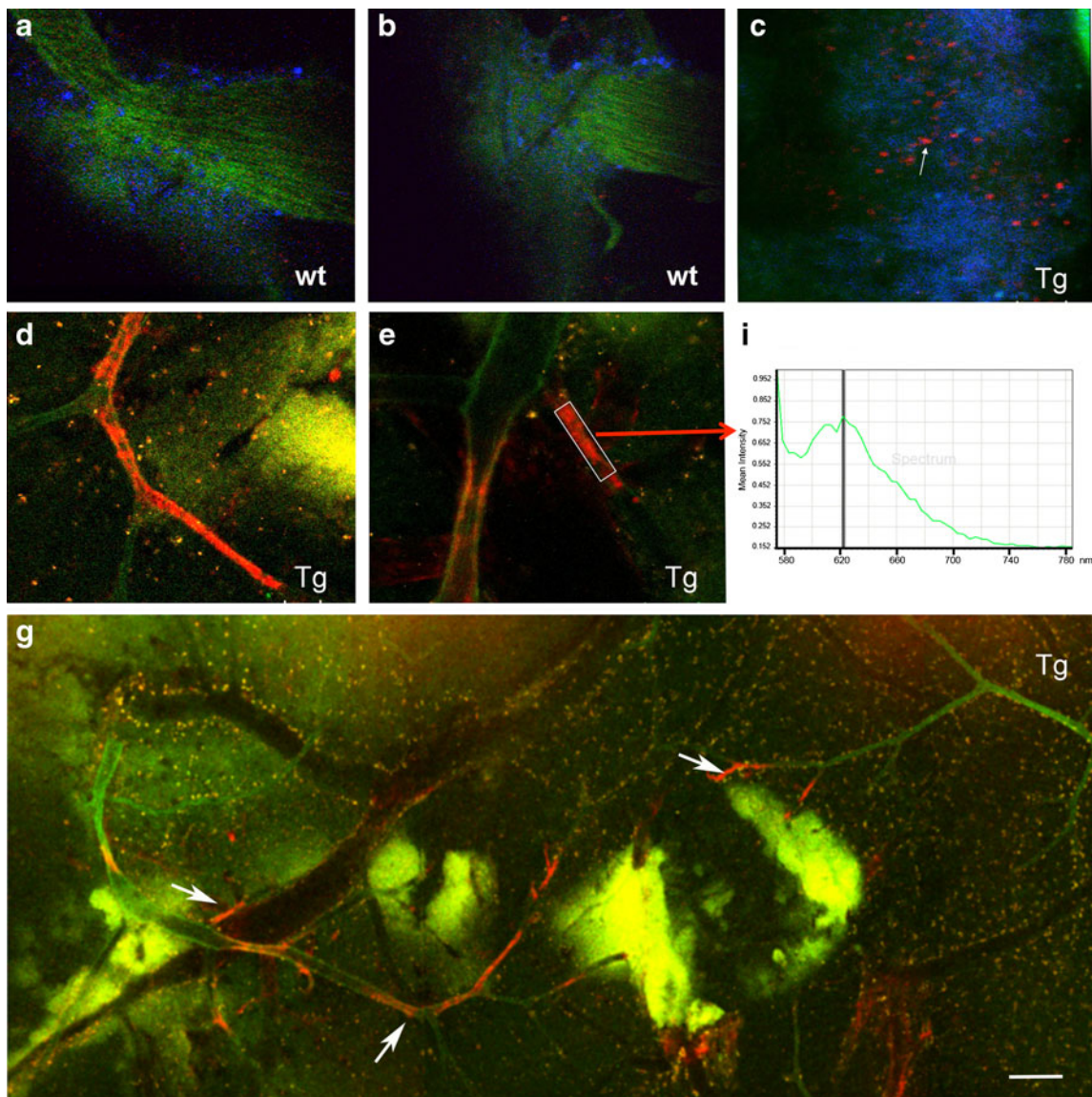


Fig. 6 In vivo confocal microscopy of wt (**a, b**) and mPlum Tg (**c–g**) mice 24 h after MCA occlusion. **a–c** Fluorescein-positive vessels (*green*) and Hoechst-positive cell nuclei (*blue*) are shown together with mPlum fluorescence (*red*), which is seen in the Tg mice only. **d–g** mPlum fluorescence (*red*) is seen in certain vessels. **f** Spectrum of the

red fluorescence zone indicated in **e**. **g** Large mosaic area generated from multiple consecutive images illustrates the presence of fluorescence in certain vessel segments. Fluorescein extravasation indicative of alterations in BBB permeability is seen in certain areas (*green* in **d** and **g**). Scale bar **a–c** 60 μm ; **d** 85 μm ; **e** 80 μm ; **g** 250 μm

extravasates to the brain parenchyma when the permeability of the BBB is altered [24]. Red fluorescence was observed in the ipsilateral cortex of mPlum Tg mice after induction of ischaemia (Fig. 6c–g), but not in ischaemic wt mice (Fig. 6a, b) or in non-ischaemic wt or Tg mice (not shown). The red fluorescence spectrum approximately corresponded to the wavelength of mPlum emission (Fig. 6f).

mPlum-positive cells were occasionally observed in the ipsilateral cortex following induction of ischaemia (Fig. 6c). The size and morphology of these cells suggested that they were neurons. In addition, mPlum fluorescence was often observed in the brain vasculature (Fig. 6d, e, g). mPlum

fluorescence was restricted to certain segments of the blood vessels located around vessel branching points (Fig. 6d, e, g). The size of some of the imaged vessels (20–30 μm) indicated that they were arterioles. Fluorescein extravasation was seen in several areas (Fig. 6g) suggesting alterations in BBB permeability.

Discussion

We imaged cerebral Hsp-70 gene expression in vivo after inducing brain ischaemia in reporter Tg mice expressing the

far-red fluorescent protein mPlum under the promoter of Hsp-70. After validating the Hsp-70-mPlum DNA construct in transfected cells exposed to challenges inducing Hsp-70 in cellular systems, the Tg mice were generated and were subjected to transient MCA occlusion for imaging Hsp-70 induction in the ischaemic brain. Hsp-70 expression is undetectable in the brain under physiological conditions but it is strongly induced by cerebral ischaemia [4–10]. Accordingly, FRI of the brain of mice with an intact skull showed a fluorescence signal in the ipsilateral hemisphere the day following MCA occlusion, and the affected zone corresponded to the zone of Hsp-70 induction, as revealed by immunohistochemistry in the post-mortem brain of the same mice. FRI after the brain had been removed from the skull gave a more intense signal and a better signal-to-noise ratio than in the living mice, since the signals obtained *in vivo* were attenuated by the presence of the skull. This experiment showed that Hsp-70 gene expression in the brain after induction of ischaemia can be followed noninvasively *in vivo* using reporter mice and FRI technology. Cerebral Hsp-70 induction was also monitored *in vivo* at the cellular level using intravital confocal microscopy after opening a cranial window. This technique allowed visualization of mPlum-positive neurons and blood vessels.

Numerous studies have shown that Hsp-70 overexpression or pharmacological induction has a neuroprotective effect against ischaemic neuronal cell death [25–33]. Also, astrocyte-targeted overexpression of Hsp-70 reduces neuronal vulnerability to transient global ischaemia [34]. Moreover, systemic administration of recombinant HSP-70 protein linked to cell-penetrating peptides reduces infarct volume and improves neurological function after transient focal cerebral ischaemia in mice [35] and rats [36]. In spite of these beneficial effects, one study in an experimental model of global cerebral ischaemia involving Hsp-70 Tg mice has shown that such mice are not protected [37], and viral delivery of Hsp-70 is not protective in a model of transient MCA occlusion, in contrast to delivery of Hsp-27 that was found to be beneficial [38].

In line with most of the above findings, the natural induction of Hsp-70 in neurons after induction of ischaemia is also thought to exert protective effects [7–9]. Hsp-70 is induced in viable neurons of the penumbra region and it is a molecular marker of the penumbra after stroke [11, 12]. Therefore, mPlum fluorescence in neurons indicated neuronal survival. Expression of Hsp-70 in the vasculature might also have protective effects since it is associated with attenuation of microvascular injury induced by ischaemia–reperfusion in other organs [39]. The size of some of the imaged fluorescent vessels was compatible with that of arterioles. Following the vessel tree under the confocal microscope showed mPlum fluorescence not along the full length of the vessels but in particular vessel segments only. The latter

were often located adjacent to branching points and might reflect shear stress in these zones. Shear stress has been reported to induce Hsp-70 in synovial cells [40] and thus induction of Hsp-70 in certain arteriolar segments after induction of brain ischaemia might be due to increased shear stress in these zones. Further studies are needed to address whether the segmented vascular induction of Hsp-70 gene expression is due to vascular stress, and whether it might be related to changes in local blood flow and vascular autoregulation.

The benefits of Hsp-70 induction described in the literature [25–33] make it a good target for pharmacological intervention. Several drugs inducing Hsp-70 expression, such as geldanamycin [41, 42], exert protective effects against ischaemic brain damage. The Hsp-70 reporter mice described here will allow monitoring of Hsp-70 gene induction *in vivo* after pharmacological intervention and will contribute to the validation of its use as an imaging biomarker in preclinical studies. New developments, including functionalized magnetic/optical nanoparticles or PET tracers targeting Hsp-70 [43, 44], are needed to guarantee ready availability of Hsp-70 imaging in humans.

Overall, this study showed *in vivo* expression of Hsp-70 gene in ischaemic brain with fluorescent reporter mice using FRI and intravital confocal microscopy. FRI showed Hsp-70 induction in the ischaemic region of whole mice, while confocal microscopy after opening a cranial window allowed visualizing it in neurons and in the brain vasculature. Neuronal Hsp-70 is taken as a marker of penumbra and indicates neuronal viability, whereas Hsp-70 in vessels is a marker of the ischaemic core. We conclude that the Hsp-70-mPlum reporter mouse is a good tool to study the induction of Hsp-70 gene expression *in vivo*.

Acknowledgments Financed in part by the European Community (Diagnostic Molecular Imaging Project, DIMI, EC-FP6-project LSHB-CT-2005-512146 and FP7/2007-2013 HEALTH, grant agreement no. 201024-ARISE), and the Spanish Ministry of Economy (SAF2008-04515-CO2-01/02 and SAF2011-30492). X. de la Rosa has a FPI PhD Fellowship from the Spanish Ministry of Economy. We are grateful to Ms. Francisca Ruiz and Dr. Pierre Costet for help with the reporter mouse colonies, and Ms. Coralie Genevois for technical assistance. We thank Anna Bosch and Elisenda Coll of *Centres Científics i Tecnològics* of the University of Barcelona for their help in intravital confocal imaging, and Dr. Mikael Vestberg of Norsk Transgen Senter for his support in the generation of the mPlum Tg mice.

References

1. Wegele H, Muller L, Buchner J. Hsp70 and Hsp90 – a relay team for protein folding. *Rev Physiol Biochem Pharmacol*. 2004;151:1–44.
2. Morimoto RI. Cells in stress: transcriptional activation of heat shock genes. *Science*. 1993;259:1409–10.

3. Silver JT, Noble EG. Regulation of survival gene hsp70. *Cell Stress Chaperones*. 2012;17:1–9.
4. Kinouchi H, Sharp FR, Hill M, Koistinaho J, Sagar SM, Chan PK. Induction of 70-kDa heat shock protein and hsp70 mRNA following transient focal cerebral ischemia in the rat. *J Cereb Blood Flow Metab*. 1993;13:105–15.
5. Planas AM, Soriano MA, Estrada A, Sanz O, Martin F, Ferrer I. The heat shock stress response after brain lesions: induction of 72 kDa heat shock protein (cell types involved, axonal transport, transcriptional regulation) and protein synthesis inhibition. *Prog Neurobiol*. 1997;51:607–36.
6. Popp A, Jaenisch N, Witte OW, Frahm C. Identification of ischemic regions in a rat model of stroke. *PLoS One*. 2009;4:e4764.
7. Nowak Jr TS, Osborne OC, Suga S. Stress protein and proto-oncogene expression as indicators of neuronal pathophysiology after ischemia. *Prog Brain Res*. 1993;96:195–208.
8. Kinouchi H, Sharp FR, Koistinaho J, Hicks K, Kamii H, Chan PH. Induction of heat shock hsp70 mRNA and HSP70 kDa protein in neurons in the ‘penumbra’ following focal cerebral ischemia in the rat. *Brain Res*. 1993;619:334–8.
9. Nowak Jr TS, Jacewicz M. The heat shock/stress response in focal cerebral ischemia. *Brain Pathol*. 1994;4:67–76.
10. Sanz O, Estrada A, Ferrer I, Planas AM. Differential cellular distribution and dynamics of HSP70, cyclooxygenase-2, and c-Fos in the rat brain after transient focal ischemia or kainic acid. *Neuroscience*. 1997;80:221–32.
11. Hata R, Maeda K, Hermann D, Mies G, Hossmann KA. Dynamics of regional brain metabolism and gene expression after middle cerebral artery occlusion in mice. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2000;20:306–15.
12. Hata R, Maeda K, Hermann D, Mies G, Hossmann KA. Evolution of brain infarction after transient focal cerebral ischemia in mice. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2000;20:937–46.
13. Heiss WD, Graf R, Wienhard K, Lötgen J, Saito R, Fujita T, et al. Dynamic penumbra demonstrated by sequential multitracer PET after middle cerebral artery occlusion in cats. *J Cereb Blood Flow Metab*. 1994;14:892–902.
14. Baron JC. Perfusion thresholds in human cerebral ischemia: historical perspective and therapeutic implications. *Cerebrovasc Dis*. 2011;11 Suppl 1:2–8.
15. Kidwell CS, Alger JR, Saver JL. Beyond mismatch: evolving paradigms in imaging the ischemic penumbra with multimodal magnetic resonance imaging. *Stroke*. 2003;34:2729–35.
16. Robertson CA, McCabe C, Gallagher L, Lopez-Gonzalez Mdel R, Holmes WM, Condon B, et al. Stroke penumbra defined by an MRI-based oxygen challenge technique: 2. Validation based on the consequences of reperfusion. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2011;31:1788–98.
17. Christians E, Champion E, Thompson EM, Renard JP. Expression of the HSP 70.1 gene, a landmark of early zygotic activity in the mouse embryo, is restricted to the first burst of transcription. *Development*. 1995;121:113–22.
18. Fauconneau B, Petegnief V, Sanfeliu C, Piriou A, Planas AM. Induction of heat shock proteins (HSPs) by sodium arsenite in cultured astrocytes and reduction of hydrogen peroxide-induced cell death. *J Neurochem*. 2002;83:1338–48.
19. Cervera A, Planas AM, Justicia C, Urrea X, Jensenius JC, Torres F, et al. Genetically-defined deficiency of mannose-binding lectin protects the brain from experimental and clinical stroke. *PLoS One*. 2009;5(2):e48433.
20. Deckers R, Debeissat C, Fortin PY, Moonen CT, Couillaud F. Arrhenius analysis of the relationship between hyperthermia and Hsp70 promoter activation: a comparison between ex vivo and in vivo data. *Int J Hyperthermia*. 2012;28:441–50.
21. Mostany R, Portera-Cailliau C. A craniotomy surgery procedure for chronic brain imaging. *J Vis Exp*. 2008;12. doi:10.3791/680.
22. 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;25:402–8.
23. Moriyama EH, Niedre MJ, Jarvi MT, Mocanu JD, Moriyama Y, Subarsky P, et al. The influence of hypoxia on bioluminescence in luciferase-transfected gliosarcoma tumor cells in vitro. *Photochem Photobiol Sci*. 2008;7:675–80.
24. Schoch HJ, Fischer S, Marti HH. Hypoxia-induced vascular endothelial growth factor expression causes vascular leakage in the brain. *Brain*. 2002;125:2549–57.
25. Yenari MA, Fink SL, Sun GH, Chang LK, Patel MK, Kunis DM, et al. Gene therapy with HSP72 is neuroprotective in rat models of stroke and epilepsy. *Ann Neurol*. 1998;44:584–91.
26. Rajdev S, Hara K, Kokubo Y, Mestral R, Dillmann W, Weinstein PR, et al. Mice overexpressing rat heat shock protein 70 are protected against cerebral infarction. *Ann Neurol*. 2000;47:782–91.
27. Hoehn B, Ringer TM, Xu L, Giffard RG, Sapolsky RM, Steinberg GK, et al. Overexpression of HSP72 after induction of experimental stroke protects neurons from ischemic damage. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2001;21:1303–9.
28. Tsuchiya D, Hong S, Matsumori Y, Kayama T, Swanson RA, Dillman WH, et al. Overexpression of rat heat shock protein 70 reduces neuronal injury after transient focal ischemia, transient global ischemia, or kainic acid-induced seizures. *Neurosurgery*. 2003;53:1179–87.
29. Giffard RG, Xu L, Zhao H, Carrico W, Ouyang Y, Qiao Y, et al. Chaperones, protein aggregation, and brain protection from hypoxic/ischemic injury. *J Exp Biol*. 2004;207:3213–20.
30. van der Weerd L, Lythgoe MF, Badin RA, Valentim LM, Akbar MT, de Belleruche JS, et al. Neuroprotective effects of HSP70 overexpression after cerebral ischaemia – an MRI study. *Exp Neurol*. 2005;195:257–66.
31. Xu L, Voloboueva LA, Ouyang Y, Emery JF, Giffard RG. Overexpression of mitochondrial Hsp70/Hsp75 in rat brain protects mitochondria, reduces oxidative stress, and protects from focal ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2009;29:365–74.
32. van der Weerd L, Tariq Akbar M, Aron Badin R, Valentim LM, Thomas DL, Wells DJ, et al. Overexpression of heat shock protein 27 reduces cortical damage after cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2010;30:849–56.
33. Mohanan A, Deshpande S, Jamadarkhana PG, Kumar P, Gupta RC, Chauthaiwale V, et al. Delayed intervention in experimental stroke with TRC051384 – a small molecule HSP70 inducer. *Neuropharmacology*. 2011;60:991–9.
34. Xu L, Emery JF, Ouyang YB, Voloboueva LA, Giffard RG. Astrocyte targeted overexpression of Hsp72 or SOD2 reduces neuronal vulnerability to forebrain ischemia. *Glia*. 2010;58:1042–9.
35. Doepfner TR, Nagel F, Dietz GP, Weise J, Tönges L, Schwarting S, et al. TAT-Hsp70-mediated neuroprotection and increased survival of neuronal precursor cells after focal cerebral ischemia in mice. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2009;29:1187–96.
36. Zhan X, Ander BP, Liao IH, Hansen JE, Kim C, Clements D, et al. Recombinant Fv-Hsp70 protein mediates neuroprotection after focal cerebral ischemia in rats. *Stroke*. 2010;41:538–43.
37. Olsson T, Hansson O, Nylandsted J, Jäättelä M, Smith ML, Wieloch T. Lack of neuroprotection by heat shock protein 70 overexpression in a mouse model of global cerebral ischemia. *Exp Brain Res*. 2004;154:442–9.
38. Badin RA, Lythgoe MF, van der Weerd L, Thomas DL, Gadian DG, Latchman DS. Neuroprotective effects of virally delivered HSPs in experimental stroke. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2006;26:371–81.
39. Chen G, Kelly C, Stokes K, Wang JH, Leahy A, Bouchier-Hayes D. Induction of heat shock protein 72 kDa expression is associated with attenuation of ischaemia-reperfusion induced microvascular injury. *J Surg Res*. 1997;69:435–9.

40. Schett G, Redlich K, Xu Q, Bizan P, Gröger M, Tohidast-Akrad M, et al. Enhanced expression of heat shock protein 70 (hsp70) and heat shock factor 1 (HSF1) activation in rheumatoid arthritis synovial tissue. Differential regulation of hsp70 expression and hsf1 activation in synovial fibroblasts by proinflammatory cytokines, shear stress, and antiinflammatory drugs. *J Clin Invest.* 1998;102:302–11.
41. Lu A, Ran R, Parmentier-Batteur S, Nee A, Sharp FR. Geldanamycin induces heat shock proteins in brain and protects against focal cerebral ischemia. *J Neurochem.* 2002;81:355–64.
42. Kwon HM, Kim Y, Yang SI, Kim YJ, Lee SH, Yoon BW. Geldanamycin protects rat brain through overexpression of HSP70 and reducing brain edema after cerebral focal ischemia. *Neurol Res.* 2008;30:740–5.
43. Javier DJ, Castellanos-Gonzalez A, Weigum SE, White Jr AC, Richards-Kortum R. Oligonucleotide-gold nanoparticle networks for detection of *Cryptosporidium parvum* heat shock protein 70 mRNA. *J Clin Microbiol.* 2009;47:4060–6.
44. Doubrovin M, Che JT, Serganova I, Moroz E, Solit DB, Ageyeva L, et al. Monitoring the induction of heat shock factor 1/heat shock protein 70 expression following 17-allylamino-demethoxygeldanamycin treatment by positron emission tomography and optical reporter gene imaging. *Mol Imaging.* 2012;11:67–76.

Article 2

- Antioxidant CR-6 protects against reperfusion injury after a transient episode of focal brain ischemia in rats.

Pérez-Asensio FJ, de la Rosa X, Jiménez-Altayó F, Gorina R, Martínez E, Messeguer A, Vila E, Chamorro A, Planas AM.

J Cereb Blood Flow Metab. 2010 Mar;30(3):638-52

ABSTRACT:

L'estrès oxidatiu i nitrosatiu són dianes per la intervenció després de la isquèmia/reperfusió. El propòsit d'aquest estudi va ser explorar els efectes del CR-6, una molècula anàloga a la vitamina E, amb efecte antioxidant i quelant d'espècies reactives de nitrogen.

Es va ocluir l'artèria cerebral mitja permanentment o transitòriament durant 90 min en rates Sprague-Dawley. La perfusió cortical va ser monitoritzada contínuament amb un sonda làser doppler. Es va administrar oralment el compost CR-6 amb dosis de 100mg/kg a 2 i 8h després de l'oclusió, o bé només a 2 h. Es van determinar signes de dèficit neurològic, volum d'infart i signes de dany per reperfusió, a dia 1 i 7 en els animals operats. El compost CR-6 va ser detectat en plasma i en cervell per HPLC. El animals administrats amb CR-6, presentaven una reducció del consum de glutatió i una producció de superòxid en l'hemisferi ipsilateral. El tractament amb CR-6 va fer disminuir el volum d'infart i atenuava el dèficit neurològic a dia 1 i 7 després d'isquèmia/reperfusió, però això no s'observava després d'isquèmia permanent. Immediatament després de la reperfusió, en la majoria d'animals el flux sanguini cortical retornava als valors previs a la isquèmia ($\pm 20\%$) mentre que d'altres mostraven una hiperèmia on el flux sanguini després de la reperfusió era superior a un 20% del valor pre-isquèmic. La hiperèmia es va associar amb esdeveniments com un increment del trencament de la barrera hematoencefàlica, edema, nitrotirosinació de proteïnes, expressió de COX-2, acumulació de neutròfils i una avaluació neurològica pitjor. El CR-6 atenua tots aquests efectes. En conclusió, l'administració oral del CR-6 després d'isquèmia transitòria protegeix el cervell del dany per isquèmia reperfusió.

ARTICLES

Antioxidant CR-6 protects against reperfusion injury after a transient episode of focal brain ischemia in rats

Fernando J Pérez-Asensio¹, Xavier de la Rosa¹, Francesc Jiménez-Altayó², Roser Gorina¹, Emili Martínez¹, Àngel Messeguer³, Elisabet Vila², Àngel Chamorro^{4,5} and Anna M Planas¹

¹Department of Brain Ischemia and Neurodegeneration, Institut d'Investigacions Biomèdiques de Barcelona (IIBB)-Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Barcelona, Spain; ²Department of Therapeutic Pharmacology and Toxicology, Institut de Neurociències, Facultat de Medicina, Universitat Autònoma de Barcelona (UAB), Bellaterra, Spain;

³Department of Chemical and Biomolecular Nanotechnology, Institut de Química Avançada de Catalunya (IQAC), CSIC, Barcelona, Spain; ⁴Comprehensive Stroke Center, Hospital Clinic, IDIBAPS, Barcelona, Spain;

⁵Department of Medicine, Medical School, University of Barcelona, Barcelona, Spain

Oxidative and nitrosative stress are targets for intervention after ischemia/reperfusion. The aim of this study was to explore the effect of CR-6, a vitamin-E analogue that is antioxidant and scavenger of nitrogen-reactive species. Sprague–Dawley rats had the middle cerebral artery (MCA) occluded either for 90 mins or permanently. Cortical perfusion was continuously monitored by laser–Doppler flowmetry. CR-6 (100 mg/kg) was administered orally either at 2 and 8 h after MCA occlusion, or at 2 h only. Infarct volume, neurological deficit, and signs of reperfusion injury were evaluated. CR-6 was detected in plasma and brain by HPLC. CR-6 reduced glutathione consumption in the ischemic brain and superoxide generation in the isolated MCA. CR-6 decreased infarct volume and attenuated the neurological deficit at 1 and 7 days after ischemia/reperfusion, but not after permanent ischemia. Immediately after reperfusion, cortical blood flow values returned to their baseline ($\pm 20\%$) in several animals, whereas others showed hyper-perfusion ($>20\%$ of baseline). Reactive hyperemia was associated with adverse events such as increased cortical BBB leakage, edema, protein nitrotyrosination, COX-2 expression, and neutrophil accumulation; and with a poorer outcome, and CR-6 attenuated these effects. In conclusion, oral CR-6 administration after transient ischemia protects the brain from reperfusion injury.

Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism (2010) **30**, 638–652; doi:10.1038/jcbfm.2009.237; published online 11 November 2009

Keywords: antioxidants; hyperemia; ischemia; middle cerebral artery; reperfusion; stroke

Introduction

Reperfusion is currently the best way to protect the brain against ischemic damage, and thrombolysis with recombinant tissue plasminogen activator (rtPA) is the only approved stroke treatment in

Europe and North America. Also, preclinical studies have shown that transient middle cerebral artery occlusion (MCA) occlusion plus reperfusion causes less damage than permanent MCA occlusion in rats (Memezawa *et al*, 1992; Rogers *et al*, 1997). However, reperfusion carries some risks, such as hemorrhagic transformation and fatal edema, which could be attributed, at least in part, to reperfusion injury (Pan *et al*, 2007). Post-ischemic damage associated to reperfusion injury is well-documented in the heart (Kutala *et al*, 2007), but demonstration of reperfusion injury in human brain has become more elusive. Experimental data obtained from certain rat models of intraluminal MCA occlusion (Dietrich, 1994; Yang & Betz, 1994; Aronowski *et al*, 1997) provide evidence for reperfusion injury in the preclinical setting. For instance, Yang and Betz (1994) showed that 6-h (h) permanent MCA occlusion causes less

Correspondence: Dr AM Planas, Department of Brain Ischemia and Neurodegeneration, IIBB-CSIC, IDIBAPS, Rosselló 161, planta 6, Barcelona E-08036, Spain.

E-mail: ampfat@iibb.csic.es

This study was supported by grants from the Ministerio de Educación y Ciencia (SAF2005-05793-CO1, SAF2008-04515-CO1, SAF2007-60406, and SAF2008-00048) and the European Community through the European Network of Excellence DiMI (LSHB-CT-2005-512146) and the FP7/2007-2013 project (grant agreement no. 201024).

Received 24 May 2009; revised 10 October 2009; accepted 14 October 2009; published online 11 November 2009

damage than 3-h transient MCA occlusion plus 3 h of reperfusion in the rat. Aronowski *et al* (1997) reported that a period of ischemia ranging between 2 and 5 h followed by reperfusion up to 24 h causes more damage than 24-h permanent occlusion in Lewis rats, but not in spontaneously hypertensive rats. These studies evidence that the manifestation of reperfusion injury might depend on several features, such as the degree and duration of MCA occlusion, and genetic factors, among others. This suggests that reperfusion injury in humans, if any, might be variable, as genetic and comorbidity factors could be involved and the length, degree, and location of flow reduction might differ in each patient.

Reperfusion injury is attributed to several effects of reperfusion, such as oxidative stress (Chan, 1996), blood–brain barrier (BBB) damage (del Zoppo and Mabuchi 2003), leukocyte accumulation in blood vessels (del Zoppo *et al*, 1991) and infiltration into the brain parenchyma (Zhang *et al*, 1994), platelet (Chong *et al*, 2001) and complement (D'Ambrosio *et al*, 2001) activation, and hemorrhagic transformation (Pan *et al*, 2007). Also, reperfusion might induce increases in blood flow above basal levels, as it has been reported in animals (Tamura *et al*, 1980; Traupe *et al*, 1982; Gourley and Heistad, 1984; Todd *et al*, 1986; Tsuchidate *et al*, 1997) and in humans (Kidwell *et al*, 2001).

Antioxidants exert beneficial effects in preclinical studies of ischemia/reperfusion, and they might protect against brain damage by inhibiting reperfusion injury (Tasdemiroglu *et al*, 1994). Here we investigated whether the antioxidant CR-6 (3,4-dihydro-6-hydroxy-7-methoxy-2,2-dimethyl-1(2H)-benzopyran) exerted beneficial effects in transient and permanent cerebral ischemia. CR-6 is a synthetic, structurally simpler, analogue of vitamin-E, with the additional capacity to scavenge nitrogen-reactive species (Montoliu *et al*, 1999). Previous reports showed beneficial effects of CR-6 against oxidative stress injury *in vitro* (Montoliu *et al*, 1999; Sanvicens *et al*, 2006) and *in vivo* (Miranda *et al*, 2007). We searched for signs of reperfusion injury by examining the development of early reactive hyperemia, BBB leakage, edema, signs of oxidative and nitrosative stress, and markers of inflammation and leukocyte accumulation.

Materials and methods

Animals

Adult, male Sprague–Dawley rats (Charles River, Lyon, France) (300 to 350 g body weight) were used in this study. Animal work was performed according to the local legislation (Decret 214/1997 of 30th of July by the 'Departament d'Agricultura, Ramaderia i Pesca de la Generalitat de Catalunya') under the approval of the Ethical Committee (CEE) of the University of Barcelona, and in compliance with the European legislation. Animals were kept under a 12-h day/night light cycle, controlled environmental conditions of temperature and humidity, and were given food and water

ad libitum. Surgical interventions were performed under isoflurane anesthesia.

Induction of Focal Ischemia

Focal brain ischemia was induced by intraluminal occlusion of the right middle cerebral artery (MCA) with reperfusion, as reported (Justicia *et al*, 2006). A group of rats was subjected to 90-min ischemia followed by reperfusion, whereas permanent ischemia was induced in another group of rats. Briefly, rats were anesthetized with isoflurane in a mixture of O₂ and N₂O (30:70) and intubated through the trachea for controlled ventilation. Blood samples were taken to determine blood gases (EasybloodGas Analyzer; Medica Corp., Bedford, MA, USA) and glucose concentration (Accu-chek Sensor Comfort; Roche Diagnostics Spain, St Cugat del Valles, Barcelona) at various time points during the surgical procedures. Mean arterial blood pressure was monitored and body temperature was maintained between 36.5°C and 37.5°C during surgery. Briefly, the common and external carotid arteries were exposed and the pterigopalatine artery was ligated. A filament (nylon monofilament 4/0, Look-sutures; Harvard-Apparatus, Holliston, MA, USA) heat-rounded at the tip was introduced (21 mm) through the external carotid artery to the level where the MCA branches out and a ligature was placed on the internal carotid artery. In the reperfusion group, the ligature of the internal carotid artery was taken off and the filament was cautiously removed 90 mins after occlusion to allow reperfusion. In the permanent ischemia group, the intraluminal filament was not removed. Sham-operated rats were subjected to all the surgical procedures and the filament was introduced in the MCA and immediately removed. Rats were allowed to recover from the anesthesia, and at 8 h, 24 h, or 7 days after MCA occlusion; they were deeply anesthetized with isoflurane and killed. Rats of the same gender and body weight that were not subjected to surgery were used as controls for biochemical determinations.

