



Departament de Bioquímica i Biologia Molecular

Unitat de Bioquímica, Facultat de Medicina

**Estudi dels mecanismes de mort cel·lular
induits per un model d'isquèmia cerebral *in
vitro*: implicació dels antagonistes
dels receptors de mort**

Tesi Doctoral

Guillem Sánchez Opazo

Bellaterra, 2014



Departament de Bioquímica i Biologia Molecular

Unitat de Bioquímica de Medicina

**Estudi dels mecanismes de mort cel·lular induïts per un
model d'isquèmia cerebral *in vitro*: implicació dels
antagonistes dels receptors de mort**

Memòria de Tesi Doctoral presentada per **Guillem Sánchez Opazo** per optar al **Grau de Doctor en Neurociències** per la Universitat Autònoma de Barcelona.

Treball realitzat en l'Institut de Neurociències (INc), en la Unitat de Bioquímica de Medicina del Departament de Bioquímica i Biologia Molecular de la Universitat Autònoma de Barcelona, sota la direcció del Dr. José Rodríguez Álvarez.

Bellaterra, 2 de Juliol del 2014

Doctorand

Director de tesi

Guillem Sánchez Opazo

José Rodríguez Álvarez

ÍNDEX

ÍNDEX

ÍNDEX.....	1
ÍNDEX DE TAULES I FIGURES.....	4
ABREVIATURES.....	6
RESUM.....	7
ABSTRACT.....	10
1.INTRODUCCIÓ.....	11
1.1. L'ICTUS: INCIDÈNCIA I CLASSIFICACIÓ.....	12
1.2. FACTORS DE RISC.....	13
1.3. FISIOPATOLOGIA DE L'ICTUS.....	15
1.4. MODELS EXPERIMENTALS D'ISQUÈMICA CEREBRAL.....	16
1.4.1. Models <i>in vivo</i> d'isquèmia.....	16
1.4.1.1. Models d'isquèmia global.....	16
1.4.1.2. Models d'isquèmia focal.....	17
1.4.2. Models <i>in vitro</i>	18
1.5. MECANISMES DE MORT EN L'ISQUÈMIA CEREBRAL.....	19
1.5.1. Exitotoxicitat.....	20
1.5.2. Despolarització anòxica.....	21
1.5.3. Estrés oxidatiu i nitrosatiu.....	22
1.5.4. Desregulació dels nivells de calci.....	24
1.5.5. Inflamació.....	24
1.6. TIPUS DE MORT EN L'ISQUÈMIA CEREBRAL.....	26
1.6.1. Necrosi.....	27
1.6.2. Apoptosi.....	27
1.6.2.1. Vía intrínseca i extrínseca.....	28
1.6.2.2. Mecanismes de mort independents de caspases.....	31
1.7. RECEPTORS DE MORT.....	32
1.7.1. Classificació.....	32
1.7.2. Vía de senyalització de FasR i TNFR1.....	33
1.7.3. Fas i TNF α en l'isquèmia.....	35
1.8. ANTAGONISTES DELS RECEPTORS DE MORT.....	37

1.8.1. FLIP.....	37
1.8.2 IAP's.....	38
1.8.3. FAIM.....	40
2. OBJECTIUS.....	43
3. MATERIALS I MÈTODES.....	47
3.1. MATERIAL BIOLÒGIC.....	48
3.2. PREPARACIÓ DELS CULTIUS PRIMARIS.....	48
3.2.1. Solucions necessàries per la preparació del cultiu.....	48
3.2.2. Composició dels medis de cultiu i el tampó fosfat.....	48
3.2.3. Dissecció i obtenció dels còrtex.....	49
3.2.4. Obtenció de la solució cel·lular.....	49
3.3. PRIVACIÓ D'OXIGEN I GLUCOSA (OGD).....	50
3.4. DETERMINACIÓ DE LA VIABILITAT CEL·LULAR.....	50
3.4.1. Assaig de reducció de l'MTT.....	50
3.4.2. Hoechst 33258 i iodur de propidi (PI).....	51
3.5. DETECCIÓ DELS NIVELLS DE mRNA PER RT-PCR.....	52
3.5.1. Extracció del RNA.....	52
3.5.2. Transcripció inversa.....	52
3.5.3. Amplificació per PCR semiquantitativa.....	53
3.6. WESTERN-BLOT.....	53
3.7. IMMUNOCITOQUÍMICA.....	55
3.8. MANTENIMENT I SUBCULTIU DE LÍNIES CEL·LULARS.....	56
3.8.1. Descongelació i manteniment.....	56
3.8.2. Congelació de cèl·lules.....	57
3.9. TRANSFECCIÓ MITJANÇANT VECTORS LENTIVIRALS.....	57
3.9.1. Mecanismes d'acció dels shRNA's.....	59
3.9.2. Transformació de bacteris per xoc tèrmic.....	60
3.9.3. Amplificació dels plasmidis.....	61
3.9.4. Transfecció dels plasmidis mitjançant fosfat de calci.....	62
3.9.5. Titulació de les partícules víriques.....	63
3.9.6. Infecció lentiviral dels cultius primaris i línies cel·lulars.....	63
3.10. ANÀLISI ESTADÍSTICA.....	64