Measurement of Cerebral Blood Flow

Cortical cerebral blood flow (CBF) was assessed with a laser–Doppler system (Perimed AB, Järfälla, Sweden). The day before induction of ischemia, rats were anesthetized and a guide was implanted at the surface of the skull after reducing the thickness of the bone with a 1-mm-thick microdrill. The guide was fixed to the skull with dental cement and two miniature screws at the following stereotaxic coordinates: 2 mm posterior and 3.5 mm lateral to bregma. This location corresponds to the margin of the MCA territory. On the following day, the laser–Doppler probe was introduced through the guide and registration was started. After achieving a stable registry, ischemia was induced as described above. Perfusion was continuously monitored before ischemia, through the 90-min ischemia period, and during the first 15 mins after reperfusion. CBF data were used as criteria to exclude animals from the study, as follows: (1) rats, which after introducing the MCA occlusion filament, did not show a perfusion rate lower than 65% of basal were excluded, as it was considered that ischemia was not successfully induced; (2) rats, which at reperfusion did

not show recovery higher than 80% of the basal value, were excluded; and (3) rats with surgical complications, such as subarachnoid hemorrhage, were discarded.

Treatment

CR-6 was chemically synthesized as reported (Casas *et al*, 1992). CR-6 is a rather lipophilic molecule and for this reason it was dissolved in commercial edible olive oil (Carbonell, SOS Corporación Alimentaria S.A., Madrid, Spain) and it was orally administered to rats at a dose of 100 mg/kg in 1 mL using a feeding gauge. This dose was previously shown to protect rats against oxidative-stress damage (Miranda *et al*, 2007). The same oil was used as vehicle. Rats received CR-6 or the vehicle either twice, at 2 h and 8 h after the onset of ischemia, or at 2 h only. Rats received a code that did not reveal the allocated treatment, for the purpose of performing all further studies in a masked manner as experimenters analyzing the samples were not aware of the treatment assigned to each rat.

Evaluation of Infarct Volume

Rats were anesthetized with isoflurane and killed by decapitation. The brain was removed and sliced in 2-mm-thick coronal sections, which were stained with a 1% solution of 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride for 10 mins at 37°C. Sections were then immersed overnight in a 4% paraformaldehyde solution in 0.1 mol/L phosphate buffer (pH 7.4) and then washed and stored in the same buffer. Images of the sections were scanned and analyzed with an image analysis system (Scion Image; Scion Corporation, Frederick, MD, USA). Correction for brain edema was made by multiplying the infarct area by the ratio of the contralateral area to the ipsilateral area. Areas were integrated to calculate infarct volume. The extent of edema was assessed by calculating the percent increase of the ipsilateral/contralateral region volume.

Neurological Score

A simple neurological test on a nine-point scale (0 = no deficit to 9 = highest handicap) was performed before killing the animals, as reported previously (Justicia *et al*, 2006). Four tests were followed: (1) spontaneous activity (moving/exploring = 0, moving without exploration = 1, no moving or only when pulled by the tail = 2); (2) circling to the left (none = 0, when elevated by the tail and pushed or pulled = 1, spontaneously = 2, circling without displacement (spinning top) = 3); (3) resistance to left forepaw stretching (not stretching allowed = 0, stretching allowed = 1, no resistance = 2); and (4) parachute reflex (symmetrical = 0, asymmetrical = 1, contralateral forelimb retracted = 2). Animals, which died are reported separately for each treatment group.

RNA Isolation, cDNA Synthesis, and Real-Time Detection of iNOS, TNF- α , and IL-1 β mRNA

Total RNA from ipsilateral cortex was isolated using Trizol® reagent (Invitrogen Carlsbad, CA, USA) according

to the manufacturer's protocol. RNA quantity and purity were determined using an ND-1000 micro-spectrophotometer (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, USA). A 2- μ g weight of RNA was used for cDNA synthesis using the AMV First-Strand cDNA Synthesis kit (no.-12328 to 040; Invitrogen) and the cDNA was stored at -20°C until use.

Real-time quantitative reverse transcription-PCR analysis was performed by SYBR green-I dye detection using the iCycler iQTM Multicolor Real-Time Detection System (Bio Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA). Inducible nitric oxide synthase (iNOS), tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-1 β (IL-1 β), and β -actin were amplified in duplicate in a PCR optical 96-well reaction plate (Bio Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA). A 15- μ l volume of the PCR mixture per well contained 3 μ l of 1:4 diluted cDNA, 0.75 μ l of each sequence-specific primer (10 μ mol/L), 7.5 μ l of 1 \times iQ SYBR Green Supermix (Bio-Rad), and 3.75 μ l of nuclease-free water. Primers were synthesized (F. Hoffmann - La Roche AG, Basel, Switzerland) and reconstituted in nuclease-free water before use. The following primers were used for iNOS (forward): 5'-TGGTGCAGAAGC ACAAAGTC-3' and (reverse) 5'-GAACTGGGGGAAACCATT TT-3'; for TNF- α : (forward) 5'-GGGGCCACCACGCTCTTCTG TC-3' and (reverse) 5'-TGGGCTACGGGCTTGTCACTCG-3'; for IL-1 β : (forward) 5'-TGAAGCAGCTATGGCAACTG-3' and (reverse) 5'-TGCCTTCCTGAAGCTCTTGT-3'; and for β -actin: (forward) 5'-CAACCTTCTTGCAGCTCCTC-3' and (reverse) 5'-TTCTGACCCATACCCACCAT-3'. Optimized thermal cycling conditions were as follows: 5 mins at 95°C followed by 45 cycles of 15 secs at 95°C, and 45 secs at 59°C and 1:30 mins at 72°C. Data were collected after each cycle and presented graphically (iCycler iQTM Real-time Detection System Software, version 3.1; Bio-Rad). Specificity was confirmed by melting-curve analysis of the PCR products. Quantification was performed by analyzing the cycle threshold (C_t) values by the 2- $\Delta\Delta C_t$ method (Livak and Schmittgen, 2001).

BBB Breakdown

A 4-mL/kg (body weight) amount of a 2% (w/v in saline) solution of Evans Blue (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) was injected through the femoral vein 4 h after the induction of reperfusion, and 2 h later, rats were anesthetized and perfused through the heart with saline. The brain was cut in 2-mm-thick coronal sections, which were used for Evans Blue extraction. The ipsilateral and contralateral cortex and striatum were dissected out, weighted, and immersed in a solution containing 50% trichloroacetic acid (1.3 mL/g of tissue). The tissue was homogenized with a polytron device and centrifuged at 12,000 g for 20 mins. The supernatant was mixed with ethanol (1:3). Fluorescence intensity was measured with a fluorimeter at 680 nm using a 110- μ l sample aliquot. The concentration of Evans Blue (ng/mL) was calculated by using a standard curve generated with known concentrations of the dye.

Determination of Glutathione Concentration

Twenty-four hours after ischemia rats were anesthetized and killed. Brain tissue was dissected out to separate the

ipsilateral and contralateral cortex and striatum, and it was rapidly frozen and kept at -80°C until further analysis. The contralateral hemisphere was used as control. Total (GSx) and oxidized (GSSG) glutathione concentrations (nmol/mg of protein) were measured as described by Baker *et al* (1990), with minor modifications. Tissue was sonicated in 3.3% 5-sulfosalicylic acid (1 mL per 200 mg of tissue) and centrifuged at 12,000 g for 30 mins at 4°C . The supernatant was used to determine GSx and GSSG, whereas the pellet was used to determine protein concentration (Bradford Method; Bio-Rad). The reaction is based on the oxidation of DTNB (5,5'-dithio-bis-(2-nitrobenzoic acid)) followed by measurement at 405 to 412 nm in a spectrophotometer. Formation of GSSG was determined in 100 μl of the supernatant after addition of 2 μl of 2-vinylpyridine. The content of reduced glutathione (GSH) was estimated as follows: $\text{GSH} = \text{GSx} - (2 * \text{GSSG})$.

Western Blotting

Western blotting was performed using monoclonal antibodies against myeloperoxidase (MPO) (PeliCluster; A Menarini Diagnostics, Badalona, Barcelona, Spain), diluted 1:500, and against nitrotyrosine (Abcam Limited, Cambridge, UK), diluted 1:500. A rabbit antibody against cyclooxygenase-2 (COX-2) (Cayman Chemical Co., Ann Arbor, MI, USA) was used diluted 1:1,000. Mouse monoclonal antibodies against β -tubulin (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA), diluted 1:50,000; anti-glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (Assays Designs, Ann Arbor, MI, USA), diluted 1:5,000; or a rabbit polyclonal antibody against actin (Stressgen, Victoria, Canada), diluted 1:100,000, was used as loading controls. The optical density of the bands was measured by densitometric analysis (GS-800 Densitometer; Bio-Rad). The ratio between band intensity of specific proteins and the corresponding loading control was calculated to correct for differences in protein gel loading. For each gel, values are expressed as the percentage of control.

Immunohistochemistry

Protein expression was studied at 24 h by immunohistochemistry. Two-millimeter-thick coronal brain sections were immersed in 4% paraformaldehyde in phosphate buffer (pH 7.4) overnight and then washed in the same buffer. Sections measuring 50 μm were obtained with a vibratome and were used free-floating for immunostaining using a rabbit polyclonal antibody against COX-2 (Cayman Chemical Co., Ann Arbor, MI, USA) diluted 1:200, as previously reported (Planas *et al*, 1999). Immunohistochemistry against MPO was performed with a rabbit polyclonal antibody (Dako, Glostrup, Denmark), diluted 1:800, in 5- μm -thick paraffin sections. After the primary antibody, sections were incubated with biotinylated secondary antibodies followed by the ABC procedure (Serotec AbD, MorphoSys UK Ltd, Kidlington, Oxfordshire, UK). The reaction was developed with diaminobenzidine. MPO+ cells were examined with a light microscope in four different areas per brain section and in two different brain sections.

For each area, MPO+ cells were counted in a systematic manner in four different zones by an investigator who was not aware of the treatment, and the count average was calculated for each rat.

Isolation of the MCA and Evaluation of Oxidative Stress

The ipsilateral MCA was isolated ($n=17$) at 24 h after ischemia, as previously reported (Jiménez-Altayó *et al*, 2007). This study was conducted with ischemic rats that received either the vehicle ($n=7$) or CR-6 ($n=6$). Sham-operated animals ($n=4$) were also studied to underscore any mechanical effect of the filament on the MCA. Segments of the MCA were placed in Krebs-HEPES buffer (130 mmol/L NaCl, 5.6 mmol/L KCl, 2 mmol/L CaCl_2 , 0.24 mmol/L MgCl_2 , 8.3 mmol/L HEPES, 11 mmol/L glucose, pH 7.4) containing 30% sucrose overnight and transferred to a cryomold (Bayer Química Farmacéutica, Barcelona, Spain) containing Tissue-Tek OCT embedding medium (Sakura Finetek Europe B.V., Zoeterwoude, The Netherlands) for 20 mins, and then they were immediately frozen in liquid nitrogen for storage at -70°C until further measurements. The oxidative fluorescence dye dihydroethidium (DHE) was used to evaluate *in situ* production of superoxide radicals, as described by Jiménez-Altayó *et al* (2006). The frozen MCA was cut into 14- μm -thick sections and placed on a glass slide. Serial slices were equilibrated under identical conditions for 30 mins at 37°C in Krebs-HEPES buffer. Fresh buffer containing DHE (2 $\mu\text{mol/L}$) (Ex 546 nm and Em 610 nm) was applied topically on each tissue section, coverslipped, and incubated for 2 h in a light-protected humidified chamber at 37°C , and then viewed by fluorescence laser-scanning confocal microscopy (Leica TCS SP2, Heidelberg, Germany; $\times 63$), using the same imaging settings in all samples. Parallel sections were incubated with polyethylene glycol superoxide dismutase (PEG-SOD; 500 U/ml) for 2 h at 37°C . Fluorescence was detected with a 568-nm long-pass filter. For quantification, integrated optical densities were calculated from four sampled areas per ring for each experimental condition using the MetaMorph image analysis software (Universal Imaging; Molecular Devices, Downingtown, PA, USA). The integrated optical densities in the target region were calculated.

Determination of CR-6 Concentration in Plasma and Brain

The concentration of CR-6 in plasma and brain tissue was evaluated by high-performance liquid chromatography (HPLC) with fluorimetric detection. CR-6 (100 mg/kg) was orally administered to ischemic rats after 30 mins of reperfusion or to control non-ischemic animals. Blood samples were taken at different time points (ranging from 15 mins to 4 h) under isoflurane anesthesia. At either 15 mins or 4 h after CR-6 administration, animals were anesthetized and perfused through the heart with saline to remove blood from brain vessels. The method used for CR-6 extraction from biological samples and detection was an adaptation of a method for detection of vitamins by direct

liquid chromatography (Ruperez *et al*, 2004). Briefly, plasma (50 μ L) and brain tissue (200 mg) were deproteinized in acetone (150 μ L for plasma and 750 μ L for brain tissue) and the samples were sonicated for 10 secs (plasma) or 20 secs (brain tissue) with an ultrasound microprobe (Labsonic M; Sartorius AG, Goettingen, Germany), followed by centrifugation for 4 mins at 12,000 g (Centrifuge 5415 D; Eppendorf, Hamburg, Germany). Aliquots (10 to 50 μ L) of the supernatant were injected into the HPLC system (Water Associates, Milford, MA, USA) made of a 600E Pump, a 717 plus Auto sampler, and a 2475 fluorimeter. A reverse-phase Nucleosil C18 5- μ m column (10 \times 0.4 cm) was used (Teknochroma, Sant Cugat del Valles, Spain). The mobile phase was methanol/H₂O (80/20 v/v), which was run with an isocratic regular low flow rate of 0.8 mL/min. For CR-6 detection, the fluorimeter was adjusted to 296 nm Ex/334 nm Em according to the fluorescence spectrum of the compound. CR-6 eluted from the column at 2 mins of retention time. Quantification was performed by external calibration. The CR-6 detection limit in plasma samples was 10 ng/mL. In good agreement with data of Ruperez *et al* (2004), the recovery from plasma was close to 100%.

Statistical Analyses

Comparisons between two groups were made using *t*-test or Mann–Whitney non-parametric test, depending on whether or not the data passed the normality test (D'Agostino & Pearson omnibus normality test). Comparisons between more than two groups were made by one-way analysis of variance followed by Bonferroni's *post hoc* analysis for data conforming normality. Otherwise, data were analyzed using Kruskal–Wallis test followed by Dunn's multiple comparison test. Correlation analysis was performed using Pearson's test. Statistical analyses were carried out with the GraphPad Prism software.

Results

CR-6 Reduces Infarct Volume and Ameliorates the Neurological Score after Transient but not Permanent Ischemia

In the 90-min ischemia group, administration of the antioxidant agent CR-6 twice, at 2 h and 8 h after the onset of MCA occlusion, reduced infarct volume ($P < 0.05$) (Figure 1A) and ameliorated ($P < 0.05$) the neurological score at 24 h (Figure 1B) as compared with that in rats receiving the vehicle. Infarct volume (mean \pm s.d.) was 75.3 \pm 40.8 mm³ ($n = 15$) in the CR-6-treated group versus 141.1 \pm 64.2 mm³ ($n = 23$) in the vehicle-treated group. Neurological score (mean \pm s.d.) was 3.4 \pm 1.7 points ($n = 15$) in the CR-6-treated group versus 4.8 \pm 1.8 ($n = 23$) in the vehicle-treated group. CR-6 protected the cortex and the striatum (Figures 1C and 1D). There were no statistical differences between the groups regarding the physiological parameters measured during surgery (Supplementary Table 1). In this experiment,

mortality was 14% in the vehicle-treated group and 8% in the CR-6-treated group.

Ninety-minute transient ischemia was induced in an additional group of rats to examine whether the beneficial effect of CR-6 persisted for a longer time period. Rats received CR-6 or vehicle, as above, and were killed at 7 days. Only one rat in this experiment died and it belonged to the CR-6-treated group. There were no differences between the groups regarding the physiological parameters measured during surgery (Supplementary Table 2). Infarct volume (mean \pm s.d.) at 7 days in the CR-6-treated group (69.6 \pm 43.3 mm³, $n = 9$) was smaller ($P < 0.03$) than that in the vehicle-treated group (115.1 \pm 41.9 mm³, $n = 11$) (Figure 1E). Likewise, CR-6 attenuated the neurological deficit (2.3 \pm 0.8 points, $n = 9$) in relation to the vehicle (3.6 \pm 1.2 points, $n = 11$) at 7 days (Figure 1F). Therefore, the benefit of CR-6 in transient ischemia that was found at 24 h was maintained at 7 days.

However, this CR-6 treatment regime was not protective in a model of permanent ischemia, as it neither reduced infarct volume ($P = 0.94$) (Figure 1G) nor ameliorated the neurological score ($P = 0.21$) (Figure 1H), at 24 h. Mortality after permanent ischemia was 11% in the vehicle-treated group, whereas none of the rats of the CR-6-treated group died within the first 24 h. Comparison of the extent of brain damage in the vehicle-treated group depending on whether the MCA was transiently (90 mins) or permanently occluded, showed that infarct volume (mean \pm s.d.) was smaller ($P < 0.001$) after transient (141.1 \pm 64.2 mm³) than after permanent (291.5 \pm 66.3 mm³) ischemia at 24 h. Also, neurological function was less affected ($P < 0.05$) after transient (4.8 \pm 1.8 points) than after permanent (6.3 \pm 1.9 points) ischemia. Likewise, in rats treated with CR-6, infarct volume (mean \pm s.d.) was significantly ($P < 0.001$) larger after permanent (294.4 \pm 79.4 mm³) than after transient (75.3 \pm 40.8 mm³) ischemia, and neurological score (mean \pm s.d.) was worst ($P < 0.05$) after permanent (5.3 \pm 1.1 points) than after transient (3.4 \pm 1.7 points) ischemia.

One single administration of CR-6 at 30 mins after reperfusion was not sufficient to induce protection in the transient ischemia group, as it did not significantly ($P = 0.70$) reduce infarct volume (141 \pm 82 mm³ ($n = 9$) in controls versus 123 \pm 72 mm³ ($n = 8$) in the CR-6-treated group) and did not ameliorate ($P = 0.70$) the neurological score either (4.8 \pm 2.2 ($n = 9$) points in controls versus 4.4 \pm 1.3 points ($n = 8$) in the CR-6-treated group) at 24 h. This suggests that a prolonged antioxidant action might be necessary to neutralize the effects of reperfusion.

Consumption of Endogenous Glutathione is Attenuated in the Animals Treated with CR-6

The concentration of total (GSx) and oxidized (GSSG) glutathione was measured in the ipsilateral

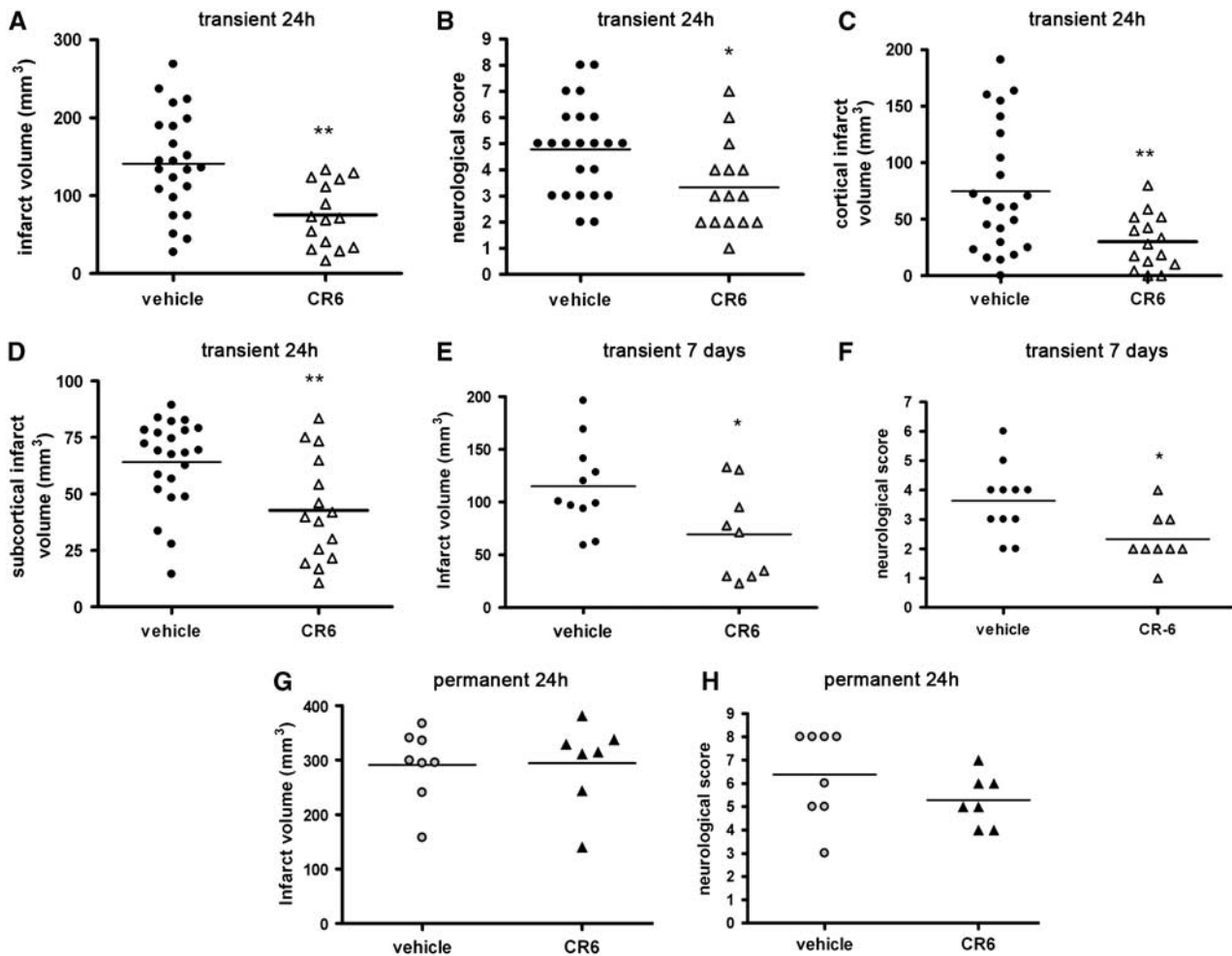


Figure 1 Effect of CR-6 after transient and permanent ischemia. Rats received the vehicle or CR-6 twice, that is, at 2 and at 6 h after the onset of ischemia. Animals were examined at 24 h (A–D, G–H) or 7 days (E–F). (A–F) Ninety-minute MCA occlusion and (G–H) permanent MCA occlusion. (A) CR-6 ($n = 15$) reduces infarct volume and (B) attenuates the neurological deficit as compared with the vehicle ($n = 23$). (C–D) The effect of CR-6 is apparent in the cortical (C) and subcortical (D) regions. (E–F) Animals were studied 7 days after 90-min MCAO. The beneficial effect of CR-6 ($n = 9$) versus vehicle ($n = 11$) on infarct volume (E) and neurological score (F) was also observed at 7 days. (G–H) Rats received vehicle or CR-6 starting 2 h after permanent MCAO. CR-6 ($n = 7$) is not protective against permanent ischemia as it does not reduce infarct volume (G) or ameliorate the neurological deficit (H) at 24 h, as compared with the vehicle ($n = 8$). * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$.

and contralateral cortex and striatum 24 h after ischemia in rats treated with either vehicle or CR-6 (two doses), and reduced glutathione (GSH) content was calculated from the previous measurements (see section Materials and methods). At 24 h after transient ischemia, the concentration of GSH significantly decreased in the ipsilateral cortex ($P < 0.05$) (Figure 2A) and striatum ($P < 0.001$) (Figure 2B) of rats receiving the vehicle. This effect was attenuated by CR-6 treatment, as the GSH content in this group was not significantly different from that of the controls (Figures 2A and 2B). A negative relationship was found between cortical GSH content and infarct volume (Figure 2C), suggesting that the extent of GSH consumption was indicative of the magnitude of tissue damage after ischemia/reperfusion.

CR-6 Attenuates Oxidative Stress in the Isolated MCA

To test whether CR-6 might have an effect on blood vessels, we isolated the MCA of sham-operated and ischemic rats treated with either CR-6 (two doses) or the vehicle. Compared with sham-operated rats, transient ischemia induced a positive DHE reaction ($P < 0.01$) that was detected in the three layers of the MCA vascular wall of the vehicle group. CR-6 strongly attenuated this DHE reaction ($P < 0.01$) (Figures 2C and 2D). To verify the involvement of superoxide anions in this effect, we used the permeable superoxide scavenger, PEG-SOD, which strongly diminished DHE fluorescence in all the groups (Figures 2C and 2D).

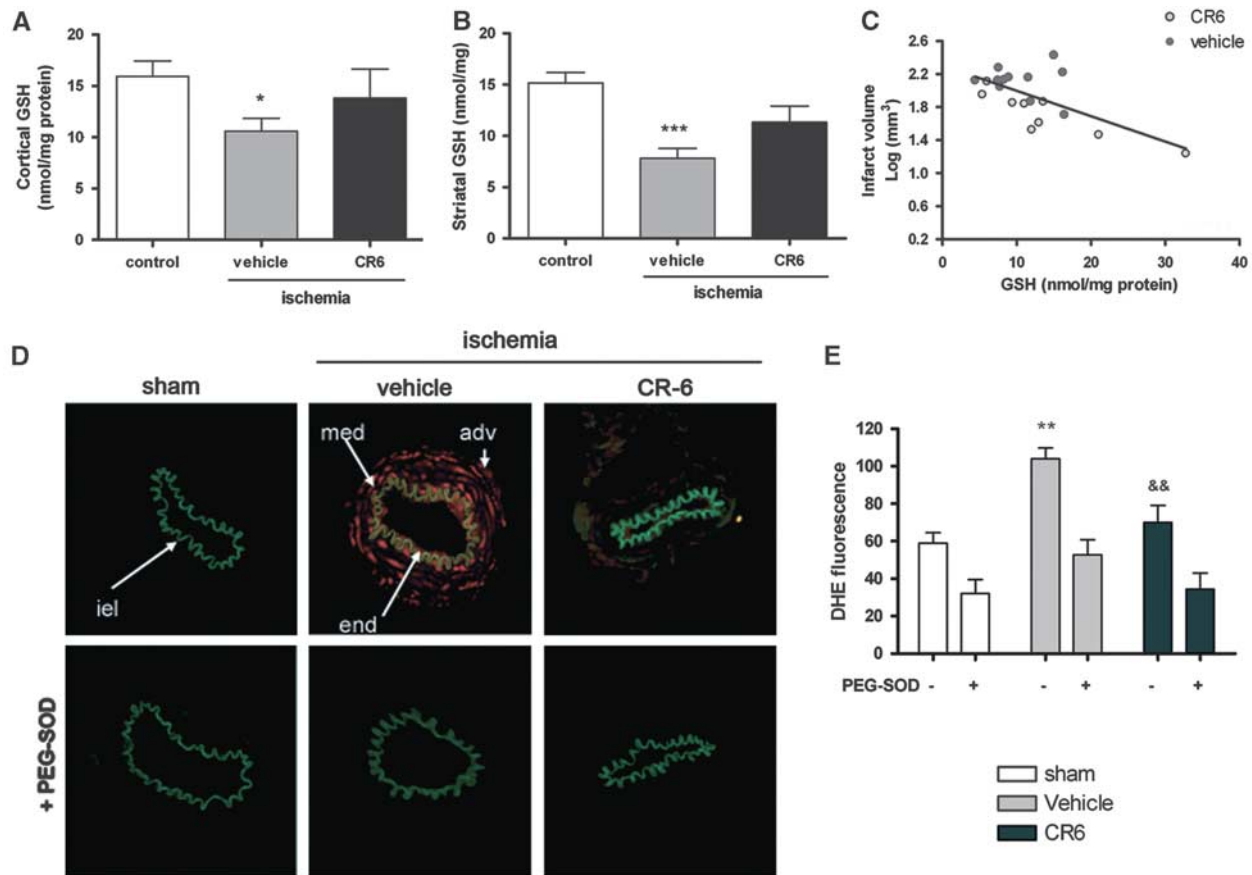


Figure 2 CR-6 attenuates oxidative stress in brain tissue and in the isolated MCA. **(A–C)** Brain tissue and **(D–E)** isolated MCA. **(A)** GSH was measured in the ipsilateral cortex 24 h after ischemia in rats administered the vehicle ($n = 11$) or CR-6 ($n = 9$). The contralateral cortex was used as the control ($n = 20$). **(B)** GSH was measured in the ipsilateral striatum 24 h after ischemia in rats administered the vehicle ($n = 12$) or CR-6 ($n = 15$). The contralateral striatum was used as control ($n = 27$). CR-6 attenuates the reduction of GSH induced by ischemia. **(C)** A significant ($P < 0.005$) negative correlation between infarct volume (expressed as log (10) of mm^3) and cortical GSH content is apparent, suggesting that the reduction in GSH content was indicative of tissue damage. * $P < 0.05$ and *** $P < 0.001$ versus control. **(D)** Representative fluorescence photomicrographs and **(E)** quantification of confocal-microscopic sections of the MCA from sham-operated, ischemic-vehicle-, and ischemic-CR-6-treated rats in the absence or presence of pegylated superoxide dismutase (PEG-SOD, 500 U/mL). Vessels were labeled with the oxidative dye hydroethidine, which produces red fluorescence when oxidized to DHE bromide by superoxide anion. **(D)** Ischemia increases DHE fluorescence and this effect is strongly attenuated in rats treated with CR-6. By scavenging superoxide radicals, PEG-SOD inhibits the increase of DHE fluorescence. adv, adventitial layer; end, endothelial layer; med, media layer; iel, internal elastic lamina ($n = 5$ to 7 per group). Image size, $256 \times 256 \mu\text{m}$. **(E)** The y -axis represents arbitrary fluorescence units. Two-way analysis of variance by treatment and by presence or absence of PEG-SOD followed by *post hoc* Bonferroni's test shows significant increase of fluorescence in ischemic vehicle-treated as compared with sham-operated rats (** $P < 0.01$), and reduction in CR-6 as compared with the vehicle (&& $P < 0.01$). PEG-SOD reduces DHE intensity in all the groups.

Relation of Reactive Hyperemia after Transient Ischemia and Infarct Volume

In exploratory analyses of cortical CBF, we observed that immediately after reperfusion (before any treatment) blood flow values returned to baseline levels in several rats, whereas other rats showed values well above basal (see example in Supplementary Figure 1). To find out whether this effect was related to the outcome of ischemia, we first analyzed data from rats that received the vehicle. Reactive hyperemia at the time of reperfusion tended to correspond with larger infarct volumes, suggesting that increases of blood flow above basal levels

(hyperemia) at the time of reperfusion were associated to larger infarct volumes. A significant positive correlation was found between flow at reperfusion and infarct volume ($P < 0.05$) (Figure 3A), suggesting that, at reperfusion, high increases of blood flow were associated to larger infarct volumes. This phenomenon was not attributable to the degree of blood flow reduction during ischemia, as blood flow at occlusion was not significantly correlated to blood flow at reperfusion or to infarct volumes (Supplementary Figure 2). Therefore, under these experimental conditions, the occurrence and magnitude of hyperemia was not strictly attributable to the measured CBF reduction during ischemia. However, we cannot discard that

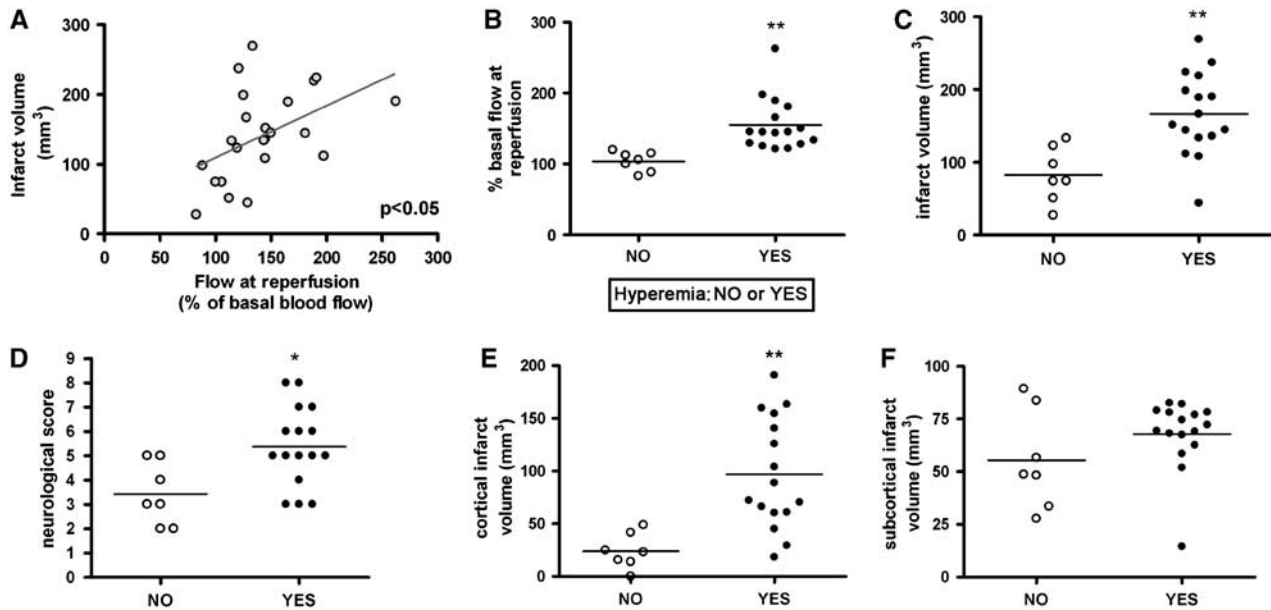


Figure 3 CBF at reperfusion influences tissue outcome. Only rats subjected to ischemia/reperfusion and receiving the vehicle are shown in this figure ($n = 23$). **(A)** Infarct volume (mm^3) is positively correlated to cortical CBF at reperfusion. CBF values are expressed as percent of basal CBF level. Points represent individual rats. **(B)** Animals were separated according to whether at reperfusion they had a cortical CBF similar ($\pm 20\%$) to their basal CBF, that is, they did not develop hyperemia (No) ($n = 7$), or they had a cortical CBF level higher than their corresponding baseline (above 20%), that is, they developed hyperemia (Yes) ($n = 16$). **(C)** Infarct volume was larger **(D)** and neurological function was worse in the hyperemic group. **(E)** Cortical infarct volume was larger in hyperemic than in non-hyperemic rats, whereas subcortical infarct volume **(F)** was not significantly affected by hyperemia; $*P < 0.05$, $**P < 0.01$.

it might be related to higher reductions of CBF in the core during ischemia, as our CBF measurement was taken in a peripheral location.

Values of cortical blood flow immediately after reperfusion (first 15 mins) that recovered to their corresponding baseline pre-ischemia values ($\pm 20\%$) were considered as similar to basal, whereas increases of cortical blood flow above 20% of basal values were considered as hyper-perfusion and were considered a sign of reactive hyperemia. According to this criterion rats were divided in two groups, which were termed hyperemic (Yes) and non-hyperemic (No) (Figure 3B). The mean \pm s.d. percent blood flow value during ischemia in the group of rats with hyperemia ($44.1 \pm 15.7\%$ of basal flow) was not significantly different from that in non-hyperemic rats ($48.4 \pm 12.9\%$ of basal flow). Then, infarct volumes were compared as a function of the presence or absence of reactive hyperemia. Infarct volume (mean \pm s.d.) was larger ($P < 0.01$) in the group of rats showing hyperemia ($166.6 \pm 56.6 \text{ mm}^3$) than in the group without hyperemia ($82.9 \pm 37.8 \text{ mm}^3$) (Figure 3C). Likewise, neurological score (mean \pm s.d.) was worst ($P < 0.05$) in hyperemic (5.4 ± 1.6 points) than in non-hyperemic (3.4 ± 1.3 points) rats (Figure 3D).

Examination of the size of infarction in cortical and subcortical regions showed that cortical infarction (mean \pm s.d.) was larger ($P < 0.01$) in the hyperemic ($97.0 \pm 52.8 \text{ mm}^3$) that in the non-hyperemic

($24.0 \pm 16.7 \text{ mm}^3$) group (Figure 3E). In contrast, no significant differences in infarct volume (mean \pm s.d.) were found in the striatum between the group with cortical hyperemia ($67.8 \pm 16.7 \text{ mm}^3$) and that without cortical hyperemia ($55.4 \pm 23.4 \text{ mm}^3$) (Figure 3F). This might be expected since hyperemia here refers to cortical hyper-perfusion, that is, the laser-Doppler probe measured cortical blood flow, but we had no information on subcortical flow. These results suggest that cortical hyperemia at reperfusion was a predictor of exacerbated cortical damage, and therefore it might be a marker of reperfusion injury affecting the cerebral cortex.

CR-6 is Protective in Animals Showing Reactive Hyperemia after Reperfusion

Treatment (two doses of CR-6 or vehicle) was initiated 30 mins after reperfusion, whereas blood flow was studied prior to administration of treatment. Animals were randomly allocated to a given treatment regardless of whether they developed hyperemia or not, as hyperemia was only identified *a posteriori* after calculation of the blood flow registry. In the group of animals used to study infarct volume, the incidence of reactive hyperemia was 60% . However, hyperemia was not distributed evenly between the two treatment groups, as hyperemia was retrospectively found in 70% of the rats

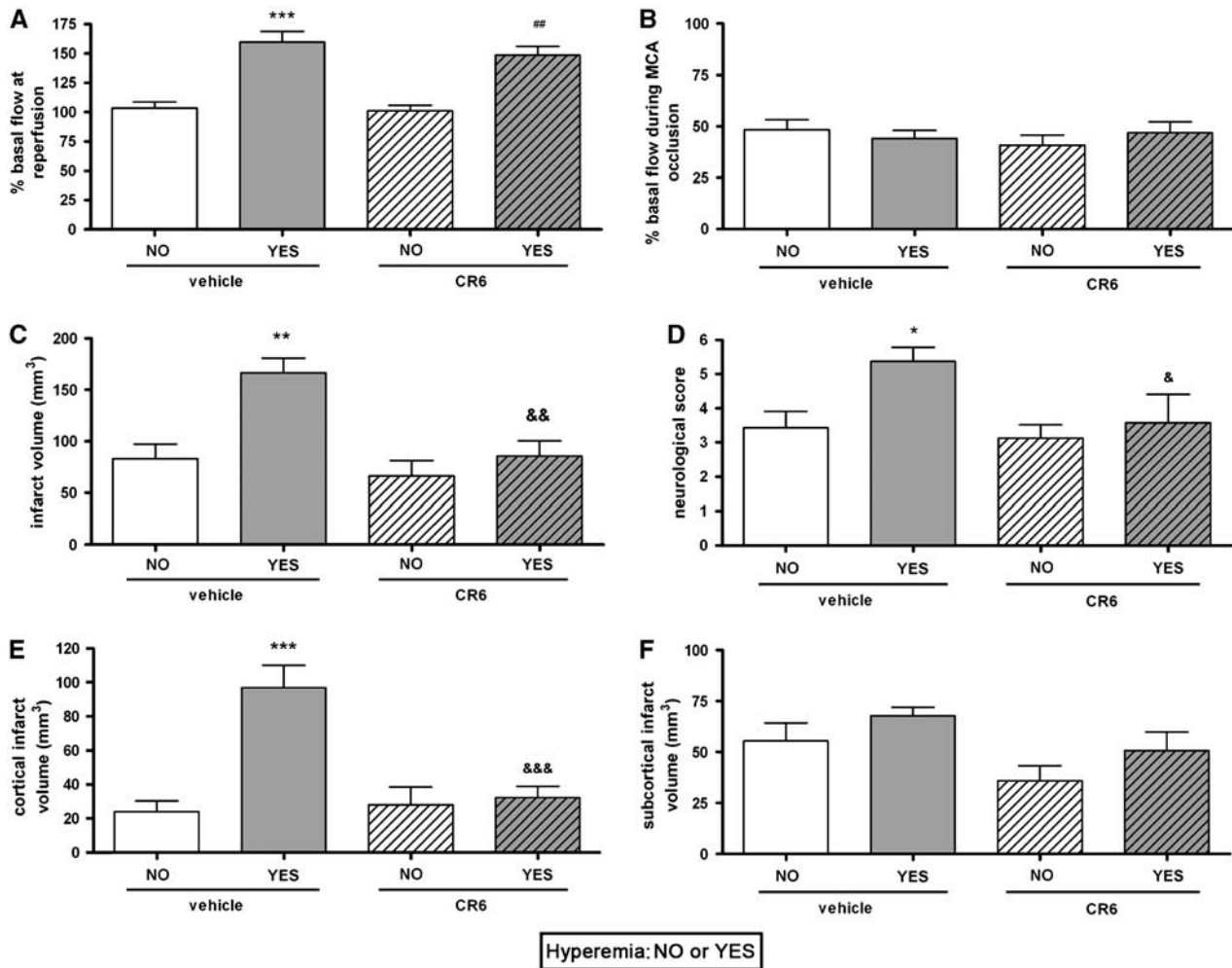


Figure 4 CR-6 protects hyperemic rats. In each treatment group, rats are separated according to whether they developed cortical hyperemia at reperfusion (Yes) or they did not (No). In the vehicle group, 7 rats did not develop hyperemia, whereas 16 rats did. In the CR-6 group, 8 rats did not develop hyperemia, whereas 7 rats did. (A) The extent of blood flow increase at reperfusion is similar in the hyperemic groups that received the vehicle or CR-6. (B) In spite of differences in blood flow at reperfusion, the blood flow value during ischemia is similar in all the groups. (C) Infarct volume is larger in the vehicle-treated group with hyperemia than in the vehicle-treated group without hyperemia, but this effect is not observed in the CR-6 treated rats. The hyperemic rats treated with CR-6 show infarct volumes significantly smaller than the hyperemic rats receiving the vehicle. (D) In the vehicle-treated group, the neurological deficit is worse in hyperemic than in non-hyperemic rats, but there were no differences within the groups of rats treated with CR-6, which showed smaller infarct volume than hyperemic rats of the vehicle group. (E) CR-6 protects the cortex of hyperemic rats better than subcortical regions (F); * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ versus vehicle No; *** $P < 0.01$ versus CR-6 No; & $P < 0.05$, && $P < 0.01$, &&& $P < 0.001$ versus vehicle Yes.

allocated to the vehicle-treated group (16 out of 23 rats), whereas only 47% of rats in the CR-6-treated group (7 out of 15) developed hyperemia. This might be a confounding factor in neuroprotection studies, as hyperemic rats showed larger infarct volumes than non-hyperemic rats (see the last section). Therefore, we took into account the factor hyperemia Yes or No in the comparisons between animals receiving the vehicle or CR-6.

The magnitude of increase in cortical perfusion in hyperemic rats was similar in the vehicle-treated and CR-6-treated groups (Figure 4A), and the extent of blood flow reduction during ischemia was similar in all the groups (vehicle and CR-6, either hyperemic

or non-hyperemic) (Figure 4B). As shown above, hyperemic animals had larger infarct volume than non-hyperemic animals in the vehicle-treated group (Figure 4C). However in CR-6-treated rats, infarct volume (mean \pm s.d.) in hyperemic rats (85.7 ± 39.2 mm³) was similar to that in non-hyperemic rats (73.8 ± 40.6 mm³) (Figure 4C). Furthermore, hyperemic rats treated with CR-6 showed reduced infarct volume ($P < 0.01$) as compared with hyperemic rats receiving the vehicle (Figure 4C), whereas no statistical differences were found for non-hyperemic rats (Figure 4C). Similar results were found for the neurological score, as hyperemic rats treated with CR-6 performed better than those receiving

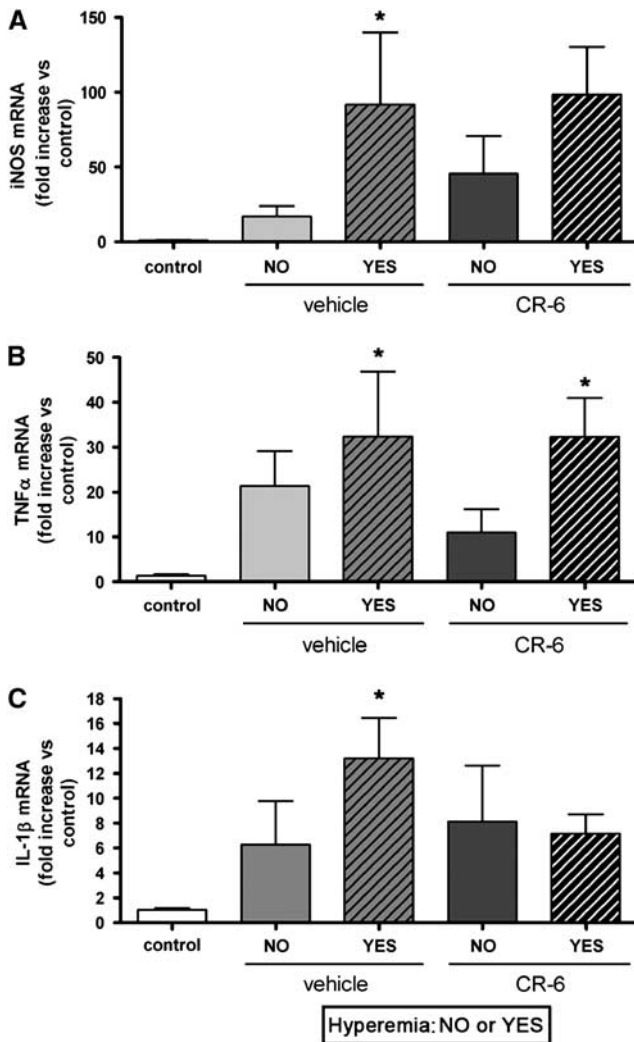


Figure 5 Expression of iNOS, TNF- α , and IL-1 β mRNA. Expression of the mRNA of proinflammatory molecules was studied at 6 h after reperfusion. Hyperemic rats showed higher ($P < 0.05$) expression of iNOS (A), TNF- α (B), and IL-1 β (C) mRNA than the controls. CR-6 does not reduce the expression of iNOS and TNF- α mRNA, but it tends to attenuate IL-1 β mRNA induction ($P = 0.087$) in hyperemic rats. Values are expressed as fold increase versus control and are the mean \pm s.e.m. of n rats per group. Control: $n = 3$; vehicle-treated, non-hyperemic (No): $n = 6$; vehicle-treated, hyperemic (Yes): $n = 4$; CR-6-treated, non-hyperemic (No): $n = 4$; and CR-6-treated, hyperemic (Yes): $n = 7$.

the vehicle, whereas there were no significant differences in the score between hyperemic and non-hyperemic rats treated with CR-6, or between non-hyperemic rats receiving either vehicle or CR-6 (Figure 4D). CR-6 protected more the cortex than the striatum (Figures 4E and 4F). These results show that CR-6 was more beneficial in hyperemic than in non-hyperemic rats, suggesting that this antioxidant was more effective under conditions with signs of reperfusion injury as seen in the cortex in this experimental model.

Effect of Hyperemia and CR-6 on the Expression of mRNA of Proinflammatory Molecules

Expression of iNOS, TNF- α , and IL-1 β mRNA at 6 h after reperfusion was significantly increased ($P < 0.05$) in rats showing the hyperemic response as compared to the controls, but not so in the non-hyperemic groups (Figures 5A–5C). CR-6 did not reduce the expression of iNOS and TNF- α mRNA, but showed a tendency ($P = 0.087$) to reduce the expression of IL-1 β mRNA in hyperemic rats (Figures 5A–5C).

CR-6 Attenuates Alterations in BBB Permeability

Alterations in BBB permeability were assessed by Evans Blue technique at 6 h after the onset of reperfusion. In this group of animals we measured the physiological parameters of the rats during surgery and immediately after surgery, and the results for both treatment groups were similar (Supplementary Table 1). Rats with cortical hyperemia at reperfusion had more ($P < 0.01$) Evans Blue extravasation in the cortex than non-hyperemic animals, which did not show signs of BBB alteration (Figure 6A). In the former animals, treatment with CR-6 attenuated alterations of BBB permeability in the cortex. In subcortical regions, no significant differences were observed between rats showing cortical hyperemia and rats that did not develop hyperemia, and CR-6 did not significantly reduce the tissue Evans Blue content (not shown).

In agreement with the previous finding, cortical brain edema was highly increased ($P < 0.05$) at 24 h in hyperemic rats as compared with non-hyperemic rats of the vehicle-treated group (Figure 6B), and CR-6 tended to attenuate ($P = 0.06$) this effect (Figure 6B).

Ischemia Induces Protein Nitrotyrosination in Hyperemic Rats and CR-6 Reduces it

Certain reactive oxygen species (superoxide) can react with NO to produce peroxynitrite, a highly reactive anion that causes protein nitrotyrosination (Beckman *et al*, 1990). This is an irreversible process that can alter the function of proteins. We examined protein nitrotyrosination after ischemia as an indicator of peroxynitrite production and the action of CR-6 on this process, as CR-6 has the capacity to scavenge reactive nitrogen species (Montoliu *et al*, 1999). A significant increase in protein nitrotyrosination was detected 24 h after ischemia/reperfusion as compared with the controls ($P < 0.05$) in hyperemic animals only, and CR-6 attenuated this effect ($P < 0.05$) (Figures 6C and 6D).

CR-6 Decreases the Expression of COX-2 Induced by Ischemia

Ischemia induced the expression of COX-2 protein at 24 h (Figure 7A), and this effect was strongly

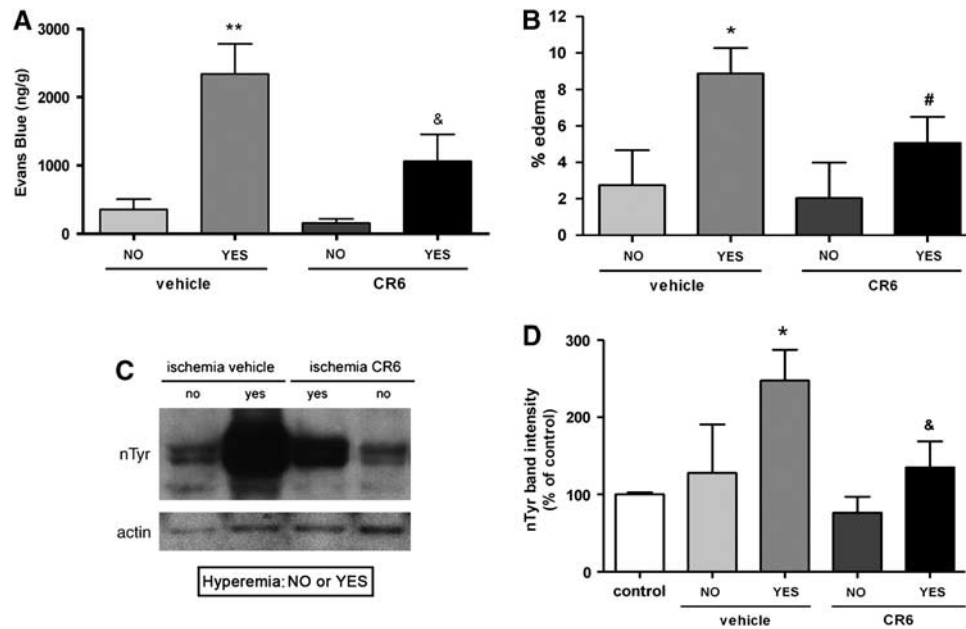


Figure 6 BBB breakdown, edema, and protein nitrotyrosination are exacerbated in the cortex of hyperemic animals and these effects are attenuated by CR-6. **(A)** Evans Blue extravasation in the cortex was measured to assess the alteration of BBB permeability 6 h after reperfusion. **(A)** In the vehicle-treated group, ischemia increases the tissue content of Evans Blue in rats showing cortical hyperemia (Yes) ($n = 4$), but not in non-hyperemic rats (No) ($n = 6$). CR-6 attenuates Evans Blue extravasation in the hyperemic group ($n = 6$), whereas non-hyperemic rats treated with CR-6 ($n = 3$) show no signs of BBB alteration. $**P < 0.01$ versus vehicle-treated non-hyperemic (No); $\& P < 0.05$ versus vehicle-treated hyperemic (Yes). **(B)** The estimated volume of cortical edema increases ($*P < 0.05$) in hyperemic (Yes, $n = 13$) as compared with non-hyperemic rats (No, $n = 5$) of the vehicle group. CR-6 tends to attenuate this increase ($\#P = 0.06$) in hyperemic rats (Yes, $n = 8$), whereas in non-hyperemic rats ($n = 7$) CR-6 does not modify the value versus the corresponding vehicle group. **(C)** Protein nitrotyrosination (nTyr) is exacerbated in hyperemic rats of the vehicle-treated group, and this effect is reduced by CR-6. **(D)** Quantification of the nTyr band shown in panel **C** shows significant reduction by CR-6. Control: $n = 3$; vehicle-treated, non-hyperemic: $n = 2$; vehicle-treated, hyperemic: $n = 4$; CR-6-treated, non-hyperemic: $n = 3$; and CR-6-treated, hyperemic: $n = 5$; $*P < 0.05$ versus control; $\& P < 0.05$ versus vehicle-treated, hyperemic (Yes).

attenuated by CR-6 (two doses) (Figures 7A and 7B). COX-2 was mainly detected in neurons (Figure 7C) suggesting that oxidative/nitrosative stress was involved in triggering neuronal COX-2 induction and that the effect of CR-6 reached the neurons either directly or indirectly.

CR-6 Attenuates Neutrophil Accumulation after Ischemia

The expression of MPO in brain tissue was examined to assess the presence of neutrophils. After immunohistochemistry, the number of MPO+ cells was counted in different areas and the mean number of cells per area was calculated. Hyperemic rats tended to show higher numbers of neutrophils than non-hyperemic rats (Figure 7D). CR-6 (two doses) showed a tendency to attenuate the numbers of neutrophils in hyperemic rats (Figure 7D). By western blotting, lower MPO expression was observed in hyperemic rats treated with CR-6 than in rats receiving the vehicle (Figure 7E). Semi-quantification of western blotting band intensity confirmed the tendency of CR-6 to attenuate MPO expression (Figure 7F).

CR-6 in Plasma and Brain Tissue

In view of the above findings, we set up a technique for detection of CR-6 in biological samples to find out whether CR-6 enters the brain after oral administration. Blood samples were withdrawn at several time points ranging from 15 mins to 4 h after CR-6 administration. A group of animals was killed at 15 mins ($n = 4$) and another group was killed at 4 h ($n = 3$). Rats were anesthetized and perfused through the heart with saline to remove blood from brain tissue. CR-6 was detected in plasma and brain samples by HPLC with fluorimetric detection (Figure 8A). CR-6 showed a peak in plasma between 15 and 30 mins (Figure 8B), and levels were highly reduced from 1 h onwards. The mean \pm s.e.m. CR-6 plasma concentration at 15 mins was 359 ± 162 ng/mL. CR-6 was also detected in brain tissue at 15 mins but not at 4 h (Figure 8B). At 15 mins, brain CR-6 concentration (ng/g of tissue) was four-fold higher (Figure 8B) than that in plasma (ng/mL) in all the samples, and no differences in CR-6 concentration were observed between the contralateral ($1,384 \pm 618$ ng/g) and ipsilateral ($1,259 \pm 574$ ng/g) hemispheres in ischemic rats

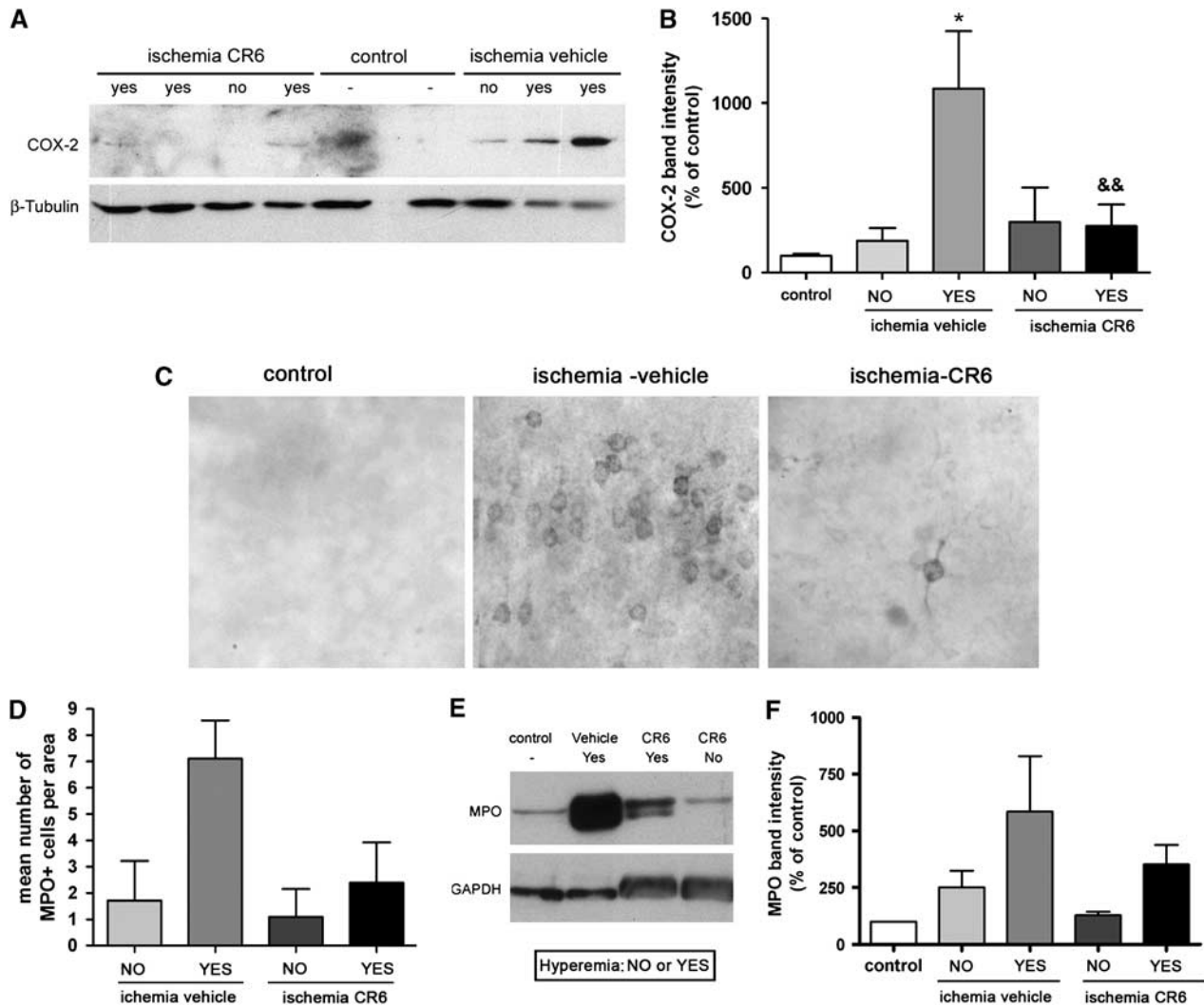


Figure 7 Expression of COX-2 and MPO. **(A)** Ischemia induces COX-2 expression and this effect is more pronounced in hyperemic (Yes) ($n = 4$) than in non-hyperemic (No) ($n = 9$) rats in the vehicle group, as shown by western blotting. COX-2 expression is low in both hyperemic ($n = 8$) and non-hyperemic ($n = 7$) rats treated with CR-6. β -Tubulin is shown as loading control. **(B)** Quantification of band intensity (expressed as percentage of control) shows significant ($*P < 0.05$) increase in hyperemic rats of the vehicle group as compared with the controls ($n = 7$). The increase is not apparent in non-hyperemic rats. CR-6 significantly attenuates COX-2 expression in hyperemic as compared with hyperemic rats receiving the vehicle ($\&\& P < 0.01$). **(C)** Immunohistochemistry shows neuronal expression of COX-2 after ischemia and attenuation of COX-2 after CR-6 treatment. **(D)** The mean number of MPO-positive neutrophils tends to be higher in the hyperemic rats. CR-6 tends to reduce neutrophil numbers. Values are expressed as the mean \pm s.e.m. In the vehicle group, 2 rats were non-hyperemic (No) and 3 rats were hyperemic (Yes), whereas in the CR-6 group, 3 rats were non-hyperemic (No) and 2 rats were hyperemic (Yes). **(E, F)** Western blotting shows a tendency to increase the MPO band intensity after ischemia in the vehicle-treated hyperemic as compared with the vehicle-treated non-hyperemic group, and attenuation of this effect by CR-6. Control: $n = 3$; vehicle-treated, non-hyperemic: $n = 2$; vehicle-treated, hyperemic: $n = 6$; CR-6-treated, non-hyperemic: $n = 5$; CR-6-treated, hyperemic: $n = 4$.

($n = 3$), or between ischemic and non-ischemic animals. The brain/plasma ratio (mean \pm s.e.m.) at 15 mins was 4.2 ± 0.6 , indicating good delivery of CR-6 from blood to brain.