ANNEX I. Mapes dels plasmidis emprats.....	65
4. RESULTATS.....	67
4.1. MORT INDUÏDA PER L'OGD.....	68
4.1.1. Viabilitat cel·lular i morfologia nuclear.....	68
4.1.2. Neuroprotecció en l'OGD per inhibició dels receptors NMDA.....	70
4.1.3. Estudi de l'activació de la caspasa-3 en l'OGD.....	70
4.2. ESTUDI DELS ANTAGONISTES DELS RECEPTORS DE MORT EN L'OGD.....	72
4.2.1. XIAP.....	72
4.2.2. IAP2.....	73
4.2.3. FLIP _L	74
4.2.4. FAIM _L	75
4.3. REGULACIÓ DE FAIM _L EN L'OGD.....	77
4.3.1. Pretractament amb PD098059.....	77
4.4. SILENCIAMENT DE FAIM _L EN L'OGD.....	79
4.5. SOBREXPRESSIÓ DE FAIM _L EN L'OGD.....	85
5. DISCUSSIÓ.....	93
6. CONCLUSIONS.....	103
7. BIBLIOGRAFIA.....	105

ÍNDIX DE TAULES I FIGURES

FIGURES:

Figura 1.1. Tipologia de l'ictus isquèmic.....	
Figura 1.2. Classificació de l'ictus segons la seva naturalesa.....	
Figura 1.3. Nucli i penombra en l'isquèmia cerebral.....	
Figura 1.4. Mecanismes de mort en l'isquèmia cerebral.....	
Figura 1.5. Interacció entre els radicals de l'oxigen i el nitrogen en l'isquèmia.....	
Figura 1.6. Possible cascada d'esdeveniments després de l'ictus.....	
Figura 1.7. Esquema dels processos de mort per necrosi i apoptosi.....	
Figura 1.8. Esquema simplificat de les vies apoptòtiques.....	
Figura 1.9. Esquema simplificat de la via intrínseca en l'isquèmia.....	
Figura 1.10. Esquema de la via de FasL/FasR en l'isquèmia cerebral.....	
Figura 1.11. Esquema de la via TNF α /TNFR1 en l'apoptosi i la necrosi.....	
Figura 1.12. Esquema dels diferents membres de la família de les IAP's.....	
Figura 3.1. Composició genèrica dels plasmidis necessaris per la generació lentiviral...	
Figura 3.2. Esquema del procés de silenciament del mRNA induït pels shRNA's.....	
Figura 3.3. Fórmula per calcular el nombre de partícules infectives (TU/ml).....	
Figura 4.1. Viabilitat cel·lular en l'OGD.....	
Figura 4.2. Tinció fluorescent amb Hoechst 33258 i PI.....	
Figura 4.3. Pretractament amb MK-801 en l'OGD.....	
Figura 4.4. Activació de la caspasa-3 en l'OGD.....	
Figura 4.5. Expressió d'XIAP en cultius corticals mixtes.....	
Figura 4.6. Expressió de XIAP després de l'OGD.....	
Figura 4.7. Expressió de IAP2 després de l'OGD.....	
Figura 4.8. Expressió de FLIP _L després de l'OGD.....	
Figura 4.9. Expressió de FAIM _L després de l'OGD.....	
Figura 4.10. Expressió de FAIM en els cultius corticals mixtes.....	
Figura 4.11. Expressió de FAIM _L en l'OGD pretractant amb PD098059.....	
Figura 4.12. Viabilitat cel·lular en l'OGD pretractant amb PD098059.....	
Figura 4.13. Proves d'infecció amb el lentivirus shFAIM _L en cèl·lules PC12.....	
Figura 4.14. Proves d'infecció en cultius corticals mixtes.....	
Figura 4.15. Quantificació de l'infecció amb els lentivirus shFAIM _L i <i>scramble</i>	

Figura 4.16. Assaig de viabilitat amb el lentivirus shFAIM_L en l'OGD.....