Discussion

CR-6 is a synthetic, structurally simpler, vitamin-E analogue that was previously used in a few studies in

cells and animals subjected to conditions involving oxidative stress (Montoliu *et al*, 1999; Sanvicens *et al*, 2006; Miranda *et al*, 2007). This work is the first to investigate the action of CR-6 in animal models of stroke. The results show that CR-6 enters the brain after oral administration and exerts a protective action against cerebral ischemia/reperfusion, but not against permanent ischemia. We noticed that signs of cortical reperfusion injury became apparent in certain, but not all, rats subjected to ischemia/

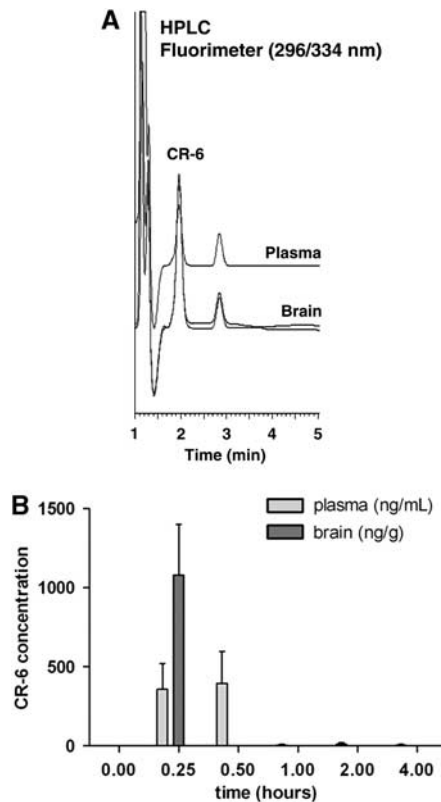


Figure 8 Detection of CR-6 in plasma and brain. CR-6 was extracted from plasma and brain, and the concentration was quantified by an HPLC method using fluorimetric detection. **(A)** CR-6 elutes from the column with a retention time of 2 mins. The detection limit of this method was 10 ng/mL. **(B)** No signal was detected in brain and plasma before CR-6 administration. The brain was studied at either 15 mins ($n = 4$) or 4 h ($n = 3$) after oral CR-6 administration. Plasma was studied at 15 mins, 30 mins, 1 h, 2 h, and 4 h after administration. The highest plasma CR-6 concentration is found at 15 to 30 mins, whereas levels are very low from 1 h onwards. CR-6 is also detected in the brain at 15 mins but not at 4 h.

reperfusion. Rats with signs of reperfusion injury had a poorer outcome, and the beneficial effect of CR-6 was more powerful in this subpopulation of individuals. Indeed, after continuous recording of cortical CBF, we evidenced that some of the rats had reactive hyperemia immediately after reperfusion. These animals developed larger cortical infarcts and had worse neurological deficits than rats not showing hyperemia. On the basis of these findings, we can disclose that reactive hyperemia at early reperfusion is a sign of reperfusion injury. Nonetheless, we cannot exclude that other events associated to reactive hyperemia, such as the reported subsequent hypoperfusion (Traupe *et al*, 1982), were responsible for exacerbating ischemic damage. Solid lines of evidence support that hyperemia at the time of reperfusion is associated with worst brain injury (Tamura *et al*, 1980; Moskowitz *et al*, 1990; Macfarlane *et al*, 1991), and several studies showed that suppression of this effect was protective (Yamagami

et al, 1998; Kim *et al*, 2006). Reactive hyperemia is induced by dilation of brain blood vessels due to decreased vascular resistance during the period of ischemia (Gourley and Heistad, 1984). Neurogenic mechanisms seem to be involved in the development of post-ischemic hyperemia (Macfarlane *et al*, 1991). Also, a previous study showed that administration of the NOS inhibitor L-NAME prior to ischemia prevented reactive hyperemia (Humphreys and Koss, 1998), suggesting that NO was involved in this effect. NO can react with superoxide generated at reperfusion to form peroxynitrite (Beckman *et al*, 1990), a very reactive species that induces irreversible protein nitrotyrosination and can cause tissue damage. Here we found that protein nitrotyrosination after ischemia was exacerbated in hyperemic rats and that this effect was attenuated by CR-6, likely through scavenging NO and peroxynitrite (Montoliu *et al*, 1999). The reaction of CR-6 with active nitrogen species renders the 5-nitroderivative of CR-6 as the main by-product. CR-6 also inhibits lipid peroxidation (Casas *et al*, 1992; Yenes *et al*, 2004) and previous studies indicate that CR-6 acts on radical oxygen species by a mono-electron transfer through the homolytic break of the phenolic hydroxyl group (Yenes *et al*, 2004). All these properties of CR-6 might contribute to the observed benefit.

Hyper-perfusion at reperfusion is not a phenomenon occurring in rats only, as there is evidence that some patients can develop hyper-perfusion shortly after thrombolysis with rPA (Kidwell *et al*, 2001). Further investigation of the signs of reperfusion injury in reperfused patients would be necessary to find out whether this effect might be associated with poorer clinical outcome. Furthermore, our experimental study supports that, those individuals developing hyperemia at reperfusion are susceptible to respond better to antioxidant treatment, as a significant beneficial effect of CR-6 on the neurological score and infarct volume was precisely found in those animals, but not in animals not developing hyper-perfusion or in non-reperfused animals.

CR-6 attenuated the expression of COX-2 induced in neurons by ischemia/reperfusion, thus suggesting that oxidative/nitrosative stress underlies the induction of COX-2 under this condition and that CR-6 treatment directly or indirectly affected the neurons. Several lines of evidence support that COX-2 exerts detrimental effects in transient brain ischemia, as deficient mice show less damage than wild-type animals (Iadecola *et al*, 2001). Also, COX-2 inhibition is protective (Doré *et al*, 2003; Candelario-Jalil *et al*, 2007) and it reduces BBB breakdown and leukocyte infiltration (Candelario-Jalil *et al*, 2007), whereas overexpression of COX-2 worsens the outcome of ischemia (Doré *et al*, 2003). The harmful effect of COX-2 after ischemia is attributed to the production of prostaglandin- E_2 rather than to generation of oxidative stress (Kunz *et al*, 2007). As COX-2 is also induced after very short episodes of ischemia causing no major brain damage (Planas

et al, 1999), it is possible that the biochemical cascade activated by COX-2 needs interaction with other signals generated after severe ischemia to exert detrimental effects.

We investigated whether there were signs of oxidative stress in the MCA isolated from our animals. Generation of superoxide radicals was detected in the MCA after ischemia/reperfusion in rats receiving the vehicle. This effect was prevented in animals treated with CR-6. As this compound also attenuated ischemia-induced BBB dysfunction, it is feasible that CR-6 had some advantageous effect on the vasculature. Thus, the results support a beneficial vascular effect of CR-6, which may contribute to the protection observed in the ischemic brain tissue.

Taken together, these findings show that the antioxidant CR-6 reaches the rat brain tissue after oral administration and is protective after ischemia/reperfusion; protection is better manifested in a subgroup of animals that develop hyperemia at the time of reperfusion; brain damage is exacerbated in these animals as compared with that in animals not showing hyperemia; and CR-6 confers benefits at the interface between blood and brain by preventing generation of oxidative stress in the vessels and by attenuating BBB breakdown. The results also evidence that reperfusion injury may selectively develop in certain individuals, which would be the target of specific antioxidant drugs. This finding suggests that signs of reperfusion injury should be better investigated in reperfused stroke patients. In conclusion, this experimental study supports further exploration of the use of CR-6 for the treatment of stroke to attenuate possible negative effects associated with reperfusion.

Acknowledgements

We thank Ms Noelia Montoya and Mr Luca Maggioni for excellent technical assistance.

Disclosure/conflict of Interest

FJPA is a postdoctoral fellow of the 'Juan de la Cierva' program. The remaining authors declare no conflict of interest.

References

Aronowski J, Strong R, Grotta JC (1997) Reperfusion injury: demonstration of brain damage produced by reperfusion alter transient focal ischemia in rats. *J Cereb Blood Flow Metab* 17:1048–56

Baker MA, Cerniglia GJ, Zaman A (1990) Microtiter plate assay for the measurement of glutathione and glutathione disulfide in large numbers of biological samples. *Anal Biochem* 190:360–5

Beckman JS, Beckman TW, Chen J, Marshall PA, Freeman BA (1990) Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc Natl Acad Sci USA* 87:1620–4

Candelario-Jalil E, González-Falcón A, García-Cabrera M, León OS, Fiebich BL (2007) Post-ischaemic treatment with the cyclooxygenase-2 inhibitor nimesulide reduces blood-brain barrier disruption and leukocyte infiltration following transient focal cerebral ischaemia in rats. *J Neurochem* 100:1108–20

Casas J, Gorchs G, Sánchez-Baeza F, Teixidor P, Messegue A (1992) Inhibition of rat liver microsomal lipid peroxidation elicited by simple 2,2-dimethylchromenes and chromans structurally related to precocenes. *J Agric Food Chem* 40:585–90

Chan PH (1996) Role of oxidants in ischemic brain damage. *Stroke* 27:1124–9

Chong ZZ, Xu QP, Sun JN (2001) Effects and mechanism of triacetylshikimic acid on platelet adhesion to neutrophil induced by thrombin and reperfusion after focal cerebral ischemia in rats. *Acta Pharmacol Sin* 22:679–84

D'Ambrosio AL, Pinsky DJ, Connolly ES (2001) The role of the complement cascade in ischemia/reperfusion injury: implications for neuroprotection. *Mol Med* 7:367–82

del Zoppo GJ, Mabuchi T (2003) Cerebral microvessel responses to focal ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 23:879–94

del Zoppo GJ, Schmid-Schonbein GW, Mori E, Copeland BR, Chang CM (1991) Polymorphonuclear leukocytes occlude capillaries following middle cerebral artery occlusion and reperfusion in baboons. *Stroke* 22:1276–1283

Dietrich WD (1994) Morphological manifestations of reperfusion injury in brain. *Ann N Y Acad Sci* 723:15–24

Doré S, Otsuka T, Mito T, Sugo N, Hand T, Wu L, Hurn PD, Traystman RJ, Andreasson K (2003) Neuronal overexpression of cyclooxygenase-2 increases cerebral infarction. *Ann Neurol* 54:155–62

Gourley JK, Heistad DD (1984) Characteristics of reactive hyperemia in the cerebral circulation. *Am J Physiol* 246(1 Pt 2):H52–8

Humphreys SA, Koss MC (1998) Role of nitric oxide in post-ischemic cerebral hyperemia in anesthetized rats. *Eur J Pharmacol* 347:223–9

Iadecola C, Niwa K, Nogawa S, Zhao X, Nagayama M, Araki E, Morham S, Ross ME (2001) Reduced susceptibility to ischemic brain injury and N-methyl-D-aspartate-mediated neurotoxicity in cyclooxygenase-2-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:1294–9

Jiménez-Altayó F, Briones AM, Giraldo J, Planas AM, Salaces M, Vila E (2006) Increased superoxide anion production by interleukin-1 β impairs nitric oxide-mediated relaxation in resistance arteries. *J Pharmacol Exp Ther* 316:42–52

Jiménez-Altayó F, Martín A, Rojas S, Justicia C, Briones AM, Giraldo J, Planas AM, Vila E (2007) Transient middle cerebral artery occlusion causes different structural, mechanical, and myogenic alterations in normotensive and hypertensive rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 293:H628–35

Justicia C, Martín A, Rojas S, Gironella M, Cervera A, Panés J, Chamorro A, Planas AM (2006) Anti-VCAM-1 antibodies did not protect against ischemic damage neither in rats nor in mice. *J Cereb Blood Flow Metab* 26:321–32

- Kidwell CS, Saver JL, Mattiello J, Starkman S, Vinuela F, Duckwiler G, Gobin YP, Jahan R, Vespa P, Villablanca JP, Liebeskind DS, Woods RP, Alger JR (2001) Diffusion-perfusion MRI characterization of post recanalization hyperperfusion in humans. *Neurology* 57:2015–21
- Kim DJ, Kim DI, Lee SK, Suh SH, Lee YJ, Kim J, Chung TS, Lee JE (2006) Protective effect of agmatine on a reperfusion model after transient cerebral ischemia: temporal evolution on perfusion MR imaging and histopathologic findings. *AJNR Am J Neuroradiol* 27:780–5
- Kunz A, Anrather J, Zhou P, Orio M, Iadecola C (2007) Cyclooxygenase-2 does not contribute to postischemic production of reactive oxygen species. *J Cereb Blood Flow Metab* 27:545–51
- Kutala VK, Khan M, Angelos MG, Kuppusamy P (2007) Role of oxygen in postischemic myocardial injury. *Antioxid Redox Signal* 9:1193–206
- 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
- Macfarlane R, Tasdemiroglu E, Moskowitz MA, Uemura Y, Wei EP, Kontos HA (1991) Chronic trigeminal ganglionectomy or topical capsaicin application to pial vessels attenuates postocclusive cortical hyperemia but does not influence postischemic hypoperfusion. *J Cereb Blood Flow Metab* 11:261–71
- Memezawa H, Smith ML, Siesjö BK (1992) Penumbra tissues salvaged by reperfusion following middle cerebral artery occlusion in rats. *Stroke* 23:552–9
- Miranda M, Muriach M, Almansa I, Arnal E, Messeguer A, Díaz-Llopis M, Romero FJ, Bosch-Morell F (2007) CR-6 protects glutathione peroxidase activity in experimental diabetes. *Free Radic Biol Med* 43:1494–8
- Montoliu C, Llansola M, Sáez R, Yenes S, Messeguer A, Felipo V (1999) Prevention of glutamate neurotoxicity in cultured neurons by 3,4-dihydro-6-hydroxy-7-methoxy-2,2-dimethyl-1(2H)-benzopyran (CR-6), a scavenger of nitric oxide. *Biochem Pharmacol* 58:255–61
- Moskowitz MA, Macfarlane R, Tasdemiroglu E, Wei EP, Kontos HA (1990) Neurogenic control of the cerebral circulation during global ischemia. *Stroke* 21(11 Suppl):III168–71
- Pan J, Konstas A-A, Bateman B, Ortolano GA, Pile-Spellman J (2007) Reperfusion injury following cerebral ischemia: pathophysiology, MR imaging, and potential therapies. *Neuroradiology* 49:93–102
- Planas AM, Soriano MA, Justicia C, Rodríguez-Farré E (1999) Induction of cyclooxygenase-2 after a mild episode of focal cerebral ischemia without tissue inflammation or neural cell damage. *Neuroscience Lett* 273:1–4
- Rogers DC, Campbell CA, Stretton JL, Mackay KB (1997) Correlation between motor impairment and infarct volume after permanent and transient middle cerebral artery occlusion in the rat. *Stroke* 28:2060–5
- Ruperez FJ, Mach M, Barbas C (2004) Direct liquid chromatography method for retinol, α - and γ -tocopherols in rat plasma. *J Chromatogr B* 800:225–30
- Sanvicens N, Gómez-Vicente V, Messeguer A, Cotter TG (2006) The radical scavenger CR-6 protects SH-SY5Y neuroblastoma cells from oxidative stress-induced apoptosis: effect on survival pathways. *J Neurochem* 98:735–47
- Tamura A, Asano T, Sano K (1980) Correlation between rCBF and histological changes following temporary middle cerebral artery occlusion. *Stroke* 11:487–93
- Tasdemiroglu E, Christenberry PD, Ardell JL, Chronister RB, Taylor AE (1994) Effects of antioxidants on the blood-brain barrier and postischemic hyperemia. *Acta Neurochir (Wien)* 131:302–9
- Todd NV, Picozzi P, Crockard HA (1986) Quantitative measurement of cerebral blood flow and cerebral blood volume alter cerebral ischaemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 6:338–41
- Traupe H, Kruse E, Heiss WD (1982) Reperfusion of focal ischemia of varying duration: postischemic hyper- and hypoperfusion. *Stroke* 13:615–22
- Tsuchida R, He QP, Smith ML, Siesjö BK (1997) Regional cerebral blood flow during and after 2 h of middle cerebral artery occlusion in the rat. *J Cereb Blood Flow Metab* 17:1066–73
- Yamagami S, Miyamoto O, Nakamura T, Okada Y, Negi T, Hayashida Y, Nagao S, Itano T (1998) Suppression of hyperemia after brain ischemia by L-threo-3,4-dihydroxyphenylserine. *Neuroreport* 9:2939–43
- Yang GY, Betz AL (1994) Reperfusion-induced injury to the blood-brain barrier after middle cerebral artery occlusion in rats. *Stroke* 25:1658–64
- Yenes S, Commandeur JN, Vermeulen NP, Messeguer A (2004) *In vitro* biotransformation of 3,4-dihydro-6-hydroxy-2,2-dimethyl-7-methoxy-1(2H)-benzopyran (CR-6), a potent lipid peroxidation inhibitor and nitric oxide scavenger, in rat liver microsomes. *Chem Res Toxicol* 17:904–13
- Zhang RL, Chopp M, Chen H, Garcia JH (1994) Temporal profile of ischemic tissue damage, neutrophil response, and vascular plugging following permanent and transient (2H) middle cerebral artery occlusion in the rat. *J Neurol Sci* 125:3–10

Supplementary Information accompanies the paper on the Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism website (<http://www.nature.com/jcbfm>)

Article 3

- Mannose-binding lectin promotes local microvascular thrombosis after transient brain ischemia in mice

de la Rosa X, Cervera A, Kristoffersen A, Valdés C, Varma HM, Justicia c, Durduran T, Chamorro A, Planas AM.

En preparació

ABSTRACT:

Diverses evidències donen suport a la idea que la *mannose-binding lectin* (MBL) està involucrada en el dany cerebral després d'isquèmia. La via de les lectines del sistema del complement, facilita l'activació de trombina i la formació de coàguls sota certes condicions experimentals. En aquest estudi hem examinat si la MBL promou la trombosi després d'isquèmia/reperfusió i influencia el curs i la prognosi de l'episodi isquèmic.

L'oclusió de l'artèria cerebral mitja (MCAO)/reperfusió es va realitzar en ratolins deficients (n=79) i wild-type (n=77) per MBL i es va seguir la lesió cerebral per MRI a dies 1 i 7. El flux sanguini cerebral regional relatiu (rCBF) es va monitoritzar 6 hores després de l'oclusió amb imatge de contrast laser-speckle. Es va analitzar la fibrina/fibrinògen en la vasculatura i en el plasma, i es van avaluar els efectes d'un inhibidor de trombina, argatroban, per tal de definir el paper de MBL en l'activació de trombina.

Els volums d'infart i el déficit neurològic van resultar similars en ratolins KO per MBL i en els animals salvatges. Els valors de rCBF durant l'oclusió i la reperfusió eren semblants en els dos grups, però disminuïen durant les següents sis hores només per al grup WT. A més, els ratolins salvatges mostraven més fibrina(ogen) en els vasos sanguinis i un millor pronòstic després del tractament amb argatroban. Per contra, l'argatroban no millorava l'evolució en ratolins KO per MBL.

La MBL promou el dany cerebral i funcional després d'isquèmia/reperfusió en ratolins. Aquests efectes són secundaris a la trombosi intravascular i al dany per reperfusió. L'argatroban protegeix els animals salvatges però no protegeix els animals KO, emfatitzant el paper de la MBL en la formació de coàguls locals en isquèmia/reperfusió.

ARTICLES

URL: <http://stroke-submit.aha-journals.org>

Title: Mannose-binding lectin promotes local microvascular thrombosis after transient brain ischemia in mice

Manuscript number: STROKE/2013/004111R1

Author(s): Xavier de la Rosa

Alvaro Cervera

Anna Kristoffersen

Claudia Valdés

Hari Varma

Carles Justicia

Turgut Durduran

Angel Chamorro

Anna Planas

**Mannose-binding lectin promotes local microvascular thrombosis after transient
brain ischemia in mice**

Xavier de la Rosa, Ms¹; Alvaro Cervera, MD, PhD^{2,4}; Anna K. Kristoffersen, PhD³; Claudia P. Valdés, Ms³; Hari M. Varma, Ms³; Carles Justicia, PhD^{1,2}; Turgut Durduran, PhD³; Ángel Chamorro, MD, PhD^{2,4}; Anna M. Planas, PhD^{1,2*}

¹ Department of Brain Ischemia and Neurodegeneration, Institut d'Investigacions Biomèdiques de Barcelona (IIBB), Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Barcelona, Spain.

² Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Barcelona, Spain.

³ ICFO-Institut de Ciències Fotòniques, Castelldefels, Barcelona, Spain.

⁴ Functional Stroke Unit, Hospital Clínic, Barcelona, Spain.

Cover title: MBL and intravascular thrombosis after MCAO

Figures: 5

Key words: Lectin pathway, complement, middle cerebral artery occlusion, reperfusion, brain

Subject codes: Basic Science Research

Number of words: 4,498

*** Corresponding author:**

Anna M. Planas, PhD
IIBB-CSIC, IDIBAPS
Rosselló 161, planta 6
08036-Barcelona, Spain
E-mail: anna.planas@iibb.csic.es
Tel: +34-93-3638327
Fax: +34-93-3638301

Abstract

Background and purpose: Several lines of evidence support the involvement of mannose-binding lectin (MBL) in stroke brain damage. The lectin pathway of the complement system facilitates thrombin activation and clot formation under certain experimental conditions. In the present study we examine whether MBL promotes thrombosis following ischemia/reperfusion and influences the course and prognosis of ischemic stroke.

Methods: Middle cerebral artery occlusion (MCAO)/reperfusion was carried out in MBL deficient (n=85) and wild type (WT) (n=83) mice and the brain lesion was assessed by MRI at days 1 and 7. Relative regional cerebral blood flow (rCBF) was monitored up to 6 hours after MCAO with laser-speckle contrast imaging. Fibrin(ogen) was analysed in the brain vasculature and plasma, and the effects of the thrombin inhibitor argatroban were evaluated to assess the role of MBL in thrombin activation.

Results: Infarct volumes and neurological deficits were smaller in MBL KO mice than in WT mice. rCBF values during MCAO and at reperfusion were similar in both groups, but decreased during the next six hours in the WT group only. Also, the WT mice showed more fibrin(ogen) in the brain vessels and a better outcome after argatroban treatment. In contrast, argatroban did not improve the outcome in MBL KO mice.

Conclusion: MBL promotes brain damage and functional impairment after brain ischemia/reperfusion in mice. These effects are secondary to intravascular thrombosis and impaired rCBF during reperfusion. Argatroban protects WT mice, but not MBL KO mice, emphasizing a role of MBL in local thrombus formation in acute ischemia/reperfusion.

Introduction

The complement system is activated in stroke¹ and is regarded as a detrimental factor contributing to worsen the outcome.^{2,3} The complement system is not only a potent ancestral innate immune defense against invading microbes, but it is also an efficient tool promoting clearance of damaged host cells.⁴ Complement can be activated through the classical, the alternative, and the lectin pathways that all culminate in the formation of a lytic pore in cell membranes known as the membrane attack complex, and the production of pro-inflammatory small protein fragments called anaphylotoxins C3a, C5a and C4a.⁵ Blockade of C3a⁶⁻⁸ and C5a^{8,9} receptors is protective against ischemia/reperfusion in animals.

The classical pathway involves IgM or IgG1 antibodies attaching to the C1q complex, which is expressed in ischemic neurons.¹⁰ C1-inhibitor, a naturally occurring acute phase protein, is protective against ischemia/reperfusion in experimental models.¹¹⁻¹⁴ C1-inhibitor not only blocks the classical pathway but it also prevents activation of the lectin pathway, amongst other effects.¹⁵ Notably, human recombinant C1-inhibitor selectively binds to mannose-binding lectin (MBL), and this mechanism is believed to mediate its protective effects in brain ischemia/reperfusion.¹⁶ Several lines of experimental¹⁷⁻¹⁹ and clinical^{17,20} evidence support that the MBL pathway exacerbates stroke brain damage. **MBL KO mice showed reduced brain damage after ischemia, and protection was lost following administration of recombinant MBL.**¹⁷

The complement and the coagulation systems cross-interact at several molecular steps.^{21,22} Proteins of the lectin pathway can induce thrombus formation through thrombin activation,²³⁻²⁷ thus exacerbating brain damage after ischemia/reperfusion.²⁸⁻³⁰ In

this study, we evaluated the role of MBL in thrombus formation and whether this interaction is involved in brain damage after ischemia/reperfusion in mice.

METHODS

An extended version of Methods can be found in Supplementary Materials.

Animal work

Animal work was undertaken with approval of the Ethical Committee of the University of Barcelona and in compliance with Spanish law. Adult (3-4 month-old) male wild type (WT) and MBL KO mice³¹ in the C57BL/6J background were used.¹⁷

Brain ischemia/reperfusion

Ischemia was produced by intraluminal 90-min occlusion of the right middle cerebral artery (MCAO) in WT (n=83) and MBL KO (n=85) mice. Cerebral perfusion was assessed with laser Doppler flowmetry (Perimed AB, Järfälla Sweden). **A neurological score ranging from 0 (no deficit) to 20 (maximal deficit) was carried out at days 1 and 7 after MCAO.**

MRI studies

Brain MRI was carried out in a 7.0 T BioSpec animal scanner (Bruker BioSpin, Ettlingen, Germany). T2 relaxometry maps were acquired at day 1 or at day 1 and 7, and images were analyzed blinded to genotype.

Pharmacological treatment

An osmotic pump containing argatroban (#PI-146-0050, Enzo Life Sciences) ($5 \mu\text{g Kg}^{-1} \text{min}^{-1}$ for 24 hours) or the vehicle (saline containing DMSO) was implanted i.p. prior to 90-min MCAO. One-mm thick brain sections obtained at 24h were stained with 1 % 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC). Infarct volume with edema correction was measured in a blinded fashion.

Optical imaging of cerebral blood flow

Relative cerebral blood flow (rCBF) was studied by laser speckle imaging (LSF) in ischemic and sham-operated mice. A custom LSF system was used measuring rCBF in various regions of interest (ROI): the ischemic core (MCA ROI), the surrounding region (outside ROI), and the corresponding ROIs in the contralateral hemisphere. The initial drop in CBF after MCAO was assessed with laser Doppler, while LSF was used to monitor CBF during the last 30 min of MCAO, for one hour following reperfusion, and at 4 and 6 hours. For quantification purposes, images were obtained as an average over five minutes at the 60-minute MCAO mark, at reperfusion, and 1, 4 and 6 h later. rCBF during and after MCAO was calculated relative to LSF baseline (15-min) measured before MCAO.

ELISA immunoassay

The concentration of fibrinogen in plasma (collected in citrate) was analyzed with an ELISA assay kit (#ab108844, Abcam, Cambridge, UK).

Immunofluorescence

Mice were intracardially perfused with saline followed by paraformaldehyde 24h after MCAO. Immunofluorescence was performed using a FITC-conjugated fibrinogen antibody (#F0111, Dakocytomation, Glostrup, Denmark) (1:100), and an anti-glucose transporter-1

(Glut-1) antibody (#AB1340, Merck Millipore, Billerica, MA) (1:200). The number of fibrin(ogen) positive blood vessels was counted in a blinded fashion.

Western Blotting

Mice were intracardially perfused with saline 24h after MCAO, and ipsilateral and contralateral tissue was dissected out. Cortex and striatum were obtained separately (n=6 per genotype and region). Western blotting was carried out with an antibody against native fibrinogen (#PAB13593, Abnova Corporation, Taipei, Taiwan) diluted 1:1,000. An antibody against actin (#A1978, Sigma-Aldrich Química, S.L., Madrid, Spain) diluted 1:500,000 was used as loading control. The ratio between fibrinogen and actin band intensities was calculated.

Statistical analyses

Differences between genotypes were assessed with the Student's *t* test or the Mann-Whitney test after testing for normal distribution (Kolmogorov-Smirnov test). Two-way ANOVA was used for comparisons by genotype, and treatment, brain hemisphere or time.

RESULTS

General information about the animals used in this study

Ischemia was induced in 168 mice (n=83 WT, n=85 MBL KO). Five mice (n=3 WT and n=2 MBL KO) did not enter the study due to surgical complications. Nine mice (n=3 WT and n=6 MBL KO) were excluded due to insufficient drop in cortical perfusion (< 65 % of baseline) after MCAO. Ten mice (n=5 WT and n=5 MBL KO) did not develop infarction and

were excluded. Mortality within the first 24 hours was 6.0 % and 11.8 % in WT (n=5) and MBL KO (n=10) groups, respectively (Chi-square= 0.51).

MBL KO mice had smaller infarct volumes and neurological deficits than WT mice

In a previous study we found smaller infarct volumes in MBL KO mice than in WT mice, as assessed post-mortem with the TTC technique.¹⁷ Here we aimed to validate these findings in larger cohorts of mice. MRI lesion volume was evaluated at 24h in WT (n=36) and MBL KO (n=36) mice (Fig. 1A, B). The reduction (mean±SD) in cortical perfusion after MCAO, as assessed with laser Doppler flowmetry, was 82±10 % in the WT group and 81±9 % in the MBL KO group. The MRI lesion volume was significantly smaller ($p<0.01$, Student *t* test) in MBL KO mice (Fig. 1C), which also showed a better (lower) neurological score than the WT group ($p<0.001$, Mann-Whitney test) (Fig. 1D).

To find out whether the early beneficial effect of MBL deficiency persisted at later time points, mice received a second MRI scan at day 7 (n=17 WT and n=19 MBL KO mice) (Fig. 2A). Mortality increased from day 1 to day 7 in the MBL KO (37 %) and WT (47 %) groups (Chi-square=0.38). Infarct volumes at 24h were higher in mice that died before day 7 than in mice that survived the 7-day period of the study ($79.2\pm 19.3 \text{ mm}^3$, n=8, vs. 49.3 ± 14.7 , n=9, $p<0.001$ for the WT group, and 68.3 ± 11.9 , n=7, vs. 34.6 ± 17.7 , n=12, $p<0.001$, for the MBL KO group). This group of MBL deficient mice also showed smaller infarct volumes and neurological deficits than the WT group (two-way ANOVA by genotype $p<0.05$, and time $p<0.001$) (Fig. 2B,C). Post-hoc analysis showed that the genotype effect on infarct volume was statistically significant at day 1 ($p<0.05$) but only showed a statistical trend ($p=0.08$) at day 7. The neurological scores were better in MBL KO mice than in WT mice at day 1 ($p<0.001$) and day 7 ($p<0.05$).

Cerebral blood flow at reperfusion was improved in the MBL KO mice versus the WT mice

We studied rCBF by laser Doppler and laser speckle imaging (LSF) in additional groups of ischemic (n=5 per genotype) and sham-operated (n=3 per genotype) mice. The laser Doppler measure (% of baseline) obtained during the first 30 min of MCAO was (mean±SD) 15.0±6.1 % in the WT group and 16.4±6.3 % in the MBL KO group (p=0.73). In the same mice, LSF (Fig. 3A) was measured in several ROIs (Fig. 3B) by obtaining images at different time points: baseline, during MCAO, one hour following reperfusion, and at 4 and 6 hours. The LSF measurement of rCBF (expressed as % of basal rCBF) in the 'MCA' ROI during MCAO was (mean±SD) 10.8±4.7 % for the WT group and 17.0±10.5 % for the MBL KO group (p=0.27). At reperfusion, rCBF recovered to a similar extent in MBL KO and WT mice (Fig. 3C). However, as time progressed, rCBF decreased in the WT group but not in the MBL KO group (Fig. 3C). Two-way ANOVA by genotype and time showed a significant genotype effect (p<0.05). In contrast, rCBF in the 'outside ROI' of the ipsilateral hemisphere, and in the corresponding (mirror) contralateral ROIs (Fig. 3C) was similar for both genotypes. In sham-operated mice, rCBF values in these ROIs did not differ between WT and KO mice and were stable over time (Fig. 3D).

MBL deficiency reduced deposition of fibrin(ogen) in blood vessels of the ischemic tissue

The presence of fibrinogen increased in the ischemic tissue of WT mice 24 hours after ischemia/reperfusion, as assessed by Western blotting (Fig. 4A). This effect was significantly attenuated in cortex (p<0.01) (Fig. 4A) and striatum (p<0.05) (not shown) of MBL KO mice (n=6 per genotype and region). Also, the number of fibrin(ogen) immunopositive vessels after ischemia (Fig. 4B) was reduced (p<0.05) in MBL KO mice (n=6) versus WT mice (n=6) in cortex (not shown) and striatum (Fig. 4B, C). However, increments in plasmatic levels of fibrinogen after ischemia were similar in both genotypes (Fig. 4D).

Argatroban reduced infarct volume and ameliorated the neurological deficit in WT mice but not in MBL KO mice

Since the lectin pathway can induce thrombin activation,^{24,32} we examined whether thrombin was involved in the detrimental effects of MBL by treating the mice with the direct thrombin inhibitor argatroban, and measuring infarct volume at 24 hours (TTC) (Fig. 5A,B). After MCAO, the reduction in cortical perfusion (mean±SD) as assessed by laser Doppler was: 79±10 % in the vehicle/WT group; 85±6 % in the argatroban/WT group, 87±6 % in the vehicle/MBL KO group; and 81±8 % in the argatroban/MBL KO group (p=0.15). The mice treated with argatroban (n=11) showed smaller infarct volumes and better neurological scores (p<0.05) than the mice receiving the vehicle (n=10) (Fig. 5C, D), in agreement with previous reports.^{28,29} In contrast, argatroban was not beneficial in MBL KO mice (n=8 per treatment group) (Fig. 5C, D). This finding suggested that the MBL pathway promoted local thrombin activation during reperfusion following ischemia.

DISCUSSION

The present study reports that MBL exacerbates acute ischemic damage by promoting local prothrombotic events in brain vasculature hampering blood flow reperfusion. In the WT mice, rCBF recovery at reperfusion was followed by progressive rCBF reductions and deposition of fibrin(ogen) in the brain vasculature. These effects might be attributable to secondary thrombotic events that can occur after local activation of the coagulation cascade during reperfusion.³³ Regardless of similar increments in circulating levels of fibrinogen after acute stroke in WT and KO mice, we observed less local vessel fibrin(ogen) in the ischemic tissue of the MBL KO mice. Moreover, a significant reduction in infarct

volume and greater improvement in functional outcome was seen after the administration of the direct thrombin inhibitor argatroban only in WT mice. This finding further attested to the clinical relevance of the local crosstalk between the lectin pathway of complement activation and thrombin-dependent secondary thrombosis in ischemia/reperfusion injury in mice.

A number of molecular interactions between the coagulation and complement cascades illustrates the complex crosstalk between these protease systems.²¹ Proteins of the lectin pathway can activate the coagulation cascade, as shown *in vitro*²³⁻²⁶ and *in vivo*.²⁷ MBL has no enzymatic activity and needs to bind the MBL-associated serine proteases (MASP). MBL binding to MASP-2 activates the complement by cleavage of C4 and C2.³⁴ MASP-2 can cleave prothrombin and form thrombin²⁴ and MASP-1 promotes the formation of cross-linked fibrin.³⁵ Also, activation of MASPs can induce the formation of fibrin clots,²⁵ and human MBL–MASPs complex can mimic thrombin and initiate coagulation.³² The procoagulant effects of lectin pathway proteins may contribute to eliminating invading pathogens by sequestering them through local activation of the coagulation cascade preventing dissemination throughout the organism.³⁵ However, according to our results, local prothrombotic events in the injured brain vasculature may impair reperfusion and enhance brain damage after acute ischemic stroke.

Thrombin activates platelets, converts fibrinogen to a fibrin mesh and cleaves factor XIII as well as performing other important functions in coagulation.³⁶ In brain ischemia, thrombin mediates severe vascular disruption and damage to the neurovascular unit.^{29,30} Accordingly, the thrombin inhibitor argatroban reduces brain injury after ischemia/reperfusion in experimental animals,²⁸⁻³⁰ and extends the therapeutic window of rtPA.²⁸ In humans, a pilot study of the combined administration of argatroban and

intravenous rtPA showed greater recanalization rate than rtPA alone in stroke patients with proximal intracranial arterial occlusions.³⁷ In the present study, argatroban protected WT mice, but not MBL KO mice, suggesting that the deleterious effect of MBL were mediated, at least in part, by thrombin activation.

Long-lasting protection was reported after pharmacologically targeting the MBL pathway,¹⁹ and genetic MBL-deficiency in humans was associated with a better stroke outcome.^{17,20} However, in a previous study the benefits of mouse MBL deficiency in acute stroke were not sustained at day 7.³⁸ Here, the protection of MBL-deficiency, as assessed by longitudinal MRI, was still seen at 7 days but group differences in infarct volume were attenuated compared to those at day 1. Several components of the complement system have regulatory functions in stem cells³⁹ and neural progenitor cells and immature neurons express receptors for complement fragments.⁴⁰ Furthermore, complement proteins can facilitate regeneration in various models of CNS disease.⁴¹ Therefore, the possibility that MBL may play different roles during the recovery phase cannot be excluded.

Summary

The current findings suggest that MBL impairs the cerebral circulation at reperfusion following MCAO by promoting local intravascular thrombotic events through a mechanism involving thrombin activation. Future clinical studies in acute stroke patients assessing the value of direct thrombin inhibitors might benefit from the stratification of the patients by their MBL genotype.

ACKNOWLEDGEMENT

We are indebted to IDIBAPS Image Platform for technical help.

SOURCES OF FUNDING

Work supported by the Spanish Ministries of Health (FIS PI10/01898, FIS PS09/00579) and Economy (SAF2011-30492), Fundació Cellex Barcelona, and Photonics4Life. X.R. had a FPI PhD fellowship from the Spanish Ministry of Economy.

DISCLOSURE

The authors declare no disclosures.

REFERENCES

1. Pedersen ED, Waje-Andreassen U, Vedeler CA, Aamodt G, Mollnes TE. Systemic complement activation following human acute ischaemic stroke. *Clin Exp Immunol.* 2004;137:117-122.
2. Széplaki G, Szegedi R, Hirschberg K, Gombos T, Varga L, Karádi I, et al. Strong complement activation after acute ischemic stroke is associated with unfavorable outcomes. *Atherosclerosis.* 2009;204:315-320.
3. Pedersen ED, Løberg EM, Vege E, Daha MR, Maehlen J, Mollnes TE. In situ deposition of complement in human acute brain ischaemia. *Scand J Immunol.* 2009;69:555-562.
4. Carroll MV, Sim RB. Complement in health and disease. *Adv Drug Deliv Rev.* 2011;63:965-975.
5. Klos A, Wende E, Wareham KJ, Monk PN. International Union of Pharmacology. LXXXVII. Complement peptide C5a, C4a, and C3a receptors. *Pharmacol Rev.* 2013;65:500-543.
6. Mocco J, Mack WJ, Ducruet AF, Sosunov SA, Sughrue ME, Hassid BG, et al. Complement component C3 mediates inflammatory injury following focal cerebral ischemia. *Circ Res.* 2006;99:209-217.
7. Ducruet AF, Hassid BG, Mack WJ, Sosunov SA, Otten ML, Fusco DJ, et al. C3a receptor modulation of granulocyte infiltration after murine focal cerebral ischemia is reperfusion dependent. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2008;28:1048-1058.

8. Garrett MC, Otten ML, Starke RM, Komotar RJ, Magotti P, Lambris JD, et al. Synergistic neuroprotective effects of C3a and C5a receptor blockade following intracerebral hemorrhage. *Brain Res.* 2009;1298:171-177.
9. Kim GH, Mocco J, Hahn DK, Kellner CP, Komotar RJ, Ducruet AF, et al. Protective effect of C5a receptor inhibition after murine reperfused stroke. *Neurosurgery.* 2008;63:122-125.
10. Huang J, Kim LJ, Mealey R, Marsh HC Jr, Zhang Y, Tenner AJ, et al. Neuronal protection in stroke by an sLex-glycosylated complement inhibitory protein. *Science.* 1999;285:595-599.
11. De Simoni MG, Storini C, Barba M, Catapano L, Arabia AM, Rossi E, et al. Neuroprotection by complement (C1) inhibitor in mouse transient brain ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2003;23:232-239.
12. Akita N, Nakase H, Kaido T, Kanemoto Y, Sakaki T. Protective effect of C1 esterase inhibitor on reperfusion injury in the rat middle cerebral artery occlusion model. *Neurosurgery.* 2003;52:395-400.
13. Storini C, Rossi E, Marrella V, Distaso M, Veerhuis R, Vergani C, et al. C1-inhibitor protects against brain ischemia-reperfusion injury via inhibition of cell recruitment and inflammation. *Neurobiol Dis.* 2005;19:10-17.

14. Heydenreich N, Nolte MW, Göb E, Langhauser F, Hofmeister M, Kraft P, et al. C1-inhibitor protects from brain ischemia-reperfusion injury by combined antiinflammatory and antithrombotic mechanisms. *Stroke*. 2012;43:2457-2467.
15. Davis AE 3rd, Mejia P, Lu F. Biological activities of C1 inhibitor. *Mol Immunol*. 2008;45:4057-4063.
16. Gesuete R, Storini C, Fantin A, Stravalaci M, Zanier ER, Orsini F, et al. Recombinant C1 inhibitor in brain ischemic injury. *Ann Neurol*. 2009;66:332-342.
17. Cervera A, Planas AM, Justicia C, Urra X, Jensenius JC, Torres F, et al. Genetically-defined deficiency of mannose-binding lectin is associated with protection after experimental stroke in mice and outcome in human stroke. *PLoS One*. 2010;5:e8433.
18. Morrison H, Frye J, Davis-Gorman G, Funk J, McDonagh P, Stahl G, et al. The contribution of mannose binding lectin to reperfusion injury after ischemic stroke. *Curr Neurovasc Res*. 2011;8:52-63.
19. Orsini F, Villa P, Parrella S, Zangari R, Zanier ER, Gesuete R, et al. Targeting mannose-binding lectin confers long-lasting protection with a surprisingly wide therapeutic window in cerebral ischemia. *Circulation*. 2012;126:1484-1494.
20. Osthoff M, Katan M, Fluri F, Schuetz P, Bingisser R, Kappos L, et al. Mannose-binding lectin deficiency is associated with smaller infarction size and favorable outcome in ischemic stroke patients. *PLoS One*. 2011;6:e21338.

21. Markiewski MM, Nilsson B, Ekdahl KN, Mollnes TE, Lambris JD. Complement and coagulation: strangers or partners in crime? *Trends Immunol.* 2007;28:184-192.
22. Amara U, Rittirsch D, Flierl M, Bruckner U, Klos A, Gebhard F, et al. Interaction between the coagulation and complement system. *Adv Exp Med Biol.* 2008;632:71-79.
23. Presanis JS, Hajela K, Ambrus G, Gál P, Sim RB. Differential substrate and inhibitor profiles for human MASP-1 and MASP-2. *Mol Immunol.* 2004;40:921-929.
24. Krarup A, Wallis R, Presanis JS, Gál P, Sim RB. Simultaneous activation of complement and coagulation by MBL-associated serine protease 2. *PLoS One.* 2007;2:e623.
25. Gulla KC, Gupta K, Krarup A, Gal P, Schwaeble WJ, Sim RB, et al. Activation of mannan-binding lectin-associated serine proteases leads to generation of a fibrin clot. *Immunology.* 2010;129:482-495.
26. Endo Y, Nakazawa N, Iwaki D, Takahashi M, Matsushita M, Fujita T. Interactions of ficolin and mannose-binding lectin with fibrinogen/fibrin augment the lectin complement pathway. *J Innate Immun.* 2010;2:33-42.
27. La Bonte LR, Pavlov VI, Tan YS, Takahashi K, Takahashi M, Banda NK, et al. Mannose-binding lectin-associated serine protease-1 is a significant contributor to coagulation in a murine model of occlusive thrombosis. *J Immunol.* 2012;188:885-891.

28. Morris DC, Zhang L, Zhang ZG, Lu M, Berens KL, Brown PM, et al. Extension of the therapeutic window for recombinant tissue plasminogen activator with argatroban in a rat model of embolic stroke. *Stroke*. 2001;32:2635-2640.
29. Chen B, Cheng Q, Yang K, Lyden PD. Thrombin mediates severe neurovascular injury during ischemia. *Stroke*. 2010;41:2348-2352.
30. Chen B, Friedman B, Whitney MA, Winkle JA, Lei IF, Olson ES, et al. Thrombin activity associated with neuronal damage during acute focal ischemia. *J Neurosci*. 2012; 32:7622-7631.
31. Sastry R, Wang JS, Brown DC, Ezekowitz RA, Tauber AI, Sastry KN. Characterization of murine mannose-binding protein genes Mbl1 and Mbl2 reveals features common to other collectin genes. *Mamm Genome*. 1995;6:103-110.
32. Takahashi K, Chang WC, Takahashi M, Pavlov V, Ishida Y, La Bonte L, et al. Mannose-binding lectin and its associated proteases (MASPs) mediate coagulation and its deficiency is a risk factor in developing complications from infection, including disseminated intravascular coagulation. *Immunobiology*. 2011;216:96-102.
33. Stoll G, Kleinschnitz C, Nieswandt B. Molecular mechanisms of thrombus formation in ischemic stroke: novel insights and targets for treatment. *Blood*. 2008;112:3555-3562.
34. Thiel S, Vorup-Jensen T, Stover CM, Schwaeble W, Laursen SB, Poulsen K, et al. A second serine protease associated with mannan-binding lectin that activates complement. *Nature*. 1997; 386:506-510.

35. Krarup A, Gulla KC, Gál P, Hajela K, Sim RB. The action of MBL-associated serine protease 1 (MASP1) on factor XIII and fibrinogen. *Biochim Biophys Acta*. 2008;1784:1294-1300.
36. Dahlbäck B. Blood coagulation. *Lancet*. 2000;355:1627-1632.
37. Barreto AD, Alexandrov AV, Lyden P, Lee J, Martin-Schild S, Shen L, et al. The argatroban and tissue-type plasminogen activator stroke study: final results of a pilot safety study. *Stroke*. 2012;43:770-775.
38. Ducruet AF, Sosunov SA, Zacharia BE, Gorski J, Yeh ML, Derosa P, et al. The neuroprotective effect of genetic mannose-binding lectin deficiency is not sustained in the sub-acute phase of stroke. *Transl Stroke Res*. 2011;2:588-599.
39. Shinjyo N, Ståhlberg A, Dragunow M, Pekny M, Pekna M. Complement-derived anaphylatoxin C3a regulates in vitro differentiation and migration of neural progenitor cells. *Stem Cells*. 2009;27:2824-2832.
40. Rahpeymai Y, Hietala MA, Wilhelmsson U, Fotheringham A, Davies I, Nilsson AK, et al. Complement: a novel factor in basal and ischemia-induced neurogenesis. *EMBO J*. 2006;25:1364-1374.
41. Rutkowski MJ, Sughrue ME, Kane AJ, Mills SA, Fang S, Parsa AT. Complement and the central nervous system: emerging roles in development, protection and regeneration. *Immunol Cell Biol*. 2010;88:781-778.

Figure Legends

Figure 1. MBL deficiency reduces MRI infarct volume and ameliorates the neurological deficit 24 hours after ischemia/reperfusion. Representative MRI images (T2 maps) 24h after MCAO for WT (n=36) (A) and MBL KO (n=36) (B) groups. Infarct volume (Student t test, ** p<0.01) (C) and neurological deficit (Mann-Whitney test, *** p<0.001) (D) are smaller in MBL KO mice than WT mice. Plot shows box with median and whiskers (minimum to maximum).

Figure 2. Longitudinal MRI at days 1 and 7 after MCAO. A) Illustrates MRI brain sections (T2 maps) at day 1 after MCAO and the corresponding images at day 7 for a representative mouse per group. B) Quantification of the MRI lesion volume (mm³) at 1 and 7 days for the WT group (n=17 mice at day 1 and n=9 mice at day 7) and the MBL KO group (n=19 mice at day 1 and n=12 mice at day 7). The difference between the number of mice at day 1 and day 7 is due to mortality between these time points. Two-way ANOVA by genotype and time shows a reduction in infarct volume in the MBL KO group that is statistically significant at day 1 (*p<0.05), but not at day 7 (p=0.08). C) The neurological score of the mice shown in (B) is lower in the MBL KO group versus the WT group at day 1 (*** p<0.001) and 7 (* p<0.05). Plot shows box with median and whiskers (minimum to maximum).

Figure 3. rCBF values decline during reperfusion in the WT mice but not in the MBL KO mice. A) The image shows the brain surface and the defined ROIs. Bar scale: 1 mm. B) LSF baseline image (black & white, left), and relative LSF images (color) obtained 60-min after the occlusion, after reperfusion, and 4 and 6 hours later in WT (upper row) and MBL KO (bottom row) mice. Relative LSF images show at each time point the difference

versus the corresponding baseline image. The color scale in the right side shows rCBF changes versus the baseline (1 means no change vs. baseline). C) Measurements of rCBF at different time points in ischemic mice show statistically significant differences (* $p < 0.05$) in the ischemic core (IPSI 'MCA ROI') between MBL KO and WT mice (mean \pm SEM; $n=5$ per group) (two-way ANOVA, genotype effect $p < 0.05$). Differences between groups in the surrounding region (outside ROI) of the ipsilateral (IPSI) hemisphere or in the corresponding regions of the contralateral (CONTRA) hemisphere were not statistically significant. D) No rCBF changes were seen in the various ROIs of sham-operated mice (SHAM) ($n=3$ per group).

Figure 4. Lower levels of fibrinogen in the ischemic tissue, but not in plasma, of MBL KO mice 24 hours after MCAO. A) Western blotting showing the presence of fibrinogen in the cortex. Quantification of the intensity of the bands (normalized by actin) shows less (** $p < 0.01$) fibrinogen in the ipsilateral (ipsi) cortex of MBL KO mice than of WT mice ($n=6$ for genotype). Values (mean \pm SEM) are expressed as percentage of non-ischemic control WT cortex (control). B) Immunofluorescence of the contralateral (contra) and ipsilateral (ipsi) striatum of WT and MBL KO mice shows enhanced fibrin(ogen) immunoreaction (green, left panels) in the ischemic tissue of WT mice. Corresponding immunostaining with anti-Glut-1 (red, center panels) antibody shows the blood vessels. The merged images in the right panels show the corresponding fibrinogen (green), Glut-1 (red), and Hoechst (blue) staining. Bar scale: 200 μm . C) Quantification of the number of fibrinogen+ vessels (mean \pm SEM % of total vessels per area) ($n=6$ per genotype) shows lower numbers in MBL KO mice than in WT mice (* $p < 0.05$). D) Quantification of fibrinogen in plasma (mean \pm SEM) of naïve and ischemic mice shows similar increases after ischemia in MBL KO ($n=6$) and WT ($n=6$) mice.

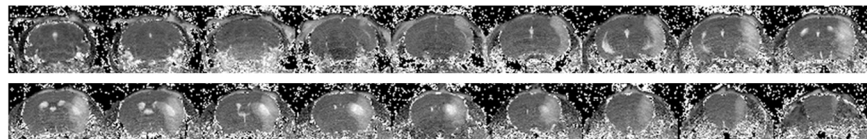
Figure 5. Argatroban reduces infarct volume and ameliorates the neurological deficit at 24 hours post-ischemia in WT mice but not in MBL KO mice. A,B) Representative TTC coronal sections of WT (A) and MBL KO (B) mice that received either the vehicle or argatroban. C) Quantification of infarct volume in the TTC sections of WT mice (n=10 vehicle and n=11 argatroban) and MBL KO mice (n=8 per treatment group) shows that argatroban reduced infarct volume (C) and neurological deficits (D) in the WT group (* $p < 0.05$), but not in the MBL KO group. & $p < 0.05$ versus vehicle WT group. **Plot shows box with median and whiskers (minimum to maximum).**

For Stroke Peer Review. Do not distribute. Destroy after use.

Figure 1

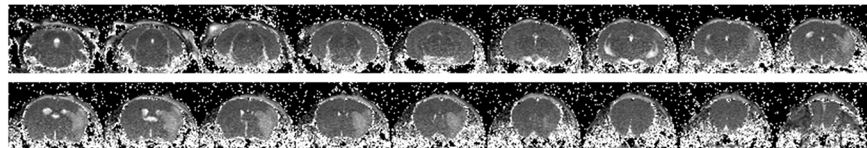
A

WT

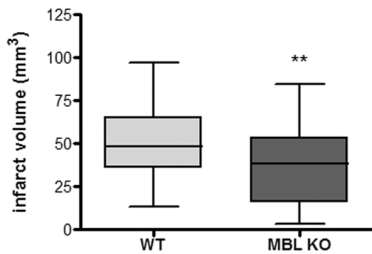


B

MBL KO



C



D

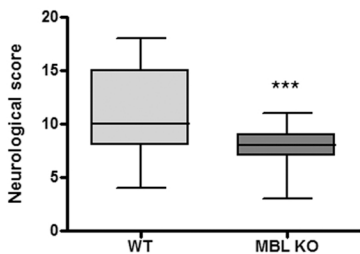
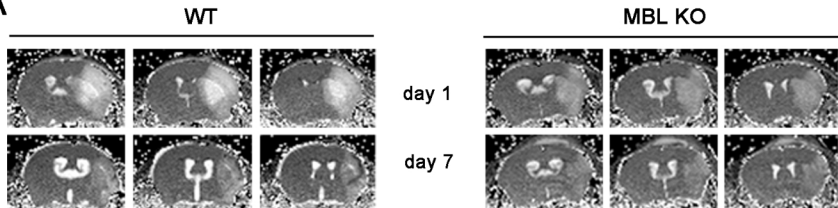
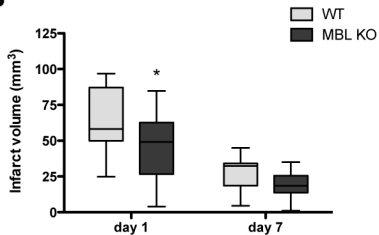


Figure 2

A



B



C

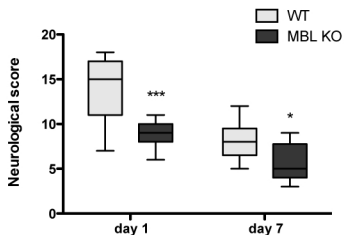
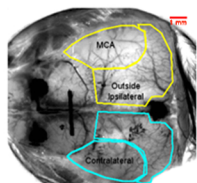
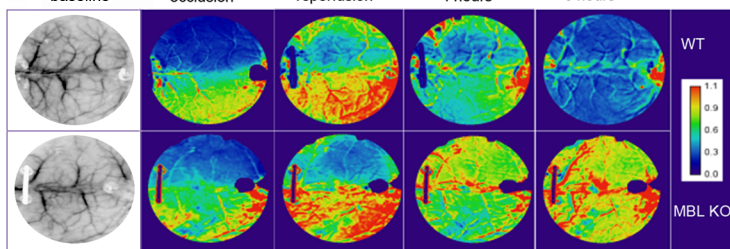


Figure 3**A****B****C**

● MBL-null ○ WT

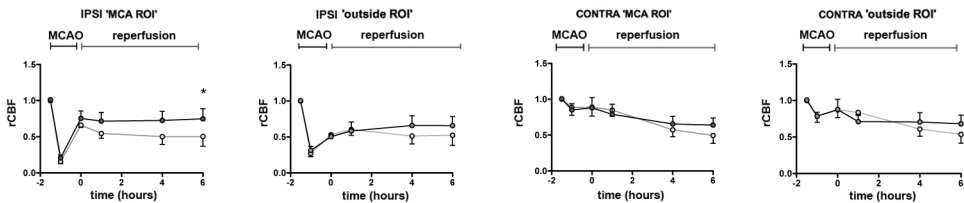
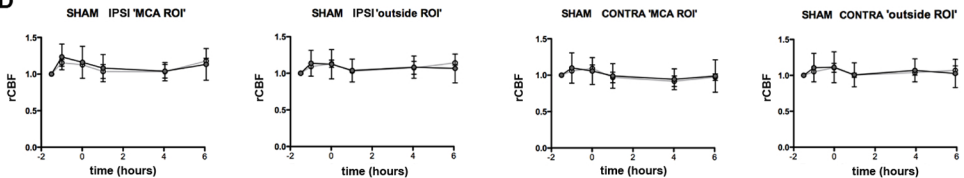
**D**

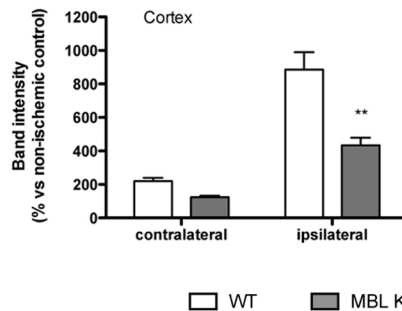
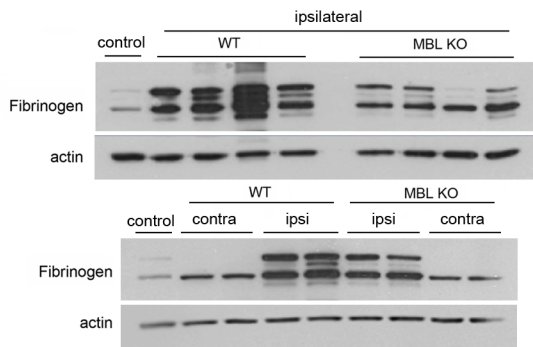
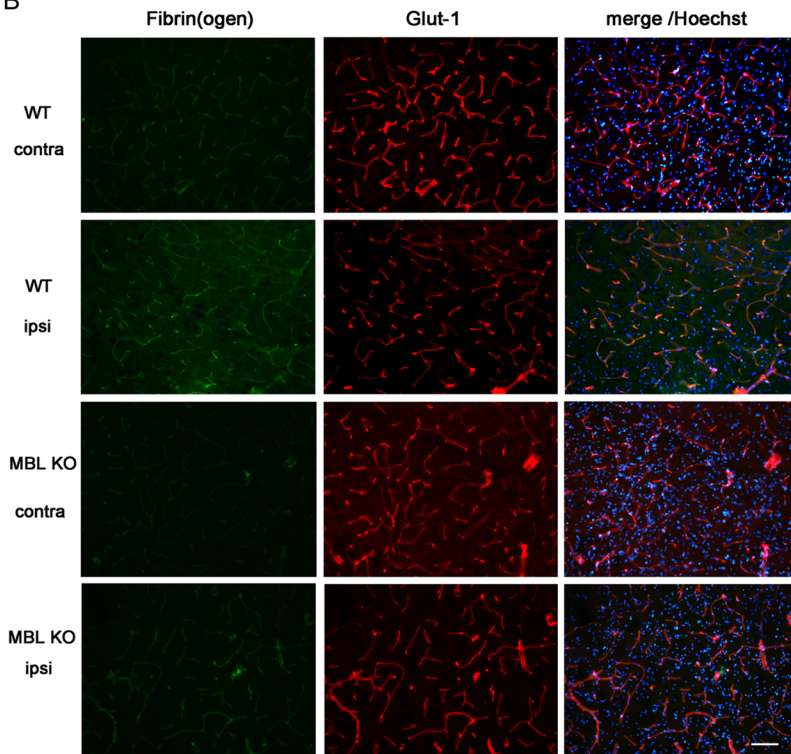
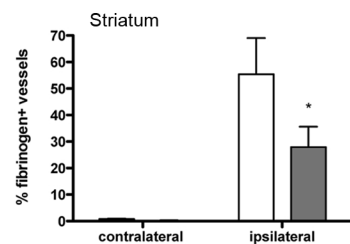
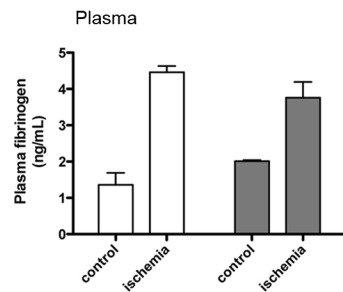
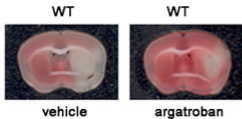
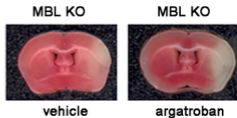
Figure 4**A****B****C****D**

Figure 5

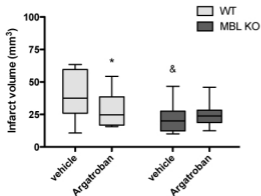
A



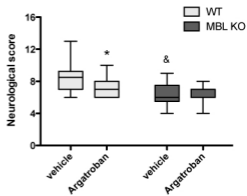
B



C



D



DISCUSSIÓ

DISCUSSIÓ

Aquesta tesi s'ha enfocat a l'estudi dels efectes de la reperfusió després d'una isquèmia cerebral en models animals. La reperfusió és essencial per restablir el flux sanguini a la zona isquèmica i permetre la viabilitat neuronal, però a l'hora pot tenir efectes secundaris no desitjats que contrarestin el seu benefici. En el present treball hem estudiat la inducció de la proteïna d'estrès cel·lular Hsp-70 implicada en viabilitat neuronal, com un efecte beneficiós de la reperfusió. Per altre banda hem estudiat el paper d'efectes negatius de la reperfusió com són l'augment d'estrès oxidatiu i l'activació de vies del complement.

La isquèmia/reperfusió indueix l'expressió de Hsp-70 que es pot monitoritzar in vivo en animals transgènics mitjançant tècniques d'imatge confocal

L'expressió de Hsp-70 és indetectable en condicions fisiològiques però la seva inducció augmenta molt després d'isquèmia (Planas et al., 1997). Nombrosos estudis han mostrat que la sobre-expressió o inducció farmacològica de Hsp-70 té un efecte neuroprotector en models de mort neuronals en isquèmia ((Yenari et al., 1998),(Rajdev et al., 2000),(Hoehn et al., 2001),(Tsuchiya et al., 2003),(Giffard and Yenari, 2004), (van der Weerd et al., 2005), (Xu et al., 2009), (van der Weerd et al., 2010), (Mohanani et al., 2011). Addicionalment, participa en una àmplia varietat de vies metabòliques. Entre d'elles, intervé en la cascada proteica apoptòtica incrementant l'expressió de Bcl-2 (Kelly et al., 2002) o inhibint l'alliberació de citocrom C (Creagh et al., 2000), interfereix l'activitat d'Apaf-1 (Saleh et al., 2000), participa en el reclutament de procaspasa-9 (Beere et al., 2000) i pot unir-se i segrestar AIF (Matsumori et al., 2005). S'ha descrit que la sobre-expressió de Hsp-70 en astròcits redueix la vulnerabilitat neuronal en models transitoris d'isquèmia (Xu et al., 2010). Així, l'administració de proteïna Hsp-70 recombinant redueix el volum d'infart i millora les funcions neurològiques després d'isquèmia transitòria en ratolí (Doeppner et al., 2009) i rata (Zhan et al., 2010). La millora i protecció en isquèmia que aporta Hsp-70 podria ser deguda al seu paper anti-apoptòtic des de fases inicials (Yenari et al., 2005).

DISCUSSIÓ

Tot i aquests efectes beneficiosos, hi ha dos treballs en els que la inducció de Hsp70 en ratolins transgènics no ofereix protecció en un model global d'isquèmia (Olsson et al., 2004), i en un model transitori en el que Hsp27 sí que té efectes protectors (Badin et al., 2006).

L'expressió de Hsp-70 s'ha descrit que és marcador de la zona de penombra (Planas et al., 1997), (Hata et al., 2000). Monitoritzar la zona de penombra té interès perquè permet estimar si hi ha teixit viable en risc de mort que potencialment es podria beneficiar de tractaments farmacològics protectors. Per aquest motiu hem ideat un sistema que permeti la detecció d'aquesta proteïna *in vivo* en animals transgènics després de la inducció d'isquèmia cerebral. En aquest treball s'ha modificat genèticament els ratolins perquè expressin la proteïna fluorescent mPlum (excitació 594 nm emissió 649 nm) sota el promotor del gen *Hsp-70*. El constructe Hsp-70-mPlum es va validar *in vitro* en cèl·lules transfectades exposant-les a estímuls inductors del gen *Hsp-70* i es va comprovar que hi havia una correlació lineal entre la inducció del gen *Hsp-70* i el mPlum. A continuació, es van generar ratolins transgènics que es van sotmetre a isquèmia transitòria per oclusió de l'ACM per tal d'induir l'expressió de Hsp-70 al cervell isquèmic.