Figura 4.17. Tinció fluorescent amb Hoechst i PI amb el silenciament de FAIM_L.....

Figura 4.18. Quantificació de cèl·lules PI positives amb l'shFAIM_L en l'OGD.....

Figura 4.19. Sobreexpressió de FAIM_L en cèl·lules PC12.....

Figura 4.20. Sobreexpressió de FAIM_L en cultius corticals mixtes.....

Figura 4.21. Quantificació de l'infecció amb el lentivirus de sobreexpressió de FAIM_L....

Figura 4.22. Immunocitoquímica de cultius infectats amb el lentivirus FAIM_L.....

Figura 4.23. Assaig de viabilitat en l'OGD amb la sobreexpressió de FAIM_L.....

Figura 4.24. Tinció fluorescent amb Hoechst i PI en l'OGD amb la sobreexpressió de FAIM_L.....

Figura 4.25. Quantificació de cèl·lules PI positives en l'OGD amb la sobreexpressió de FAIM_L.....

Figura 4.26. Nivells de caspasa-3 activa en l'OGD amb la sobreexpressió de FAIM_L.....

TAULES:

Taula 1.1. Factors de risc modificables en l'ictus.....

Taula 3.1. Encebadors utilitzats per l'amplificació del cDNA.....

Taula 3.2. Plasmidis utilitzats per la generació dels vectors lentivirals.....

ABREVIATURES

AMPA: α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol-propionàic àcid

Ara C: *Citosine Arabinofuranosid*

ATP: *Adenosine Triphosphate*

BME: *Basal Medium Eagle*

BSA: *Bovine Serum Albumin*

cDNA: DNA complementari

DMSO: Dimetilsulfòxid

DNA: *Deoxyribonucleid acid*

DTT: *Dithiothreitol*

EDTA: *Ethylenediamine Tetraacetic Acid*

HBS: *Hepes Buffered saline*

HEPES: *4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid*

HBSS: *Hank's Balanced Salt Solution*

Kb: quilobase

kDa: quilodalton

mA: miliamper

mg: mil·ligram

ml: mil·lilitre

mM: milimol/litre

NF- κ B: Factor Nuclear kappa B

ng: nanogram

nm: nanòmetre

NMDA: N-metil-D-aspartat

PMSF: fluorur fenilmetilsulfònic

RNA: *Ribonucleid acid*

rpm: revolucions per minut

SDS: dodecilsulfat sòdic

shRNA: *short hairpin RNA*

TAE: *Tris-acetate-EDTA*

TNF α : *Tumor necrosis factor α*

μ g: microgram

μ l: microlitre

μ M: micromol/litre

RESUM

RESUM

L'íctus o accident cerebrovascular és la segona causa de mort en els països industrialitzats i constitueix la primera causa de discapacitat en adults. L'únic tractament aprovat en l'actualitat és el trombolític activador del plasminògen tissular (tPA), el qual només es pot aplicar en un nombre molt reduït de pacients i dintre d'una estreta finestra terapèutica. Els mecanismes de mort cel·lular en la isquèmia cerebral són amplis i venen provocats per l'interrupció del flux sanguini al cervell, el qual provoca una mort ràpida i eminentment necròtica en el nucli de la zona afectada i una mort de caràcter apoptòtic i més lenta al voltant, en la zona de penombra. El gran impacte socio-econòmic de la malaltia i l'existència d'una mort programada dilatada en el temps han fet que es posin grans esforços en la búsqueda de mecanismes per salvar la zona de penombra. Tenint en compte aquests fets, el present treball s'ha centrat en l'estudi dels mecanismes de mort cel·lular involucrats en la isquèmia cerebral. Per fer-ho, s'ha utilitzat un model de privació d'oxigen i glucosa (OGD) en cultius corticals mixtes d'embrions de rata. Utilitzant aquest model d'isquèmia s'ha observat neuroprotecció pel bloqueig dels receptors NMDA, principal responsable de l'entrada massiva de calci, i l'activació de la caspasa-3, una proteasa encarregada del desmantellament cel·lular durant l'apoptosis. A més, s'ha estudiat el paper dels antagonistes dels receptors de mort en l'OGD. Aquests receptors són responsables de l'activació de la via apoptòtica extrínseca. S'ha observat que l'OGD indueix la degradació dels antagonistes FLIP_L i IAP2 i modula l'expressió de FAIM_L a través de la via de les MAP cinases. Per altre banda, s'ha observat que el silenciament o la sobreexpressió de FAIM_L mitjançant vectors lentivirals no afecta la viabilitat dels cultius així com tampoc la morfologia nuclear apoptòtica ni els nivells de caspasa-3 activa en les neurones sotmeses a l'insult isquèmic. En conjunt aquests resultats han servit per aprofundir en els mecanismes moleculars implicats en la isquèmia cerebral i poden servir de base per futurs estudis que ajudin al disseny de noves estratègies terapèutiques.