Els animals observats amb tècniques d'imatgeria òptica en els animals vius (FRI) mostren una senyal de fluorescència en l'hemisferi ipsilateral i la zona afectada que correspon amb la zona d'inducció de Hsp-70, segons es va comprovar amb assajos immunohistoquímics en talls de cervell postmortem del mateix animal. Els cervells extrets del crani presenten una alta intensitat de senyal i una millor ratio senyal/soroll que els animals vius, donat que la senyal dels animals vius és atenuada per la presència del crani. Aquest experiment mostra que l'expressió de la Hsp-70 en el cervell després d'inducció amb isquèmia, pot ser monitoritzada de forma no invasiva *in vivo* utilitzant aquests animals transgènics i la tecnologia FRI.

Adicionalment, es va estudiar la fluorescència de mPlum a nivell cel·lular utilitzant microscòpia confocal després de practicar una finestra cranial. Aquesta tècnica permet la visualització de neurones positives per mPlum i també va

mostrar la presència de mPlum en vasos sanguinis. Els nostres resultats estan en acord amb els estudis de Popp, que descriuen l'expressió de Hsp-70 en neurones de la perifèria del nucli isquèmic després de 24h d'oclusió de l'ACM, mentre que en el nucli isquèmic aquesta es troba en els vasos sanguinis (Popp et al., 2009). La dinàmica d'expressió d'aquesta proteïna després de la isquèmia suggereix que és expressada per les neurones viables de la penombra (Kinouchi et al., 1993b). En línia amb la majoria de resultat, és aquesta inducció natural de Hsp-70 en neurones després d'isquèmia, que proporciona protecció. (Nowak et al., 1993), (Kinouchi et al., 1993a), (Nowak and Jacewicz, 1994). Els nostres resultats *in vivo* també concorden amb estudis del teixit post-mortem que mostren Hsp-70 a la perifèria del nucli isquèmic a la zona cortical que és on està descrit que hi ha una major expressió de la Hsp-70 després d'un procés isquèmic (Sharp et al., 1993). Tenint en consideració les evidències que suggereixen que les neurones de la penombra isquèmia mostren una intensa inducció de *Hsp-70* mRNA (Hata et al., 2000), els animals mPlum transgènics que hem generat en aquest estudi permeten visualitzar *in vivo*, a través de la fluorescència mPlum, la zona d'inducció de *Hsp-70* marcadora de la penombra.

També diversos estudis ressalten que Hsp-70 té efectes antiinflamatoris. Aquesta proteïna podria interactuar amb la subunitat inhibidora del complex NFκB, IκB, prevenint la seva activació i la dissociació del complex NFκB (Ran et al., 2004). Segons Ding XZ, aquest efecte protegiria del shock inflamatori letal de TNF-α reduint els mediadors inflamatoris. Per una altra banda, Feinstein i col·laboradors van realitzar estudis en cèl·lules glials exposades a estrès per calor, transfectades amb Hsp-70 i, tot seguit, estimulades amb LPS. Aquestes cèl·lules mostraven menys translocació de NFκB al nucli i, en conseqüència, menys expressió d'òxid nítric sintasa o iNOS (Feinstein et al., 1996). Lee descriu una reducció *in vitro* de la producció de MMP-9 en astròcits exposats a isquèmia que sobre-expressaven Hsp-70 (Lee et al., 2004). Per tant, podem concloure que l'expressió de mPlum en neurones indica supervivència neuronal després de la isquèmia.

L'expressió de mPlum en la vasculatura també podria indicar efectes protectors ja que la Hsp-70 està associada amb l'atenuació del dany microvascular causat pel dany per reperfusió (Chen et al., 1997). La mida dels vasos amb fluorescència mPlum és compatible amb que siguin arterioles. La fluorescència de mPlum va ser detectada en determinats segments dels vasos. Concretament, la fluorescència s'observava adjacent a la intersecció dels vasos, fet que podria indicar estrès en aquestes zones, d'acord amb resultats en altres condicions experimentals (Schett et al., 1998). Caldrà fer més estudis per tal d'esbrinar si la inducció de Hsp-70 en aquests segments està relacionada amb canvis del flux sanguini local i d'autoregulació vascular.

El benefici de la inducció de Hsp-70 descrit a la literatura (Yenari et al., 1998), (Rajdev et al., 2000), (Hoehn et al., 2001), (Tsuchiya et al., 2003), (Giffard and Yenari, 2004), (van der Weerd et al., 2010), (van der Weerd et al., 2005), (Xu et al., 2009), (Mohanani et al., 2011) la identifiquen com una bona diana d'intervenció terapèutica. Molts fàrmacs que indueixen l'expressió de Hsp-70, com la geldanamicina (Lu et al., 2002), tenen un efecte protector contra el dany per isquèmia (Kwon et al., 2008). Els animals transgènics descrits permeten la monitorització de la inducció de Hsp-70 *in vivo* després d'intervenció farmacològica i que es pot utilitzar com un biomarcador de penombra en estudis preclínic. Caldrà que hi hagi nous avenços, incloent nanopartícules (Javier et al., 2009) o marcadors PET (Dobrovín et al., 2012) que permetin visualitzar l'expressió de Hsp-70 per tècniques d'imatge en humans.

Globalment, aquest estudi demostra l'expressió *in vivo* de Hsp-70 en el cervell després d'isquèmia transitòria en un ratolí transgènic fluorescent utilitzant FRI i microscòpia confocal intravital. La FRI mostra la inducció del gen *Hsp-70* en la regió isquèmica, mentre que la microscòpia confocal mostra a nivell cel·lular l'expressió a les neurones i a la vasculatura del cervell. L'expressió de *Hsp-70* en neurones és un marcador de la penombra i un indicador de la viabilitat neuronal, mentre que l'expressió de *Hsp-70* en els vasos és un marcador d'infart. Podem concloure que els ratolins transgènics Hsp-70/mPlum són una bona eina per a l'estudi de la inducció de Hsp-70 *in vivo* que permeten monitoritzar els efectes de la isquèmia/reperfusió en animals vius.

La reperfusió indueix estrès oxidatiu que es pot prevenir amb un antioxidant

Com hem explicat prèviament, la restauració del flux sanguini o reperfusió del vas sanguini pot causar dany addicional i exacerbar el dèficit cognitiu després d'isquèmia (Roberts et al., 2013). La recanalització del vas provoca un augment en els nivells de ROS que condueix a l'activació de l'apoptosi (Drose, 2013).

Adicionalment, la producció de superòxid, òxid nítric o peroxi nitrit facilita l'activació d'un cercle viciós que ocasionaria major dany mitocondrial, excitotoxicitat, peroxidació lipídica i inflamació (Crack and Taylor, 2005). Això indueix la sobre expressió de citosines, molècules d'adhesió endotelials i MMPs, augmentant encara més l'estrès oxidatiu i el dany tissular (Jian Liu and Rosenberg, 2005), (Rosenberg, 2002).

Diversos estudis destaquen el possible ús d'antioxidants exògens en el tractament del dany per reperfusió. Diversos tractaments antioxidants han mostrat efectes neuroprotectors en models cerebrals d'isquèmia (Diener et al., 2008), especialment els inhibidors o bloquejants de la producció de radicals lliures i activadors de la degradació de radicals (Amaro and Chamorro, 2011; Amaro et al., 2013). Fins i tot, alguns d'aquests antioxidants s'han provat en combinació amb agents trombolítics amb efectes sinèrgics o additius (Amaro and Chamorro, 2011).

Així doncs, estudis experimentals en models d'isquèmia/reperfusió mostren que els antioxidants externs tenen un paper beneficiós i poden protegir del dany per reperfusió. En aquesta tesi hem aprofundit en el paper d'una molècula sintètica, el CR-6, com a agent antioxidant pel tractament d'isquèmia amb reperfusió.

El CR-6 és un antioxidant capaç de reaccionar amb NO i peroxi nitrit (Montoliu et al., 1999). El NO pot reaccionar amb les espècies superòxid generades durant la reperfusió i originar peroxi nitrit (Beckman, 1990), una espècie molt reactiva que indueix iNOS i pot causar dany tissular. En aquest treball hem descrit que l'expressió de la proteïna NOS augmenta en rates hiperèmiques després de la isquèmia i que el CR-6 atenua aquest efecte. Adicionalment, s'ha descrit que CR-6 també inhibeix la peroxidació de lípids

(Yenes et al., 2004). Estudis previs indiquen que el CR-6 actua als radicals lliures d'oxigen, transferint-los un electró en una reacció mitjançant el trencament del grup hidroxil de l'anell fenol (Yenes et al., 2004). Totes aquestes propietats del CR-6 poden contribuir a l'efecte beneficiós observat.

El CR-6 és una molècula sintètica estructuralment simple, anàloga a la vitamina E, que ha estat utilitzada prèviament en cèl·lules i animals en condicions que involucraven estrès oxidatiu (Sanvicens et al., 2006), (Miranda et al., 2007). Els experiments de biodisponibilitat que hem portat a terme mostren que el CR-6 entra al parènquima després de l'administració oral travessant la BHE.

Els nostres resultats mostren que el CR-6 té una acció protectora en la isquèmia/reperfusió. En canvi, el CR-6 no té efectes protectors en un model d'isquèmia permanent quan no hi ha recanalització del vas. Mitjançant l'enregistrament continu del flux sanguini cortical, es va fer evident que alguns animals presentaven hiperèmia immediatament després de la reperfusió. Aquests animals desenvolupaven infarts majors i tenien una valoració neurològica molt pitjor comparat amb els que no mostraven hiperèmia.

Podem concloure que aquesta hiperèmia a la recanalització del vas és un signe de dany per reperfusió. Diversos treballs recolzen que la hiperèmia en el punt de reperfusió s'associa a un dany major del teixit (Tamura et al., 1981), i en d'altres estudis mostren com la supressió d'aquest efecte és protector (Yamagami et al., 1998). La hiperèmia és induïda per la dilatació dels vasos cerebrals degut a la disminució de la resistència del vas durant la isquèmia (Gourley and Heistad, 1984; Traupe et al., 1982). Per una altra banda, mecanismes neurogènics estan relacionats amb el desenvolupament de hiperèmia després de la isquèmia (Macfarlane et al., 1991). No obstant, no sabem si la hiperèmia té efectes perjudicials de manera directe o indirecte. Per exemple, no podem excloure que fenòmens associats a la hiperèmia, com la hipoperfusió subseqüent que s'ha descrit (Traupe et al., 1982), fossin responsables de l'increment del dany. En el nostre estudi, hem trobat que només els animals que mostren hiperèmia reactiva al moment de la reperfusió són els que es beneficien del tractament amb CR-6.

DISCUSSIÓ

La hiperperfusió en el moment de la reperfusió no és un fenomen que tingui lloc només en rates. Existeixen evidències que pacients d'isquèmia poden desenvolupar hiperperfusió després de recanalitzar el vas amb tractament amb rtPA (Kidwell et al., 2001). Els experiments del nostre estudi donen suport a la idea que els individus amb hiperèmia a la reperfusió són susceptibles de respondre millor al tractament antioxidant, ja que s'esdevé un efecte beneficiós significatiu tant en la reducció del volum d'infart com en la millora en la valoració neurològica realitzada als diferents individus. Aquest efecte beneficiós no apareix en animals sense hiperèmia o sense reperfusió.

Hem vist que CR-6 atenua l'expressió de COX-2 induït en neurones. Aquest fet suggereix que l'estrès oxidatiu en aquestes condicions va regit per COX-2 i que el tractament de CR-6, directa o indirectament, afecta les neurones. Molts estudis demostren que COX-2 té efectes perjudicials en la isquèmia transitòria donat que animals deficientes en aquesta proteïna, mostren menys dany comparat amb els animals salvatges (Iadecola et al., 2001). A més, la inhibició de COX-2 és protectora (Candelario-Jalil et al., 2007b) i redueix el trencament de BHE, així com la infiltració de leucòcits (Candelario-Jalil et al., 2007a).

Per una altra banda, la sobre expressió de COX-2 empitjora el pronòstic després d'un episodi isquèmic (Goto et al., 2003). Aquest fenomen s'ha atribuït a la producció de prostaglandina E2 més que no pas a la generació d'estrès oxidatiu (Kunz et al., 2007). COX-2 és induït després d'episodis molt curts d'isquèmia sense causar un dany major (Planas et al., 1999). Aquesta observació suggereix que és possible que la cascada bioquímica activada per COX-2 necessiti de la interacció amb altres senyals generats després d'una isquèmia més greu per produir efectes perjudicials.

Per tal de veure la importància dels fenòmens d'estrès oxidatiu, es van analitzar signes d'aquest fenòmens en l'arteria cerebral mitja aïllada dels animals. Només es va detectar estrès oxidatiu en els animals tractats amb vehicle mentre que aquest efecte es perdia en animals tractats amb CR-6.

Globalment, aquests resultats mostren que l'antioxidant CR-6 arriba al teixit cerebral després d'administració oral i que té un efecte protector en

l'isquèmia/reperfusió. Hem demostrat que la protecció es manifesta en el subgrup d'animals que desenvolupen hiperèmia en el moment de la reperfusió. Els animals que presenten aquest augment del flux sanguini en el moment de la reperfusió presenten una lesió cerebral més gran i el tractament amb l'antioxidant els protegeix del dany en la interfase entre sang i cervell, prevenint la formació d'estrès oxidatiu en els vasos i disminuint el trencament de la BHE.

Aquests resultats evidencien que el tractament amb antioxidants és eficaç en certs individus on el dany per isquèmia/reperfusió es dona de manera més acusada. Aquesta troballa suggereix que els signes per dany per reperfusió s'haurien d'estudiar en pacients d'ictus que reben tractament trombolític. En conclusió, aquest estudi experimental recolza que s'explori en més profunditat el CR-6 pel tractament de l'ictus isquèmic amb l'objectiu d'atenuar els possibles efectes negatius associats amb la reperfusió.

La MBL contribueix a la lesió cerebral després de la isquèmia/reperfusió

En aquesta tesi hem mostrat que la MBL exacerba el dany cerebral promovent fenòmens locals trombòtics en la vasculatura del cervell i obstaculitzant el flux sanguini durant les primeres hores després d'isquèmia/reperfusió.

Els animals genèticament deficients de proteïna C3 (Atkinson et al., 2006) i també els que es tracten amb inhibidors de C3 convertasa (Mocco et al., 2006) tenen menor volum d'infart, inflamació, i menys dèficit cognitiu després de l'oclusió de l'artèria cerebral mitja. Amb tot i això, sembla que el dany mediat per l'activació del complement en I/R és independent de C1q (la via clàssica). Aquest fet centra els estudis en les dues altres vies, tant l'alternativa com la de les lectines (De Simoni et al., 2004). Estudis en models murins d'I/R on s'administren inhibidors de C1, suggereixen que la MBL és responsable d'un efecte protector en front del dany isquèmic (Gesuete et al., 2009). Dades clíniques del nostre i altres grups també suggereixen que la MBL està implicada en la lesió cerebral després del ictus (Cervera et al., 2010; Morrison et al., 2011).

DISCUSSIÓ

Estudis recents demostren que l'activació del complement després d'isquèmia és deguda a la IgM endògena natural (Elvington et al., 2012), que podria tenir lloc a través de la via de les lectines (McMullen et al., 2006; Zhang et al., 2006b).

En aquest treball hem fet estudis de ressonància magnètica després d'isquèmia/reperfusió en ratolins deficients en MBL i en ratolins WT. El volum d'infart es va mesurar en les imatges de ressonància magnètica utilitzant mapes T2 als temps de 24h i als 7 dies. Els animals MBL KO mostren una reducció en el volum d'infart a dia 1 respecte dels WT, demostrant que la protecció que el nostre equip havia descrit prèviament a dia 2 mitjançant tècniques histològiques (Cervera et al., 2010) ja es manifesta en la ressonància magnètica a partir de les 24h de reperfusió. Aquests resultats mostren que els animals deficients en MBL presenten protecció en front de la isquèmia/reperfusió cerebral perquè tenen volums d'infart més petits i un menor dèficit neurològic que els animals WTs.

Els estudis d'imatgeria amb la tècnica de laser Speckle han demostrat que els animals salvatges presenten una menor perfusió sanguínia a 4 i 6h després de la reperfusió. Aquest efecte pot ser explicat amb fenòmens de coagulació secundària i amb el fet conegut que la via de coagulació i MBL estan estretament associades (Markiewski et al., 2007). MBL pot activar fenòmens de coagulació i afavorir el pas de fibrina a fibrinogen (Endo et al., 2010; Takahashi et al., 2010) així com activar plaquetes i la via de coagulació a través de la ruta MBL-associated proteins o MASPs (Hess et al., 2012). Per esbrinar el possible paper de la coagulació i concretament de la via de la trombina en els efectes de la MBL, vam tractar els animals amb un inhibidor de la trombina, l'argatroban. Els animals WT tractats amb argatroban presentaven un menor volum d'infart, mentre que els animals deficients en MBL no responien al tractament. D'acord amb aquests resultats, en els cervells isquèmics dels animals MBL KO també vam observar menys dipòsits de fibrinogen/fibrina, segons es va observar quantificant Western blots i el nombre de vasos amb marcatge positiu per fibrina-fibrinogen en talls histològics de cervell. Concloem que la trombina participa en el dany per reperfusió i que aquesta via no està tant activada en animals deficients en MBL.

DISCUSSIÓ

Les nostres dades indiquen que la deficiència en MBL provoca una menor resposta de coagulació secundària després d'isquèmia/reperfusió cerebral, i comporta un efecte beneficiós. La validació d'aquests resultats justificarien l'estudi de teràpies dirigides específicament a inhibir la via de les lectines i evitar l'activació del complement i la coagulació secundària en pacients amb isquèmia cerebral.

Resum global

Globalment, aquesta tesi mostra diversos fenòmens que s'associen a la reperfusió després de la isquèmia cerebral. Per una banda, la inducció de la proteïna Hsp-70, a la que s'atribueixen propietats anti-apoptòtiques i protectores, promourà la supervivència neuronal en la zona de la penombra. La generació d'animals transgènics que expressen una proteïna fluorescent sota el promotor del gen *Hsp-70* ens ha permès visualitzar en animals vius la zona de penombra mitjançant tècniques de microscòpia confocal intravital, així com monitoritzar aquesta expressió en regions cerebrals utilitzant tecnologia FRI. Malgrat la inducció de molècules protectores que facilitaran la supervivència neuronal a la zona de penombra, la reperfusió també comporta danys secundaris que s'associen principalment a estrès oxidatiu i inflamació. Aquests danys per reperfusió no s'observen en tots els animals sinó que es posen de manifest en aproximadament la meitat dels animals sotmesos a isquèmia transitòria seguida de reperfusió. Hem trobat que la hiperèmia reactiva en el moment de la reperfusió és un biomarcador de dany per reperfusió. El subgrup d'animals amb hiperèmia reactiva és el que és susceptible de respondre a tractaments antioxidants, com hem demostrat amb l'anàleg sintètic de la vitamina E, CR-6. L'administració oral de CR-6 dues hores després de l'inici de la isquèmia, protegeix els animals hiperèmics disminuint el volum d'infart cerebral i atenuant els dèficits neurològics. Aquesta protecció està relacionada amb una disminució de l'estrès oxidatiu a nivell de la vasculatura cerebral, menor alteració de la permeabilitat de la barrera hematoencefàlica, menor infiltració leucocitària i

DISCUSSIÓ

menor inflamació. La isquèmia/reperfusió també activa el complement. Hem demostrat que la via de les lectines està implicada en la lesió cerebral donat que els animals deficients en la proteïna MBL d'aquesta via tenen lesions de menor mida i presenten menys alteracions neurològiques. Hem demostrat que els efectes perjudicials de la MBL són deguts a la disminució del flux sanguini cerebral durant les hores que segueixen a la reperfusió post-isquèmia. Aquesta disminució està relacionada amb el dipòsit de fibrina/fibrinògen en la microvasculatura cerebral de la zona afectada i amb l'activació de la trombina, tal com demostren els efectes beneficiosos de l'inhibidor de trombina argatroban, que s'observen en els animals que tenen MBL però no en els animals deficients.

Els resultats d'aquest treball permeten concloure que diferents estratègies per minimitzar el dany per reperfusió podrien incloure la inducció de l'expressió de Hsp-70 per afavorir la supervivència de les neurones de la penombra, i la inhibició tant de l'estrès oxidatiu com de l'activació del complement per la via de les lectines per evitar la trombosis secundària durant la reperfusió, atenuar l'estrès oxidatiu a l'endoteli vascular i prevenir la ruptura de la barrera hematoencefàlica i la inflamació tissular.

DISCUSSIÓ

CONCLUSIONS

CONCLUSIONS

CONCLUSIONS

1. Hem generat ratolins transgènics que expressen el gen de la proteïna fluorescent *mPlum* sota el promotor del gen d'*Hsp-70*, que permeten seguir la inducció del gen *Hsp-70* amb tècniques d'imatge òptica.

2. Aquests animals ens han permès visualitzar *in vivo* la inducció del gen *Hsp-70* en el cervell després de la isquèmia/reperfusió, i localitzar la fluorescència a nivell cel·lular en neurones viables de la zona de penombra i en la vasculatura de l'infart utilitzant tècniques d'imatgeria FRI i de microscòpia intravital.

3. La hiperèmia reactiva en el moment de la reperfusió és un biomarcador de dany per reperfusió que s'associa a un major estrès oxidatiu, inflamació i ruptura de la barrera hematoencefàlica.

4. L'administració de l'antioxidant CR-6 després de la isquèmia/reperfusió té efectes protectors només en els animals que prèviament havien presentat senyals de dany per reperfusió.

5. La proteïna MBL que participa en l'activació del complement per la via de les lectines està implicada en el dany per isquèmia/reperfusió.

6. La MBL facilita la trombosis intravascular secundària a la reperfusió a través de mecanismes mediat per l'activació de la trombina.

CONCLUSIONS

BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA

- Abbas, A.K., and A.H. Lichtman. 2010. Basic Immunology Updated Edition: Functions and Disorders of the Immune System. Saunders.
- Adibhatla, R.M., and J.F. Hatcher. 2008. Tissue plasminogen activator (tPA) and matrix metalloproteinases in the pathogenesis of stroke: therapeutic strategies. *CNS Neurol Disord Drug Targets*. 7:243-253.
- Akita, N., H. Nakase, T. Kaido, Y. Kanemoto, and T. Sakaki. 2003. Protective effect of C1 esterase inhibitor on reperfusion injury in the rat middle cerebral artery occlusion model. *Neurosurgery*. 52:395-400; discussion 400-391.
- Amaro, S., and A. Chamorro. 2011. Translational stroke research of the combination of thrombolysis and antioxidant therapy. *Stroke*. 42:1495-1499.
- Amaro, S., L. Llull, X. Urra, V. Obach, A. Cervera, and A. Chamorro. 2013. Risks and benefits of early antithrombotic therapy after thrombolytic treatment in patients with acute stroke. *PLoS One*. 8:e71132.
- Ambrose, M.S., C. Valdiviezo, V. Mehra, A.C. Lardo, J.A. Lima, and R.T. George. 2011. CT perfusion: ready for prime time. *Curr Cardiol Rep*. 13:57-66.
- Appelros, P., B. Stegmayr, and A. Terent. 2009. Sex differences in stroke epidemiology: a systematic review. *Stroke*. 40:1082-1090.
- Aronowski, J., R. Strong, and J.C. Grotta. 1997. Reperfusion injury: demonstration of brain damage produced by reperfusion after transient focal ischemia in rats. *J Cereb Blood Flow Metab*. 17:1048-1056.
- Atkinson, C., H. Zhu, F. Qiao, J.C. Varela, J. Yu, H. Song, M.S. Kindy, and S. Tomlinson. 2006. Complement-dependent P-selectin expression and injury following ischemic stroke. *J Immunol*. 177:7266-7274.
- Atochin, D.N., A. Wang, V.W. Liu, J.D. Critchlow, A.P. Dantas, R. Looft-Wilson, T. Murata, S. Salomone, H.K. Shin, C. Ayata, M.A. Moskowitz, T. Michel, W.C. Sessa, and P.L. Huang. 2007. The phosphorylation state of eNOS modulates vascular reactivity and outcome of cerebral ischemia in vivo. *J Clin Invest*. 117:1961-1967.
- Attwell, D., A.M. Buchan, S. Charpak, M. Lauritzen, B.A. Macvicar, and E.A. Newman. 2010. Glial and neuronal control of brain blood flow. *Nature*. 468:232-243.
- Badin, R.A., M.F. Lythgoe, L. van der Weerd, D.L. Thomas, D.G. Gadian, and D.S. Latchman. 2006. Neuroprotective effects of virally delivered HSPs in experimental stroke. *J Cereb Blood Flow Metab*. 26:371-381.
- Ballabh, P., A. Braun, and M. Nedergaard. 2004. The blood-brain barrier: an overview: structure, regulation, and clinical implications. *Neurobiol Dis*. 16:1-13.
- Barreto, G., R.E. White, Y. Ouyang, L. Xu, and R.G. Giffard. 2011. Astrocytes: targets for neuroprotection in stroke. *Cent Nerv Syst Agents Med Chem*. 11:164-173.
- Beckman, J.S. 1990. Ischaemic injury mediator. *Nature*. 345:27-28.
- Beere, H.M., B.B. Wolf, K. Cain, D.D. Mosser, A. Mahboubi, T. Kuwana, P. Taylor, R.I. Morimoto, G.M. Cohen, and D.R. Green. 2000. Heat-shock protein 70 inhibits apoptosis by preventing recruitment of procaspase-9 to the Apaf-1 apoptosome. *Nat Cell Biol*. 2:469-475.
- Bellmann, K., M. Jaattela, D. Wissing, V. Burkart, and H. Kolb. 1996. Heat shock protein hsp70 overexpression confers resistance against nitric oxide. *FEBS Lett*. 391:185-188.

BIBLIOGRAFIA

- Bernik, T.R., S.G. Friedman, M. Ochani, R. DiRaimo, L. Ulloa, H. Yang, S. Sudan, C.J. Czura, S.M. Ivanova, and K.J. Tracey. 2002. Pharmacological stimulation of the cholinergic antiinflammatory pathway. *J Exp Med.* 195:781-788.
- Boche, D., V.H. Perry, and J.A. Nicoll. 2013. Review: activation patterns of microglia and their identification in the human brain. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 39:3-18.
- Bottazzi, B., A. Doni, C. Garlanda, and A. Mantovani. 2010. An integrated view of humoral innate immunity: pentraxins as a paradigm. *Annu Rev Immunol.* 28:157-183.
- Brachvogel, B., H. Moch, F. Pausch, U. Schlotzer-Schrehardt, C. Hofmann, R. Hallmann, K. von der Mark, T. Winkler, and E. Poschl. 2005. Perivascular cells expressing annexin A5 define a novel mesenchymal stem cell-like population with the capacity to differentiate into multiple mesenchymal lineages. *Development.* 132:2657-2668.
- Braeuninger, S., and C. Kleinschnitz. 2009. Rodent models of focal cerebral ischemia: procedural pitfalls and translational problems. *Exp Transl Stroke Med.* 1:8.
- Brint, S., M. Jacewicz, M. Kiessling, J. Tanabe, and W. Pulsinelli. 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.
- Buzzard, K.A., A.J. Giaccia, M. Killender, and R.L. Anderson. 1998. Heat shock protein 72 modulates pathways of stress-induced apoptosis. *J Biol Chem.* 273:17147-17153.
- Candelario-Jalil, E., A. Gonzalez-Falcon, M. Garcia-Cabrera, O.S. Leon, and B.L. Fiebich. 2007a. Post-ischaemic treatment with the cyclooxygenase-2 inhibitor nimesulide reduces blood-brain barrier disruption and leukocyte infiltration following transient focal cerebral ischaemia in rats. *J Neurochem.* 100:1108-1120.
- Candelario-Jalil, E., S. Taheri, Y. Yang, R. Sood, M. Grossetete, E.Y. Estrada, B.L. Fiebich, and G.A. Rosenberg. 2007b. Cyclooxygenase inhibition limits blood-brain barrier disruption following intracerebral injection of tumor necrosis factor-alpha in the rat. *J Pharmacol Exp Ther.* 323:488-498.
- Candelario-Jalil, E., Y. Yang, and G.A. Rosenberg. 2009. Diverse roles of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in neuroinflammation and cerebral ischemia. *Neuroscience.* 158:983-994.
- Caso, J.R., J.M. Pradillo, O. Hurtado, P. Lorenzo, M.A. Moro, and I. Lizasoain. 2007. Toll-like receptor 4 is involved in brain damage and inflammation after experimental stroke. *Circulation.* 115:1599-1608.
- Cervera, A., A.M. Planas, C. Justicia, X. Urra, J.C. Jensenius, F. Torres, F. Lozano, and A. Chamorro. 2010. Genetically-defined deficiency of mannose-binding lectin is associated with protection after experimental stroke in mice and outcome in human stroke. *PLoS One.* 5:e8433.
- Cesarman-Maus, G., and K.A. Hajjar. 2005. Molecular mechanisms of fibrinolysis. *Br J Haematol.* 129:307-321.
- Chamorro, A., X. Urra, and A.M. Planas. 2007. Infection after acute ischemic stroke: a manifestation of brain-induced immunodepression. *Stroke.* 38:1097-1103.
- Chan, P.H. 1996. Role of oxidants in ischemic brain damage. *Stroke.* 27:1124-1129.

BIBLIOGRAFIA

- Chan, R.K., S.I. Ibrahim, K. Takahashi, E. Kwon, M. McCormack, A. Ezekowitz, M.C. Carroll, F.D. Moore, Jr., and W.G. Austen, Jr. 2006. The differing roles of the classical and mannose-binding lectin complement pathways in the events following skeletal muscle ischemia-reperfusion. *J Immunol.* 177:8080-8085.
- Chance, B., H. Sies, and A. Boveris. 1979. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev.* 59:527-605.
- Chen, G., C. Kelly, K. Stokes, J.H. Wang, A. Leahy, and D. Bouchier-Hayes. 1997. Induction of heat shock protein 72kDa expression is associated with attenuation of ischaemia-reperfusion induced microvascular injury. *J Surg Res.* 69:435-439.
- Chong, Z.Z., Q.P. Xu, and J.N. Sun. 2001. Effects and mechanisms of triacetylshikimic acid on platelet adhesion to neutrophils induced by thrombin and reperfusion after focal cerebral ischemia in rats. *Acta Pharmacol Sin.* 22:679-684.
- Colton, C.A. 2013. Immune heterogeneity in neuroinflammation: dendritic cells in the brain. *J Neuroimmune Pharmacol.* 8:145-162.
- Connolly, E.S., Jr., C.J. Winfree, D.M. Stern, R.A. Solomon, and D.J. Pinsky. 1996. Procedural and strain-related variables significantly affect outcome in a murine model of focal cerebral ischemia. *Neurosurgery.* 38:523-531; discussion 532.
- Costa, C., L. Zhao, Y. Shen, X. Su, L. Hao, S.P. Colgan, G.L. Stahl, T. Zhou, and Y. Wang. 2006. Role of complement component C5 in cerebral ischemia/reperfusion injury. *Brain Res.* 1100:142-151.
- Cowell, R.M., J.M. Plane, and F.S. Silverstein. 2003. Complement activation contributes to hypoxic-ischemic brain injury in neonatal rats. *J Neurosci.* 23:9459-9468.
- Crack, P.J., and J.M. Taylor. 2005. Reactive oxygen species and the modulation of stroke. *Free Radic Biol Med.* 38:1433-1444.
- Creagh, E.M., R.J. Carmody, and T.G. Cotter. 2000. Heat shock protein 70 inhibits caspase-dependent and -independent apoptosis in Jurkat T cells. *Exp Cell Res.* 257:58-66.
- D'Ambrosio, A.L., D.J. Pinsky, and E.S. Connolly. 2001. The role of the complement cascade in ischemia/reperfusion injury: implications for neuroprotection. *Mol Med.* 7:367-382.
- De Simoni, M.G., E. Rossi, C. Storini, S. Pizzimenti, C. Echart, and L. Bergamaschini. 2004. The powerful neuroprotective action of C1-inhibitor on brain ischemia-reperfusion injury does not require C1q. *Am J Pathol.* 164:1857-1863.
- de Vries, B., S.J. Walter, C.J. Peutz-Kootstra, T.G. Wolfs, L.W. van Heurn, and W.A. Buurman. 2004. The mannose-binding lectin-pathway is involved in complement activation in the course of renal ischemia-reperfusion injury. *Am J Pathol.* 165:1677-1688.
- Dejonckheere, E., R.E. Vandenbroucke, and C. Libert. 2011. Matrix metalloproteinases as drug targets in ischemia/reperfusion injury. *Drug Discov Today.* 16:762-778.
- del Zoppo, G.J. 2006. Stroke and neurovascular protection. *N Engl J Med.* 354:553-555.
- del Zoppo, G.J. 2009. Inflammation and the neurovascular unit in the setting of focal cerebral ischemia. *Neuroscience.* 158:972-982.

BIBLIOGRAFIA

- del Zoppo, G.J., and T. Mabuchi. 2003. Cerebral microvessel responses to focal ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab.* 23:879-894.
- del Zoppo, G.J., R. Milner, T. Mabuchi, S. Hung, X. Wang, G.I. Berg, and J.A. Koziol. 2007. Microglial activation and matrix protease generation during focal cerebral ischemia. *Stroke.* 38:646-651.
- del Zoppo, G.J., G.W. Schmid-Schonbein, E. Mori, B.R. Copeland, and C.M. Chang. 1991. Polymorphonuclear leukocytes occlude capillaries following middle cerebral artery occlusion and reperfusion in baboons. *Stroke.* 22:1276-1283.
- Diener, H.C., K.R. Lees, P. Lyden, J. Grotta, A. Davalos, S.M. Davis, A. Shuaib, T. Ashwood, W. Wasiewski, V. Alderfer, H.G. Hardemark, L. Rodichok, I. Saint, and I.I. Investigators. 2008. NXY-059 for the treatment of acute stroke: pooled analysis of the SAINT I and II Trials. *Stroke.* 39:1751-1758.
- Ding, X.Z., C.M. Fernandez-Prada, A.K. Bhattacharjee, and D.L. Hoover. 2001. Over-expression of hsp-70 inhibits bacterial lipopolysaccharide-induced production of cytokines in human monocyte-derived macrophages. *Cytokine.* 16:210-219.
- Dirnagl, U., C. Iadecola, and M.A. Moskowitz. 1999. Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. *Trends Neurosci.* 22:391-397.
- Doepfner, T.R., F. Nagel, G.P. Dietz, J. Weise, L. Tonges, S. Schwarting, and M. Bahr. 2009. TAT-Hsp70-mediated neuroprotection and increased survival of neuronal precursor cells after focal cerebral ischemia in mice. *J Cereb Blood Flow Metab.* 29:1187-1196.
- Dommett, R.M., N. Klein, and M.W. Turner. 2006. Mannose-binding lectin in innate immunity: past, present and future. *Tissue Antigens.* 68:193-209.
- Dore-Duffy, P., A. Katychev, X. Wang, and E. Van Buren. 2006. CNS microvascular pericytes exhibit multipotential stem cell activity. *J Cereb Blood Flow Metab.* 26:613-624.
- Dobrovina, M., J.T. Che, I. Serganova, E. Moroz, D.B. Solit, L. Ageyeva, T. Kochetkova, N. Pillarsetti, R. Finn, N. Rosen, and R.G. Blasberg. 2012. Monitoring the induction of heat shock factor 1/heat shock protein 70 expression following 17-allylamino-demethoxygeldanamycin treatment by positron emission tomography and optical reporter gene imaging. *Mol Imaging.* 11:67-76.
- Drose, S. 2013. Differential effects of complex II on mitochondrial ROS production and their relation to cardioprotective pre- and postconditioning. *Biochim Biophys Acta.* 1827:578-587.
- Ducruet, A.F., B.G. Hassid, W.J. Mack, S.A. Sosunov, M.L. Otten, D.J. Fusco, Z.L. Hickman, G.H. Kim, R.J. Komotar, J. Mocco, and E.S. Connolly. 2008. C3a receptor modulation of granulocyte infiltration after murine focal cerebral ischemia is reperfusion dependent. *J Cereb Blood Flow Metab.* 28:1048-1058.
- Elenkov, I.J., R.L. Wilder, G.P. Chrousos, and E.S. Vizi. 2000. The sympathetic nerve--an integrative interface between two supersystems: the brain and the immune system. *Pharmacol Rev.* 52:595-638.
- Elham, A., Z. Wuding, and S. S. 2010. Complement in organ transplantation. *Current Opinion in Organ Transplantation.* 15:486-491.
- Eltzschig, H.K., and P. Carmeliet. 2011. Hypoxia and inflammation. *N Engl J Med.* 364:656-665.

BIBLIOGRAFIA

- Elvington, A., C. Atkinson, L. Kulik, H. Zhu, J. Yu, M.S. Kindy, V.M. Holers, and S. Tomlinson. 2012. Pathogenic natural antibodies propagate cerebral injury following ischemic stroke in mice. *J Immunol.* 188:1460-1468.
- Endo, Y., N. Nakazawa, D. Iwaki, M. Takahashi, M. Matsushita, and T. Fujita. 2010. Interactions of ficolin and mannose-binding lectin with fibrinogen/fibrin augment the lectin complement pathway. *J Innate Immun.* 2:33-42.
- Esmaili, A., S. Dadkhahfar, K. Fadakar, and N. Rezaei. 2012. Post-stroke immunodeficiency: effects of sensitization and tolerization to brain antigens. *Int Rev Immunol.* 31:396-409.
- Feinstein, D.L., E. Galea, D.A. Aquino, G.C. Li, H. Xu, and D.J. Reis. 1996. Heat shock protein 70 suppresses astroglial-inducible nitric-oxide synthase expression by decreasing NFkappaB activation. *J Biol Chem.* 271:17724-17732.
- Felger, J.C., T. Abe, U.W. Kaunzner, A. Gottfried-Blackmore, J. Gal-Toth, B.S. McEwen, C. Iadecola, and K. Bulloch. 2010. Brain dendritic cells in ischemic stroke: time course, activation state, and origin. *Brain Behav Immun.* 24:724-737.
- Figuroa, E., L.E. Gordon, P.W. Feldhoff, and H.A. Lassiter. 2005. The administration of cobra venom factor reduces post-ischemic cerebral injury in adult and neonatal rats. *Neurosci Lett.* 380:48-53.
- Fisk, J.R., M. Bender, and G. Owens. 1969. Experimental cerebrovascular occlusion. New technic for evaluation. *N Y State J Med.* 69:537-541.
- Flamm, E.S., H.B. Demopoulos, M.L. Seligman, R.G. Poser, and J. Ransohoff. 1978. Free radicals in cerebral ischemia. *Stroke.* 9:445-447.
- Foster, J.A., and I.R. Brown. 1997. Differential induction of heat shock mRNA in oligodendrocytes, microglia, and astrocytes following hyperthermia. *Brain Res Mol Brain Res.* 45:207-218.
- Friedman, G.C., and N.W. Seeds. 1994. Tissue plasminogen activator expression in the embryonic nervous system. *Brain Res Dev Brain Res.* 81:41-49.
- Fromm, A., U. Waje-Andreassen, L. Thomassen, and H. Naess. 2011. Comparison between Ischemic Stroke Patients <50 Years and >=50 Years Admitted to a Single Centre: The Bergen Stroke Study. *Stroke Res Treat.* 2011:183256.
- Garred, P., F. Larsen, H.O. Madsen, and C. Koch. 2003. Mannose-binding lectin deficiency--revisited. *Mol Immunol.* 40:73-84.
- Garred, P., F. Larsen, J. Seyfarth, R. Fujita, and H.O. Madsen. 2006. Mannose-binding lectin and its genetic variants. *Genes Immun.* 7:85-94.
- Gasche, Y., P.M. Socal, M. Kanemitsu, and J.C. Copin. 2006. Matrix metalloproteinases and diseases of the central nervous system with a special emphasis on ischemic brain. *Front Biosci.* 11:1289-1301.
- Gelderblom, M., F. Leyboldt, K. Steinbach, D. Behrens, C.U. Choe, D.A. Siler, T.V. Arumugam, E. Orthey, C. Gerloff, E. Tolosa, and T. Magnus. 2009. Temporal and spatial dynamics of cerebral immune cell accumulation in stroke. *Stroke.* 40:1849-1857.
- Gesuete, R., C. Storini, A. Fantin, M. Stravalaci, E.R. Zanier, F. Orsini, H. Vietsch, M.L. Mannesse, B. Ziere, M. Gobbi, and M.G. De Simoni. 2009. Recombinant C1 inhibitor in brain ischemic injury. *Ann Neurol.* 66:332-342.
- Giffard, R.G., L. Xu, H. Zhao, W. Carrico, Y. Ouyang, Y. Qiao, R. Sapolsky, G. Steinberg, B. Hu, and M.A. Yenari. 2004. Chaperones, protein aggregation, and brain protection from hypoxic/ischemic injury. *J Exp Biol.* 207:3213-3220.

BIBLIOGRAFIA

- Giffard, R.G., and M.A. Yenari. 2004. Many mechanisms for hsp70 protection from cerebral ischemia. *J Neurosurg Anesthesiol.* 16:53-61.
- Ginhoux, F., M. Greter, M. Leboeuf, S. Nandi, P. See, S. Gokhan, M.F. Mehler, S.J. Conway, L.G. Ng, E.R. Stanley, I.M. Samokhvalov, and M. Merad. 2010. Fate mapping analysis reveals that adult microglia derive from primitive macrophages. *Science.* 330:841-845.
- Gonzalez, R.G., P.W. Schaefer, F.S. Buonanno, L.H. Schwamm, R.F. Budzik, G. Rordorf, B. Wang, A.G. Sorensen, and W.J. Koroshetz. 1999. Diffusion-weighted MR imaging: diagnostic accuracy in patients imaged within 6 hours of stroke symptom onset. *Radiology.* 210:155-162.
- Gorina, R., V. Petegnief, A. Chamorro, and A.M. Planas. 2005. AG490 prevents cell death after exposure of rat astrocytes to hydrogen peroxide or proinflammatory cytokines: involvement of the Jak2/STAT pathway. *J Neurochem.* 92:505-518.
- Goto, S., K. Sampei, N.J. Alkayed, S. Dore, and R.C. Koehler. 2003. Characterization of a new double-filament model of focal cerebral ischemia in heme oxygenase-2-deficient mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 285:R222-230.
- Gourley, J.K., and D.D. Heistad. 1984. Characteristics of reactive hyperemia in the cerebral circulation. *Am J Physiol.* 246:H52-58.
- Gundersen, G.A., G.F. Vindedal, O. Skare, and E.A. Nagelhus. 2013. Evidence that pericytes regulate aquaporin-4 polarization in mouse cortical astrocytes. *Brain Struct Funct.*
- Hacke, W., M. Kaste, E. Bluhmki, M. Brozman, A. Davalos, D. Guidetti, V. Larrue, K.R. Lees, Z. Medeghri, T. Machnig, D. Schneider, R. von Kummer, N. Wahlgren, D. Toni, and E. Investigators. 2008. Thrombolysis with alteplase 3 to 4.5 hours after acute ischemic stroke. *N Engl J Med.* 359:1317-1329.
- Halleskog, C., J. Mulder, J. Dahlstrom, K. Mackie, T. Hortobagyi, H. Tanila, L. Kumar Puli, K. Farber, T. Harkany, and G. Schulte. 2011. WNT signaling in activated microglia is proinflammatory. *Glia.* 59:119-131.
- Harhausen, D., U. Khojasteh, P.F. Stahel, B.P. Morgan, W. Nietfeld, U. Dirnagl, and G. Trendelenburg. 2010. Membrane attack complex inhibitor CD59a protects against focal cerebral ischemia in mice. *J Neuroinflammation.* 7:15.
- Hart, M.L., K.A. Ceonzo, L.A. Shaffer, K. Takahashi, R.P. Rother, W.R. Reenstra, J.A. Buras, and G.L. Stahl. 2005. Gastrointestinal ischemia-reperfusion injury is lectin complement pathway dependent without involving C1q. *J Immunol.* 174:6373-6380.
- Hata, R., K. Maeda, D. Hermann, G. Mies, and K.A. Hossmann. 2000. Evolution of brain infarction after transient focal cerebral ischemia in mice. *J Cereb Blood Flow Metab.* 20:937-946.
- Hayashi, K., S. Nakao, R. Nakaoka, S. Nakagawa, N. Kitagawa, and M. Niwa. 2004. Effects of hypoxia on endothelial/pericytic co-culture model of the blood-brain barrier. *Regul Pept.* 123:77-83.
- Hayashi, Y., Y. Sawa, N. Fukuyama, H. Nakazawa, and H. Matsuda. 2002. Preoperative glutamine administration induces heat-shock protein 70 expression and attenuates cardiopulmonary bypass-induced inflammatory response by regulating nitric oxide synthase activity. *Circulation.* 106:2601-2607.

BIBLIOGRAFIA

- Hayon, Y., E. Shai, D. Varon, and R.R. Leker. 2012. The role of platelets and their microparticles in rehabilitation of ischemic brain tissue. *CNS Neurol Disord Drug Targets*. 11:921-925.
- Hess, K., R. Ajjan, F. Phoenix, J. Dobo, P. Gal, and V. Schroeder. 2012. Effects of MASP-1 of the complement system on activation of coagulation factors and plasma clot formation. *PLoS One*. 7:e35690.
- Hoehn, B., T.M. Ringer, L. Xu, R.G. Giffard, R.M. Sapolsky, G.K. Steinberg, and M.A. Yenari. 2001. Overexpression of HSP72 after induction of experimental stroke protects neurons from ischemic damage. *J Cereb Blood Flow Metab*. 21:1303-1309.
- Hossmann, K.A. 1998. Experimental models for the investigation of brain ischemia. *Cardiovasc Res*. 39:106-120.
- Hossmann, K.A. 2006. Pathophysiology and therapy of experimental stroke. *Cell Mol Neurobiol*. 26:1057-1083.
- Hourcade, D.E., and L.M. Mitchell. 2011. Access to the complement factor B scissile bond is facilitated by association of factor B with C3b protein. *J Biol Chem*. 286:35725-35732.
- Hovsepian, D., and S. Karceski. 2013. Stroke, tPA, and physician decision-making. *Neurology*. 81:e102-105.
- Huang, P., Y. Huo, L.X. Lou, H. Li, C.J. Barnstable, C. Zhang, and S.S. Zhang. 2013. CD4 positive T helper cells contribute to retinal ganglion cell death in mouse model of ischemia reperfusion injury. *Exp Eye Res*. 115C:131-139.
- Huber-Lang, M., J.V. Sarma, F.S. Zetoune, D. Rittirsch, T.A. Neff, S.R. McGuire, J.D. Lambris, R.L. Warner, M.A. Flierl, L.M. Hoesel, F. Gebhard, J.G. Younger, S.M. Drouin, R.A. Wetsel, and P.A. Ward. 2006. Generation of C5a in the absence of C3: a new complement activation pathway. *Nat Med*. 12:682-687.
- Hudgins, W.R., and J.H. Garcia. 1970. Transorbital approach to the middle cerebral artery of the squirrel monkey: a technique for experimental cerebral infarction applicable to ultrastructural studies. *Stroke*. 1:107-111.
- Huxley, R.R., K.B. Filion, S. Konety, and A. Alonso. 2011. Meta-analysis of cohort and case-control studies of type 2 diabetes mellitus and risk of atrial fibrillation. *Am J Cardiol*. 108:56-62.
- Iadecola, C., and M. Nedergaard. 2007. Glial regulation of the cerebral microvasculature. *Nat Neurosci*. 10:1369-1376.
- Iadecola, C., K. Niwa, S. Nogawa, X. Zhao, M. Nagayama, E. Araki, S. Morham, and M.E. Ross. 2001. Reduced susceptibility to ischemic brain injury and N-methyl-D-aspartate-mediated neurotoxicity in cyclooxygenase-2-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 98:1294-1299.
- Jaattela, M., D. Wissing, K. Kokholm, T. Kallunki, and M. Egeblad. 1998. Hsp70 exerts its anti-apoptotic function downstream of caspase-3-like proteases. *EMBO J*. 17:6124-6134.
- Jacob-Ferreira, A.L., M.Y. Kondo, P.K. Baral, M.N. James, A. Holt, X. Fan, and R. Schulz. 2013. Phosphorylation Status of 72 kDa MMP-2 Determines Its Structure and Activity in Response to Peroxynitrite. *PLoS One*. 8:e71794.
- Jander, S., M. Kraemer, M. Schroeter, O.W. Witte, and G. Stoll. 1995. Lymphocytic infiltration and expression of intercellular adhesion molecule-1 in

BIBLIOGRAFIA

- photochemically induced ischemia of the rat cortex. *J Cereb Blood Flow Metab.* 15:42-51.
- Javier, D.J., A. Castellanos-Gonzalez, S.E. Weigum, A.C. White, Jr., and R. Richards-Kortum. 2009. Oligonucleotide-gold nanoparticle networks for detection of *Cryptosporidium parvum* heat shock protein 70 mRNA. *J Clin Microbiol.* 47:4060-4066.
- Jian Liu, K., and G.A. Rosenberg. 2005. Matrix metalloproteinases and free radicals in cerebral ischemia. *Free Radic Biol Med.* 39:71-80.
- Justicia, C., C. Gabriel, and A.M. Planas. 2000. Activation of the JAK/STAT pathway following transient focal cerebral ischemia: signaling through Jak1 and Stat3 in astrocytes. *Glia.* 30:253-270.
- Justicia, C., J. Panes, S. Sole, A. Cervera, R. Deulofeu, A. Chamorro, and A.M. Planas. 2003. Neutrophil infiltration increases matrix metalloproteinase-9 in the ischemic brain after occlusion/reperfusion of the middle cerebral artery in rats. *J Cereb Blood Flow Metab.* 23:1430-1440.
- Kalogeris, T., C.P. Baines, M. Krenz, and R.J. Korthuis. 2012. Cell biology of ischemia/reperfusion injury. *Int Rev Cell Mol Biol.* 298:229-317.
- Kamouchi, M., T. Ago, and T. Kitazono. 2011. Brain pericytes: emerging concepts and functional roles in brain homeostasis. *Cell Mol Neurobiol.* 31:175-193.
- Kamouchi, M., T. Ago, J. Kuroda, and T. Kitazono. 2012. The possible roles of brain pericytes in brain ischemia and stroke. *Cell Mol Neurobiol.* 32:159-165.
- Kelly, S., Z.J. Zhang, H. Zhao, L. Xu, R.G. Giffard, R.M. Sapolsky, M.A. Yenari, and G.K. Steinberg. 2002. Gene transfer of HSP72 protects cornu ammonis 1 region of the hippocampus neurons from global ischemia: influence of Bcl-2. *Ann Neurol.* 52:160-167.
- Kemper, C., J.P. Atkinson, and D.E. Hourcade. 2010. Properdin: emerging roles of a pattern-recognition molecule. *Annu Rev Immunol.* 28:131-155.
- Kiang, J.G., and G.C. Tsokos. 1998. Heat shock protein 70 kDa: molecular biology, biochemistry, and physiology. *Pharmacol Ther.* 80:183-201.
- Kidwell, C.S., J.L. Saver, J. Mattiello, S. Starkman, F. Vinuela, G. Duckwiler, Y.P. Gobin, R. Jahan, P. Vespa, J.P. Villablanca, D.S. Liebeskind, R.P. Woods, and J.R. Alger. 2001. Diffusion-perfusion MRI characterization of post-recanalization hyperperfusion in humans. *Neurology.* 57:2015-2021.
- Kinouchi, H., F.R. Sharp, M.P. Hill, J. Koistinaho, S.M. Sagar, and P.H. Chan. 1993a. Induction of 70-kDa heat shock protein and hsp70 mRNA following transient focal cerebral ischemia in the rat. *J Cereb Blood Flow Metab.* 13:105-115.
- Kinouchi, H., F.R. Sharp, J. Koistinaho, K. Hicks, H. Kamii, and P.H. Chan. 1993b. Induction of heat shock hsp70 mRNA and HSP70 kDa protein in neurons in the 'penumbra' following focal cerebral ischemia in the rat. *Brain Res.* 619:334-338.
- Kokovay, E., L. Li, and L.A. Cunningham. 2006. Angiogenic recruitment of pericytes from bone marrow after stroke. *J Cereb Blood Flow Metab.* 26:545-555.
- Konsman, J.P., B. Drukarch, and A.M. Van Dam. 2007. (Peri)vascular production and action of pro-inflammatory cytokines in brain pathology. *Clin Sci (Lond).* 112:1-25.

BIBLIOGRAFIA

- Kouser, L., M. Abdul-Aziz, A. Nayak, C.M. Stover, R.B. Sim, and U. Kishore. 2013. Properdin and factor h: opposing players on the alternative complement pathway "see-saw". *Front Immunol.* 4:93.
- Krarp, A., R. Wallis, J.S. Presanis, P. Gal, and R.B. Sim. 2007. Simultaneous activation of complement and coagulation by MBL-associated serine protease 2. *PLoS One.* 2:e623.
- Kunz, A., J. Anrather, P. Zhou, M. Orio, and C. Iadecola. 2007. Cyclooxygenase-2 does not contribute to postischemic production of reactive oxygen species. *J Cereb Blood Flow Metab.* 27:545-551.
- Kutala, V.K., M. Khan, M.G. Angelos, and P. Kuppusamy. 2007. Role of oxygen in postischemic myocardial injury. *Antioxid Redox Signal.* 9:1193-1206.
- Kwan, J., H.C. Roberts, and N. Englyst. 2006. Do we really understand the pathophysiology and clinical impact of poststroke infection? *Stroke.* 37:1656; author reply 1657.
- Kwon, H.M., Y. Kim, S.I. Yang, Y.J. Kim, S.H. Lee, and B.W. Yoon. 2008. Geldanamycin protects rat brain through overexpression of HSP70 and reducing brain edema after cerebral focal ischemia. *Neurol Res.* 30:740-745.
- Lamagna, C., and G. Bergers. 2006. The bone marrow constitutes a reservoir of pericyte progenitors. *J Leukoc Biol.* 80:677-681.
- Lambertsen, K.L., K. Biber, and B. Finsen. 2012. Inflammatory cytokines in experimental and human stroke. *J Cereb Blood Flow Metab.* 32:1677-1698.
- Lassmann, H., M. Schmied, K. Vass, and W.F. Hickey. 1993. Bone marrow derived elements and resident microglia in brain inflammation. *Glia.* 7:19-24.
- Laursen, N.S., F. Magnani, R.H. Gottfredsen, S.V. Petersen, and G.R. Andersen. 2012. Structure, function and control of complement C5 and its proteolytic fragments. *Curr Mol Med.* 12:1083-1097.
- Lee, J.E., Y.J. Kim, J.Y. Kim, W.T. Lee, M.A. Yenari, and R.G. Giffard. 2004. The 70 kDa heat shock protein suppresses matrix metalloproteinases in astrocytes. *Neuroreport.* 15:499-502.
- Lehnardt, S., L. Massillon, P. Follett, F.E. Jensen, R. Ratan, P.A. Rosenberg, J.J. Volpe, and T. Vartanian. 2003. Activation of innate immunity in the CNS triggers neurodegeneration through a Toll-like receptor 4-dependent pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100:8514-8519.
- Lev, M.H., A.Z. Segal, J. Farkas, S.T. Hossain, C. Putman, G.J. Hunter, R. Budzik, G.J. Harris, F.S. Buonanno, M.A. Ezzeddine, Y. Chang, W.J. Koroshetz, R.G. Gonzalez, and L.H. Schwamm. 2001. Utility of perfusion-weighted CT imaging in acute middle cerebral artery stroke treated with intra-arterial thrombolysis: prediction of final infarct volume and clinical outcome. *Stroke.* 32:2021-2028.
- Levine, S., and H. Payan. 1966. Effects of ischemia and other procedures on the brain and retina of the gerbil (*Meriones unguiculatus*). *Exp Neurol.* 16:255-262.
- Li, P., Y. Gan, B.L. Sun, F. Zhang, B. Lu, Y. Gao, W. Liang, A.W. Thomson, J. Chen, and X. Hu. 2012. Adoptive regulatory T-cell therapy protects against cerebral ischemia. *Ann Neurol.*
- Liebeskind, D.S., and N. Sanossian. 2012. How well do blood flow imaging and collaterals on angiography predict brain at risk? *Neurology.* 79:S105-109.

BIBLIOGRAFIA

- Lindsberg, P.J., D. Strbian, and M.L. Karjalainen-Lindsberg. 2010. Mast cells as early responders in the regulation of acute blood-brain barrier changes after cerebral ischemia and hemorrhage. *J Cereb Blood Flow Metab.* 30:689-702.
- Lipton, P. 1999. Ischemic cell death in brain neurons. *Physiol Rev.* 79:1431-1568.
- Liu, F., R. Yuan, S.E. Benashski, and L.D. McCullough. 2009. Changes in experimental stroke outcome across the life span. *J Cereb Blood Flow Metab.* 29:792-802.
- Lo, E.H., J.P. Broderick, and M.A. Moskowitz. 2004. tPA and proteolysis in the neurovascular unit. *Stroke.* 35:354-356.
- Lo, E.H., T. Dalkara, and M.A. Moskowitz. 2003. Mechanisms, challenges and opportunities in stroke. *Nat Rev Neurosci.* 4:399-415.
- Longa, E.Z., P.R. Weinstein, S. Carlson, and R. Cummins. 1989. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *Stroke.* 20:84-91.
- Lopez-Atalaya, J.P., B.D. Roussel, D. Levrat, J. Parcq, O. Nicole, Y. Hommet, K. Benchenane, H. Castel, J. Leprince, D. To Van, R. Bureau, S. Rault, H. Vaudry, K.U. Petersen, J.S. Santos, C. Ali, and D. Vivien. 2008. Toward safer thrombolytic agents in stroke: molecular requirements for NMDA receptor-mediated neurotoxicity. *J Cereb Blood Flow Metab.* 28:1212-1221.
- Lu, A., R. Ran, S. Parmentier-Batteur, A. Nee, and F.R. Sharp. 2002. Geldanamycin induces heat shock proteins in brain and protects against focal cerebral ischemia. *J Neurochem.* 81:355-364.
- Macfarlane, R., E. Tasdemiroglu, M.A. Moskowitz, Y. Uemura, E.P. Wei, and H.A. Kontos. 1991. Chronic trigeminal ganglionectomy or topical capsaicin application to pial vessels attenuates postocclusive cortical hyperemia but does not influence postischemic hypoperfusion. *J Cereb Blood Flow Metab.* 11:261-271.
- Madsen, H.O., M.L. Satz, B. Høgh, A. Svejgaard, and P. Garred. 1998. Different molecular events result in low protein levels of mannan-binding lectin in populations from southeast Africa and South America. *J Immunol.* 161:3169-3175.
- Mamatha, H., A.S. D'Souza, Pallavi, and S. Suhani. 2012. Human cadaveric study of the morphology of the basilar artery. *Singapore Med J.* 53:760-763.
- Markiewski, M.M., B. Nilsson, K.N. Ekdahl, T.E. Mollnes, and J.D. Lambris. 2007. Complement and coagulation: strangers or partners in crime? *Trends Immunol.* 28:184-192.
- Marks, R., and K. McNeil. 2009. Significance of reversal of diastolic blood flow in the evolution of testicular infarction as a complication of epididymo-orchitis. *J Radiol Case Rep.* 3:21-25.
- Marler, J.R. 1995. Tissue plasminogen activator for acute ischemic stroke. *The New England Journal of Medicine.* 333:1581-1587.
- Mastellos, D., and J.D. Lambris. 2002. Complement: more than a 'guard' against invading pathogens? *Trends Immunol.* 23:485-491.
- Matsumori, Y., S.M. Hong, K. Aoyama, Y. Fan, T. Kayama, R.A. Sheldon, Z.S. Vexler, D.M. Ferriero, P.R. Weinstein, and J. Liu. 2005. Hsp70 overexpression sequesters AIF and reduces neonatal hypoxic/ischemic brain injury. *J Cereb Blood Flow Metab.* 25:899-910.
- Matsumoto, H., Y. Kumon, H. Watanabe, T. Ohnishi, H. Takahashi, Y. Imai, and J. Tanaka. 2007. Expression of CD200 by macrophage-like cells in ischemic core

BIBLIOGRAFIA

- of rat brain after transient middle cerebral artery occlusion. *Neurosci Lett.* 418:44-48.
- Mattila, K.J., V.V. Valtonen, M.S. Nieminen, and S. Asikainen. 1998. Role of infection as a risk factor for atherosclerosis, myocardial infarction, and stroke. *Clin Infect Dis.* 26:719-734.
- Mazighi, M., J.M. Serfaty, J. Labreuche, J.P. Laissy, E. Meseguer, P.C. Lavallee, L. Cabrejo, T. Slaoui, C. Guidoux, B. Lapergue, I.F. Klein, J.M. Olivot, H. Abboud, O. Simon, P. Niclot, C. Nifle, P.J. Touboul, G. Raphaeli, C. Gohin, E.S. Claeys, P. Amarenco, and R. investigators. 2009. Comparison of intravenous alteplase with a combined intravenous-endovascular approach in patients with stroke and confirmed arterial occlusion (RECANALISE study): a prospective cohort study. *Lancet Neurol.* 8:802-809.
- McMullen, M.E., M.L. Hart, M.C. Walsh, J. Buras, K. Takahashi, and G.L. Stahl. 2006. Mannose-binding lectin binds IgM to activate the lectin complement pathway in vitro and in vivo. *Immunobiology.* 211:759-766.
- Meisel, C., J.M. Schwab, K. Prass, A. Meisel, and U. Dirnagl. 2005. Central nervous system injury-induced immune deficiency syndrome. *Nat Rev Neurosci.* 6:775-786.
- Memezawa, H., M.L. Smith, and B.K. Siesjo. 1992. Penumbra tissues salvaged by reperfusion following middle cerebral artery occlusion in rats. *Stroke.* 23:552-559.
- Mestas, J., and C.C. Hughes. 2004. Of mice and not men: differences between mouse and human immunology. *J Immunol.* 172:2731-2738.
- Michalski, D., C. Hobohm, C. Weise, J. Pelz, M. Heindl, M. Kamprad, J. Kacza, and W. Hartig. 2012. Interrelations between blood-brain barrier permeability and matrix metalloproteinases are differently affected by tissue plasminogen activator and hyperoxia in a rat model of embolic stroke. *Med Gas Res.* 2:2.
- Minematsu, K., L. Li, M. Fisher, C.H. Sotak, M.A. Davis, and M.S. Fiandaca. 1992. Diffusion-weighted magnetic resonance imaging: rapid and quantitative detection of focal brain ischemia. *Neurology.* 42:235-240.
- Minor, K., J. Phillips, and N.W. Seeds. 2009. Tissue plasminogen activator promotes axonal outgrowth on CNS myelin after conditioned injury. *J Neurochem.* 109:706-715.
- Miranda, M., M. Muriach, I. Almansa, E. Arnal, A. Messeguer, M. Diaz-Llopis, F.J. Romero, and F. Bosch-Morell. 2007. CR-6 protects glutathione peroxidase activity in experimental diabetes. *Free Radic Biol Med.* 43:1494-1498.
- Mocco, J., W.J. Mack, A.F. Ducruet, S.A. Sosunov, M.E. Sughrue, B.G. Hassid, M.N. Nair, I. Laufer, R.J. Komotar, M. Claire, H. Holland, D.J. Pinsky, and E.S. Connolly, Jr. 2006. Complement component C3 mediates inflammatory injury following focal cerebral ischemia. *Circ Res.* 99:209-217.
- Mohanani, A., S. Deshpande, P.G. Jamadarkhana, P. Kumar, R.C. Gupta, V. Chauthaiwale, and C. Dutt. 2011. Delayed intervention in experimental stroke with TRC051384--a small molecule HSP70 inducer. *Neuropharmacology.* 60:991-999.
- Molofsky, A.V., R. Krencik, E.M. Ullian, H.H. Tsai, B. Deneen, W.D. Richardson, B.A. Barres, and D.H. Rowitch. 2012. Astrocytes and disease: a neurodevelopmental perspective. *Genes Dev.* 26:891-907.

BIBLIOGRAFIA

- Montoliu, C., M. Llansola, R. Saez, S. Yenes, A. Messeguer, and V. Felipo. 1999. Prevention of glutamate neurotoxicity in cultured neurons by 3,4-dihydro-6-hydroxy-7-methoxy-2,2-dimethyl-1(2H)-benzopyran (CR-6), a scavenger of nitric oxide. *Biochem Pharmacol.* 58:255-261.
- Morrison, H., J. Frye, G. Davis-Gorman, J. Funk, P. McDonagh, G. Stahl, and L. Ritter. 2011. The contribution of mannose binding lectin to reperfusion injury after ischemic stroke. *Curr Neurovasc Res.* 8:52-63.
- Moseley, M.E., Y. Cohen, J. Mintorovitch, L. Chileuitt, H. Shimizu, J. Kucharczyk, M.F. Wendland, and P.R. Weinstein. 1990. Early detection of regional cerebral ischemia in cats: comparison of diffusion- and T2-weighted MRI and spectroscopy. *Magn Reson Med.* 14:330-346.
- Moskowitz, M.A., E.H. Lo, and C. Iadecola. 2010. The science of stroke: mechanisms in search of treatments. *Neuron.* 67:181-198.
- Mosser, D.D., A.W. Caron, L. Bourget, C. Denis-Larose, and B. Massie. 1997. Role of the human heat shock protein hsp70 in protection against stress-induced apoptosis. *Mol Cell Biol.* 17:5317-5327.
- Nakahara, T., S. Oki, Z. Muttaqin, S. Kuwabara, and T. Uozumi. 1991. A new model of brainstem ischemia by embolization technique in cats. *Neurosurg Rev.* 14:221-229.
- Nicchia, G.P., A. Frigeri, G.M. Liuzzi, and M. Svelto. 2003. Inhibition of aquaporin-4 expression in astrocytes by RNAi determines alteration in cell morphology, growth, and water transport and induces changes in ischemia-related genes. *FASEB J.* 17:1508-1510.
- Niewada, M., A. Kobayashi, P.A. Sandercock, B. Kaminski, A. Czlonkowska, and G. International Stroke Trial Collaborative. 2005. Influence of gender on baseline features and clinical outcomes among 17,370 patients with confirmed ischaemic stroke in the international stroke trial. *Neuroepidemiology.* 24:123-128.
- Nogueira, R.G., H.L. Lutsep, R. Gupta, T.G. Jovin, G.W. Albers, G.A. Walker, D.S. Liebeskind, W.S. Smith, and T. Trialists. 2012. Trevo versus Merci retrievers for thrombectomy revascularisation of large vessel occlusions in acute ischaemic stroke (TREVO 2): a randomised trial. *Lancet.* 380:1231-1240.
- Nowak, T.S., Jr., and M. Jacewicz. 1994. The heat shock/stress response in focal cerebral ischemia. *Brain Pathol.* 4:67-76.
- Nowak, T.S., Jr., O.C. Osborne, and S. Suga. 1993. Stress protein and proto-oncogene expression as indicators of neuronal pathophysiology after ischemia. *Prog Brain Res.* 96:195-208.
- Offner, H., A.A. Vandenbark, and P.D. Hurn. 2009. Effect of experimental stroke on peripheral immunity: CNS ischemia induces profound immunosuppression. *Neuroscience.* 158:1098-1111.
- Ogden, C.A., A. deCathelineau, P.R. Hoffmann, D. Bratton, B. Ghebrehiwet, V.A. Fadok, and P.M. Henson. 2001. C1q and mannose binding lectin engagement of cell surface calreticulin and CD91 initiates macropinocytosis and uptake of apoptotic cells. *J Exp Med.* 194:781-795.
- Ohab, J.J., S. Fleming, A. Blesch, and S.T. Carmichael. 2006. A neurovascular niche for neurogenesis after stroke. *J Neurosci.* 26:13007-13016.

BIBLIOGRAFIA

- Olivot, J.M., M. Mlynash, V.N. Thijs, S. Kemp, M.G. Lansberg, L. Wechsler, R. Bammer, M.P. Marks, and G.W. Albers. 2009. Optimal Tmax threshold for predicting penumbral tissue in acute stroke. *Stroke*. 40:469-475.
- Olsson, T., O. Hansson, J. Nylandsted, M. Jaattela, M.L. Smith, and T. Wieloch. 2004. Lack of neuroprotection by heat shock protein 70 overexpression in a mouse model of global cerebral ischemia. *Exp Brain Res*. 154:442-449.
- Orsini, F., P. Villa, S. Parrella, R. Zangari, E.R. Zanier, R. Gesuete, M. Stravalaci, S. Fumagalli, R. Ottria, J.J. Reina, A. Paladini, E. Micotti, R. Ribeiro-Viana, J. Rojo, V.I. Pavlov, G.L. Stahl, A. Bernardi, M. Gobbi, and M.G. De Simoni. 2012. Targeting mannose-binding lectin confers long-lasting protection with a surprisingly wide therapeutic window in cerebral ischemia. *Circulation*. 126:1484-1494.
- Padilla, N.D., A.K. van Vliet, I.G. Schoots, M. Valls Seron, M.A. Maas, E.E. Peltenburg, A. de Vries, H.W. Niessen, C.E. Hack, and T.M. van Gulik. 2007. C-reactive protein and natural IgM antibodies are activators of complement in a rat model of intestinal ischemia and reperfusion. *Surgery*. 142:722-733.
- Pan, J., A.A. Konstas, B. Bateman, G.A. Ortolano, and J. Pile-Spellman. 2007. Reperfusion injury following cerebral ischemia: pathophysiology, MR imaging, and potential therapies. *Neuroradiology*. 49:93-102.
- Parpura, V., and P.G. Haydon. 2009. Astrocytes in (Patho)Physiology of the Nervous System. Springer, New York.
- Peerschke, E.I., W. Yin, and B. Ghebrehiwet. 2010. Complement activation on platelets: implications for vascular inflammation and thrombosis. *Mol Immunol*. 47:2170-2175.
- Petersen, K.U., and D. Vivien. 2011. Treatment of neurological or neurodegenerative disorders Vol. WO/2011/023249
- Planas, A.M., M.A. Soriano, A. Estrada, O. Sanz, F. Martin, and I. Ferrer. 1997. The heat shock stress response after brain lesions: induction of 72 kDa heat shock protein (cell types involved, axonal transport, transcriptional regulation) and protein synthesis inhibition. *Prog Neurobiol*. 51:607-636.
- Planas, A.M., M.A. Soriano, C. Justicia, and E. Rodriguez-Farre. 1999. Induction of cyclooxygenase-2 in the rat brain after a mild episode of focal ischemia without tissue inflammation or neural cell damage. *Neurosci Lett*. 275:141-144.
- Popp, A., N. Jaenisch, O.W. Witte, and C. Frahm. 2009. Identification of ischemic regions in a rat model of stroke. *PLoS One*. 4:e4764.
- Prass, K., C. Meisel, C. Hoflich, J. Braun, E. Halle, T. Wolf, K. Ruscher, I.V. Victorov, J. Priller, U. Dirnagl, H.D. Volk, and A. Meisel. 2003. Stroke-induced immunodeficiency promotes spontaneous bacterial infections and is mediated by sympathetic activation reversal by poststroke T helper cell type 1-like immunostimulation. *J Exp Med*. 198:725-736.
- Qu, H., D. Ricklin, and J.D. Lambris. 2009. Recent developments in low molecular weight complement inhibitors. *Mol Immunol*. 47:185-195.
- Rajdev, S., K. Hara, Y. Kokubo, R. Mestril, W. Dillmann, P.R. Weinstein, and F.R. Sharp. 2000. Mice overexpressing rat heat shock protein 70 are protected against cerebral infarction. *Ann Neurol*. 47:782-791.

BIBLIOGRAFIA

- Ran, R., A. Lu, L. Zhang, Y. Tang, H. Zhu, H. Xu, Y. Feng, C. Han, G. Zhou, A.C. Rigby, and F.R. Sharp. 2004. Hsp70 promotes TNF-mediated apoptosis by binding IKK gamma and impairing NF-kappa B survival signaling. *Genes Dev.* 18:1466-1481.
- Renner, O., A. Tsimpas, S. Kostin, S. Valable, E. Petit, W. Schaper, and H.H. Marti. 2003. Time- and cell type-specific induction of platelet-derived growth factor receptor-beta during cerebral ischemia. *Brain Res Mol Brain Res.* 113:44-51.
- Ricklin, D., and J.D. Lambris. 2013. Complement in immune and inflammatory disorders: pathophysiological mechanisms. *J Immunol.* 190:3831-3838.
- Roberts, B.W., J. Mitchell, J.H. Kilgannon, M.E. Chansky, and S. Trzeciak. 2013. Nitric oxide donor agents for the treatment of ischemia/reperfusion injury in human subjects: a systematic review. *Shock.* 39:229-239.
- Robinson, R.G., W.J. Shoemaker, M. Schlumpf, T. Valk, and F.E. Bloom. 1975. Effect of experimental cerebral infarction in rat brain on catecholamines and behaviour. *Nature.* 255:332-334.
- Roger, V.L., A.S. Go, D.M. Lloyd-Jones, E.J. Benjamin, J.D. Berry, W.B. Borden, D.M. Bravata, S. Dai, E.S. Ford, C.S. Fox, H.J. Fullerton, C. Gillespie, S.M. Hailpern, J.A. Heit, V.J. Howard, B.M. Kissela, S.J. Kittner, D.T. Lackland, J.H. Lichtman, L.D. Lisabeth, D.M. Makuc, G.M. Marcus, A. Marelli, D.B. Matchar, C.S. Moy, D. Mozaffarian, M.E. Mussolino, G. Nichol, N.P. Paynter, E.Z. Soliman, P.D. Sorlie, N. Sotoodehnia, T.N. Turan, S.S. Virani, N.D. Wong, D. Woo, M.B. Turner, C. American Heart Association Statistics, and S. Stroke Statistics. 2012. Heart disease and stroke statistics--2012 update: a report from the American Heart Association. *Circulation.* 125:e2-e220.
- Rogers, D.C., C.A. Campbell, J.L. Stretton, and K.B. Mackay. 1997. Correlation between motor impairment and infarct volume after permanent and transient middle cerebral artery occlusion in the rat. *Stroke.* 28:2060-2065; discussion 2066.
- Rosenberg, G.A. 2002. Matrix metalloproteinases in neuroinflammation. *Glia.* 39:279-291.
- Saijo, K., B. Winner, C.T. Carson, J.G. Collier, L. Boyer, M.G. Rosenfeld, F.H. Gage, and C.K. Glass. 2009. A Nurr1/CoREST pathway in microglia and astrocytes protects dopaminergic neurons from inflammation-induced death. *Cell.* 137:47-59.
- Sakharov, D.V., M. Barrertt-Bergshoeff, R.T. Hekkenberg, and D.C. Rijken. 1999. Fibrin-specificity of a plasminogen activator affects the efficiency of fibrinolysis and responsiveness to ultrasound: comparison of nine plasminogen activators in vitro. *Thromb Haemost.* 81:605-612.
- Saleh, A., S.M. Srinivasula, L. Balkir, P.D. Robbins, and E.S. Alnemri. 2000. Negative regulation of the Apaf-1 apoptosome by Hsp70. *Nat Cell Biol.* 2:476-483.
- Samson, A.L., and R.L. Medcalf. 2006. Tissue-type plasminogen activator: a multifaceted modulator of neurotransmission and synaptic plasticity. *Neuron.* 50:673-678.
- Sanderson, T.H., C.A. Reynolds, R. Kumar, K. Przyklenk, and M. Huttemann. 2013. Molecular mechanisms of ischemia-reperfusion injury in brain: pivotal role of the mitochondrial membrane potential in reactive oxygen species generation. *Mol Neurobiol.* 47:9-23.

BIBLIOGRAFIA

- Sanvicens, N., V. Gomez-Vicente, A. Messeguer, and T.G. Cotter. 2006. The radical scavenger CR-6 protects SH-SY5Y neuroblastoma cells from oxidative stress-induced apoptosis: effect on survival pathways. *J Neurochem.* 98:735-747.
- Schaefer, P.W., P.E. Grant, and R.G. Gonzalez. 2000. Diffusion-weighted MR imaging of the brain. *Radiology.* 217:331-345.
- Schaller, B., and R. Graf. 2004. Cerebral ischemia and reperfusion: the pathophysiologic concept as a basis for clinical therapy. *J Cereb Blood Flow Metab.* 24:351-371.
- Schett, G., K. Redlich, Q. Xu, P. Bizan, M. Groger, M. Tohidast-Akrad, H. Kiener, J. Smolen, and G. Steiner. 1998. Enhanced expression of heat shock protein 70 (hsp70) and heat shock factor 1 (HSF1) activation in rheumatoid arthritis synovial tissue. Differential regulation of hsp70 expression and hsf1 activation in synovial fibroblasts by proinflammatory cytokines, shear stress, and antiinflammatory drugs. *J Clin Invest.* 102:302-311.
- Schroeter, M., S. Jander, O.W. Witte, and G. Stoll. 1994. Local immune responses in the rat cerebral cortex after middle cerebral artery occlusion. *J Neuroimmunol.* 55:195-203.
- Sharp, F.R., H. Kinouchi, J. Koistinaho, P.H. Chan, and S.M. Sagar. 1993. HSP70 heat shock gene regulation during ischemia. *Stroke.* 24:172-75.
- Sharp, F.R., S.M. Massa, and R.A. Swanson. 1999. Heat-shock protein protection. *Trends Neurosci.* 22:97-99.
- Sitburana, O., and W.J. Koroshetz. 2005. Magnetic resonance imaging: implication in acute ischemic stroke management. *Curr Atheroscler Rep.* 7:305-312.
- Song, D.H., and J.O. Lee. 2012. Sensing of microbial molecular patterns by Toll-like receptors. *Immunol Rev.* 250:216-229.
- Sorensen, R., S. Thiel, and J.C. Jensenius. 2005. Mannan-binding-lectin-associated serine proteases, characteristics and disease associations. *Springer Semin Immunopathol.* 27:299-319.
- Sotak, C.H. 2002. The role of diffusion tensor imaging in the evaluation of ischemic brain injury - a review. *NMR Biomed.* 15:561-569.
- Spuch, C., and C. Navarro. 2010. Transport Mechanisms at the Blood-Cerebrospinal-Fluid Barrier: Role of Megalin (LRP2). *Recent Patents on Endocrine, Metabolic & Immune Drug Discovery.* 4:190-205.
- Stapleton, P.A., A.G. Goodwill, M.E. James, R.W. Brock, and J.C. Frisbee. 2010. Hypercholesterolemia and microvascular dysfunction: interventional strategies. *J Inflamm (Lond).* 7:54.
- Stejskal, E.O., and J.E. Tanner. 1965. Spin Diffusion Measurements: Spin Echoes in the Presence of a Time-Dependent Field Gradient. *Journal of Chemical Physics.* 42.
- Stephanou, A. 2004. Role of STAT-1 and STAT-3 in ischaemia/reperfusion injury. *J Cell Mol Med.* 8:519-525.
- Storini, C., E. Rossi, V. Marrella, M. Distaso, R. Veerhuis, C. Vergani, L. Bergamaschini, and M.G. De Simoni. 2005. C1-inhibitor protects against brain ischemia-reperfusion injury via inhibition of cell recruitment and inflammation. *Neurobiol Dis.* 19:10-17.

BIBLIOGRAFIA

- Strbian, D., M.L. Karjalainen-Lindsberg, T. Tatlisumak, and P.J. Lindsberg. 2006. Cerebral mast cells regulate early ischemic brain swelling and neutrophil accumulation. *J Cereb Blood Flow Metab.* 26:605-612.
- Strickland, S. 2001. Tissue plasminogen activator in nervous system function and dysfunction. *Thromb Haemost.* 86:138-143.
- Suzumura, A. 2013. Neuron-microglia interaction in neuroinflammation. *Curr Protein Pept Sci.* 14:16-20.
- Tajes, M., G. Ill-Raga, E. Palomer, E. Ramos-Fernandez, F.X. Guix, M. Bosch-Morato, B. Guivernau, J. Jimenez-Conde, A. Ois, F. Perez-Asensio, M. Reyes-Navarro, C. Caballo, A.M. Galan, F. Alameda, G. Escolar, C. Opazo, A. Planas, J. Roquer, M.A. Valverde, and F.J. Munoz. 2013. Nitro-oxidative stress after neuronal ischemia induces protein nitrotyrosination and cell death. *Oxid Med Cell Longev.* 2013:826143.
- Takahashi, M., Y. Ishida, D. Iwaki, K. Kanno, T. Suzuki, Y. Endo, Y. Homma, and T. Fujita. 2010. Essential role of mannose-binding lectin-associated serine protease-1 in activation of the complement factor D. *J Exp Med.* 207:29-37.
- Takano, T., G.F. Tian, W. Peng, N. Lou, W. Libionka, X. Han, and M. Nedergaard. 2006. Astrocyte-mediated control of cerebral blood flow. *Nat Neurosci.* 9:260-267.
- Tamura, A., D.I. Graham, J. McCulloch, and G.M. Teasdale. 1981. Focal cerebral ischaemia in the rat: 1. Description of technique and early neuropathological consequences following middle cerebral artery occlusion. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1:53-60.
- Tang, S.C., T.V. Arumugam, X. Xu, A. Cheng, M.R. Mughal, D.G. Jo, J.D. Lathia, D.A. Siler, S. Chigurupati, X. Ouyang, T. Magnus, S. Camandola, and M.P. Mattson. 2007. Pivotal role for neuronal Toll-like receptors in ischemic brain injury and functional deficits. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 104:13798-13803.
- Terlecki, S., B.A. Baldwin, and F.R. Bell. 1967. Experimental cerebral ischaemia in sheep. Neuropathology and clinical effects. *Acta Neuropathol.* 7:185-200.
- Tomandl, B.F., E. Klotz, R. Handschu, B. Stemper, F. Reinhardt, W.J. Huk, K.E. Eberhardt, and S. Fateh-Moghadam. 2003. Comprehensive imaging of ischemic stroke with multisection CT. *Radiographics.* 23:565-592.
- Torregrosa, G., M.D. Barbera, J.M. Centeno, M. Orti, J.B. Salom, T. Jover, and E. Alborch. 1998. Characterization of the cortical laser-doppler flow and hippocampal degenerative patterns after global cerebral ischaemia in the goat. *Pflugers Arch.* 435:662-669.
- Traupe, H., E. Kruse, and W.D. Heiss. 1982. Reperfusion of focal ischemia of varying duration: postischemic hyper- and hypo-perfusion. *Stroke.* 13:615-622.
- Tsirka, S.E., A. Gualandris, D.G. Amaral, and S. Strickland. 1995. Excitotoxin-induced neuronal degeneration and seizure are mediated by tissue plasminogen activator. *Nature.* 377:340-344.
- Tsuchidate, R., Q.P. He, M.L. Smith, and B.K. Siesjo. 1997. Regional cerebral blood flow during and after 2 hours of middle cerebral artery occlusion in the rat. *J Cereb Blood Flow Metab.* 17:1066-1073.
- Tsuchiya, D., S. Hong, Y. Matsumori, T. Kayama, R.A. Swanson, W.H. Dillman, J. Liu, S.S. Panter, and P.R. Weinstein. 2003. Overexpression of rat heat shock protein 70 reduces neuronal injury after transient focal ischemia, transient

BIBLIOGRAFIA

- global ischemia, or kainic acid-induced seizures. *Neurosurgery*. 53:1179-1187; discussion 1187-1178.
- van der Weerd, L., M.F. Lythgoe, R.A. Badin, L.M. Valentim, M.T. Akbar, J.S. de Belleruche, D.S. Latchman, and D.G. Gadian. 2005. Neuroprotective effects of HSP70 overexpression after cerebral ischaemia--an MRI study. *Exp Neurol*. 195:257-266.
- van der Weerd, L., M. Tariq Akbar, R. Aron Badin, L.M. Valentim, D.L. Thomas, D.J. Wells, D.S. Latchman, D.G. Gadian, M.F. Lythgoe, and J.S. de Belleruche. 2010. Overexpression of heat shock protein 27 reduces cortical damage after cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab*. 30:849-856.
- Vangeison, G., and D.A. Rempe. 2009. The Janus-faced effects of hypoxia on astrocyte function. *Neuroscientist*. 15:579-588.
- VanGilder, R.L., K.A. Kelly, M.D. Chua, R.L. Ptachcinski, and J.D. Huber. 2009. Administration of sesamol improved blood-brain barrier function in streptozotocin-induced diabetic rats. *Exp Brain Res*. 197:23-34.
- Vasilevko, V., G.F. Passos, D. Quiring, E. Head, R.C. Kim, M. Fisher, and D.H. Cribbs. 2010. Aging and cerebrovascular dysfunction: contribution of hypertension, cerebral amyloid angiopathy, and immunotherapy. *Ann N Y Acad Sci*. 1207:58-70.
- Vassalli, J.D., A.P. Sappino, and D. Belin. 1991. The plasminogen activator/plasmin system. *J Clin Invest*. 88:1067-1072.
- Vexler, Z.S., and M.A. Yenari. 2009. Does inflammation after stroke affect the developing brain differently than adult brain? *Dev Neurosci*. 31:378-393.
- Wagner, S., M. Tagaya, J.A. Koziol, V. Quaranta, and G.J. del Zoppo. 1997. Rapid disruption of an astrocyte interaction with the extracellular matrix mediated by integrin alpha 6 beta 4 during focal cerebral ischemia/reperfusion. *Stroke*. 28:858-865.
- Wallis, R. 2007. Interactions between mannose-binding lectin and MASPs during complement activation by the lectin pathway. *Immunobiology*. 212:289-299.
- Wallis, R., D.A. Mitchell, R. Schmid, W.J. Schwaeble, and A.H. Keeble. 2010. Paths reunited: Initiation of the classical and lectin pathways of complement activation. *Immunobiology*. 215:1-11.
- Walsh, M.C., T. Bourcier, K. Takahashi, L. Shi, M.N. Busche, R.P. Rother, S.D. Solomon, R.A. Ezekowitz, and G.L. Stahl. 2005. Mannose-binding lectin is a regulator of inflammation that accompanies myocardial ischemia and reperfusion injury. *J Immunol*. 175:541-546.
- Wan, Y.Y. 2010. Multi-tasking of helper T cells. *Immunology*. 130:166-171.
- Ward, P.A., and N.J. Zvaifler. 1973. Quantitative phagocytosis by neutrophils. II. Release of the C5-cleaving enzyme and inhibition of phagocytosis by rheumatoid factor. *J Immunol*. 111:1777-1782.
- Wegele, H., L. Muller, and J. Buchner. 2004. Hsp70 and Hsp90--a relay team for protein folding. *Rev Physiol Biochem Pharmacol*. 151:1-44.
- Xu, L., J.F. Emery, Y.B. Ouyang, L.A. Voloboueva, and R.G. Giffard. 2010. Astrocyte targeted overexpression of Hsp72 or SOD2 reduces neuronal vulnerability to forebrain ischemia. *Glia*. 58:1042-1049.
- Xu, L., L.A. Voloboueva, Y. Ouyang, J.F. Emery, and R.G. Giffard. 2009. Overexpression of mitochondrial Hsp70/Hsp75 in rat brain protects mitochondria, reduces

BIBLIOGRAFIA

- oxidative stress, and protects from focal ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab.* 29:365-374.
- Yamagami, S., O. Miyamoto, T. Nakamura, Y. Okada, T. Negi, Y. Hayashida, S. Nagao, and T. Itano. 1998. Suppression of hyperemia after brain ischemia by L-threo-3,4-dihydroxyphenylserine. *Neuroreport.* 9:2939-2943.
- Yanamadala, V., and R.M. Friedlander. 2010. Complement in neuroprotection and neurodegeneration. *Trends Mol Med.* 16:69-76.
- Yang, G.Y., and A.L. Betz. 1994. Reperfusion-induced injury to the blood-brain barrier after middle cerebral artery occlusion in rats. *Stroke.* 25:1658-1664; discussion 1664-1655.
- Yang, Y., and G.A. Rosenberg. 2011. Blood-brain barrier breakdown in acute and chronic cerebrovascular disease. *Stroke.* 42:3323-3328.
- Yenari, M.A., S.L. Fink, G.H. Sun, L.K. Chang, M.K. Patel, D.M. Kunis, D. Onley, D.Y. Ho, R.M. Sapolsky, and G.K. Steinberg. 1998. Gene therapy with HSP72 is neuroprotective in rat models of stroke and epilepsy. *Ann Neurol.* 44:584-591.
- Yenari, M.A., T.M. Kauppinen, and R.A. Swanson. 2010. Microglial activation in stroke: therapeutic targets. *Neurotherapeutics.* 7:378-391.
- Yenari, M.A., J. Liu, Z. Zheng, Z.S. Vexler, J.E. Lee, and R.G. Giffard. 2005. Antiapoptotic and Anti-inflammatory Mechanisms of Heat-Shock Protein Protection. . *In Annals of the New York Academy of Sciences.* Vol. 1053. 74–83.
- Yenari, M.A., L. Xu, X.N. Tang, Y. Qiao, and R.G. Giffard. 2006. Microglia potentiate damage to blood-brain barrier constituents: improvement by minocycline in vivo and in vitro. *Stroke.* 37:1087-1093.
- Yenes, S., J.N. Commandeur, N.P. Vermeulen, and A. Messegueur. 2004. In vitro biotransformation of 3,4-dihydro-6-hydroxy-2,2-dimethyl-7-methoxy-1(2H)-benzopyran (CR-6), a potent lipid peroxidation inhibitor and nitric oxide scavenger, in rat liver microsomes. *Chem Res Toxicol.* 17:904-913.
- Yepes, M., and D.A. Lawrence. 2004. New functions for an old enzyme: nonhemostatic roles for tissue-type plasminogen activator in the central nervous system. *Exp Biol Med (Maywood).* 229:1097-1104.
- Yepes, M., B.D. Roussel, C. Ali, and D. Vivien. 2009. Tissue-type plasminogen activator in the ischemic brain: more than a thrombolytic. *Trends Neurosci.* 32:48-55.
- Yilmaz, A., T. Fuchs, B. Dietel, R. Altendorf, I. Cicha, C. Stumpf, P.D. Schellinger, I. Blumcke, S. Schwab, W.G. Daniel, C.D. Garlichs, and R. Kollmar. 2010. Transient decrease in circulating dendritic cell precursors after acute stroke: potential recruitment into the brain. *Clin Sci (Lond).* 118:147-157.
- Yilmaz, G., T.V. Arumugam, K.Y. Stokes, and D.N. Granger. 2006. Role of T lymphocytes and interferon-gamma in ischemic stroke. *Circulation.* 113:2105-2112.
- Yilmaz, G., and D.N. Granger. 2010. Leukocyte recruitment and ischemic brain injury. *Neuromolecular Med.* 12:193-204.
- Zhan, X., B.P. Ander, I.H. Liao, J.E. Hansen, C. Kim, D. Clements, R.H. Weisbart, R.N. Nishimura, and F.R. Sharp. 2010. Recombinant Fv-Hsp70 protein mediates neuroprotection after focal cerebral ischemia in rats. *Stroke.* 41:538-543.

BIBLIOGRAFIA

- Zhang, D.W., J. Shao, J. Lin, N. Zhang, B.J. Lu, S.C. Lin, M.Q. Dong, and J. Han. 2009. RIP3, an energy metabolism regulator that switches TNF-induced cell death from apoptosis to necrosis. *Science*. 325:332-336.
- Zhang, F., C. Eckman, S. Younkin, K.K. Hsiao, and C. Iadecola. 1997. Increased susceptibility to ischemic brain damage in transgenic mice overexpressing the amyloid precursor protein. *J Neurosci*. 17:7655-7661.
- Zhang, M., E.M. Alicot, I. Chiu, J. Li, N. Verna, T. Vorup-Jensen, B. Kessler, M. Shimaoka, R. Chan, D. Friend, U. Mahmood, R. Weissleder, F.D. Moore, and M.C. Carroll. 2006a. Identification of the target self-antigens in reperfusion injury. *J Exp Med*. 203:141-152.
- Zhang, M., K. Takahashi, E.M. Alicot, T. Vorup-Jensen, B. Kessler, S. Thiel, J.C. Jensenius, R.A. Ezekowitz, F.D. Moore, and M.C. Carroll. 2006b. Activation of the lectin pathway by natural IgM in a model of ischemia/reperfusion injury. *J Immunol*. 177:4727-4734.
- Zhang, R., M. Chopp, Z. Zhang, N. Jiang, and C. Powers. 1998. The expression of P- and E-selectins in three models of middle cerebral artery occlusion. *Brain Res*. 785:207-214.
- Zhang, R.L., M. Chopp, H. Chen, and J.H. Garcia. 1994. Temporal profile of ischemic tissue damage, neutrophil response, and vascular plugging following permanent and transient (2H) middle cerebral artery occlusion in the rat. *J Neurol Sci*. 125:3-10.
- Zhang, S.M., M. Ramirez-Lassepas, L.A. Hernandez, S.H. Lee, and R.C. Heros. 1995. A new model of experimental cerebral infarction in New Zealand white rabbits. *J Tongji Med Univ*. 15:5-9.
- Zhang, Z., and M. Chopp. 2002. Vascular endothelial growth factor and angiopoietins in focal cerebral ischemia. *Trends Cardiovasc Med*. 12:62-66.
- Zhao, B.Q., S. Wang, H.Y. Kim, H. Storrie, B.R. Rosen, D.J. Mooney, X. Wang, and E.H. Lo. 2006. Role of matrix metalloproteinases in delayed cortical responses after stroke. *Nat Med*. 12:441-445.
- Zlokovic, B.V. 2006. Remodeling after stroke. *Nat Med*. 12:390-391.