ABSTRACT

Stroke is the second cause of death in industrialized countries and is the leading cause of disability in adults. The only currently approved treatment is the thrombolytic tissue plasminogen activator (tPA), which can be applied only in a very small number of patients and within a narrow therapeutic window. The mechanisms of cell death in brain ischemia are numerous and are caused by the interruption of the blood flow to the brain, which causes a quick necrotic death in the core of the affected area and a slow apoptotic-like death around, in the ischemic penumbra. The major socio-economic impact of the disease and the existence of a programmed cell death that stretches through time explain the effort that is being done to find new strategies to save the penumbra. Given these facts, the present work has focused on studying the mechanisms of cell death involved in brain ischemia. To do this, we used a model of oxygen and glucose deprivation (OGD) in mixed cortical cultures from rat embryos. Using this model of ischemia we observed neuroprotection by blocking NMDA receptor, the primarily responsible for the massive influx of calcium during ischemia, and activation of caspase-3, a protease responsible for dismantling the cell during apoptosis. In addition, we studied the role of death receptor antagonists in OGD. These receptors are responsible for the activation of the extrinsic apoptotic pathway. It has been observed that OGD induces degradation of the antagonists FLIP_L and IAP2 and modulate the expression of FAIM_L through the MAP kinase pathway. On the other hand, we observed that the overexpression or silencing of FAIM_L using lentiviral vectors did not affect the viability of the cultures nor the apoptotic nuclear morphology or the levels of active caspase-3 in the neurons subjected to the ischemic insult. Together these results have served to study the molecular mechanisms involved in brain ischemia and may provide the basis for future studies that will help to design new therapeutic strategies.

1. INTRODUCCIÓ

1. INTRODUCCIÓ

1.1 - L'ictus: Incidència i classificació

L'accident vascular cerebral (AVC) o ictus és una malaltia aguda ocasionada per una interrupció de la circulació de la sang al cervell. Més de 15 milions de persones pateixen un ictus cada any. D'aquestes un terç moren i un altre terç resten amb una discapacitat permanent. És la segona causa de mort al món. A Espanya la incidència és major en homes (183-364/100.000 habitants) que en dones (169/100.000 habitants) i es multiplica per deu en la població de més de 70 anys (Medrano Alberto, Boix Martinez et al. 2006). A Catalunya és la primera causa de mort entre les dones i la tercera entre els homes i la primera causa de discapacitat mèdica en adults. L'interrupció del flux sanguini pot ser causada per una trombosis o un embolisme o, de manera menys freqüent, per una hemorràgia o una parada cardíaca. Segons la causa definim dos tipus d'ictus: l'ictus isquèmic i l'ictus hemorràgic.

- Ictus isquèmic: Representa el 80-85 % del total i la interrupció del flux sanguini és deguda a una oclusió del vas per un trombe o una placa arterioscleròtica. Si la isquèmia que en resulta produeix una lesió cerebral irreversible parlem d'infart cerebral mentre que si els símptomes remeten sense causar una lesió cerebral permanent detectable per tècniques de neuroimatge parlem d'un atac isquèmic transitori o AIT (Albers, Caplan et al. 2002).
- Ictus hemorràgic: Representa aproximadament el 15 % del total i es produeix pel trencament d'una artèria i l'extravessament de la sang al encèfal (Figura 1).

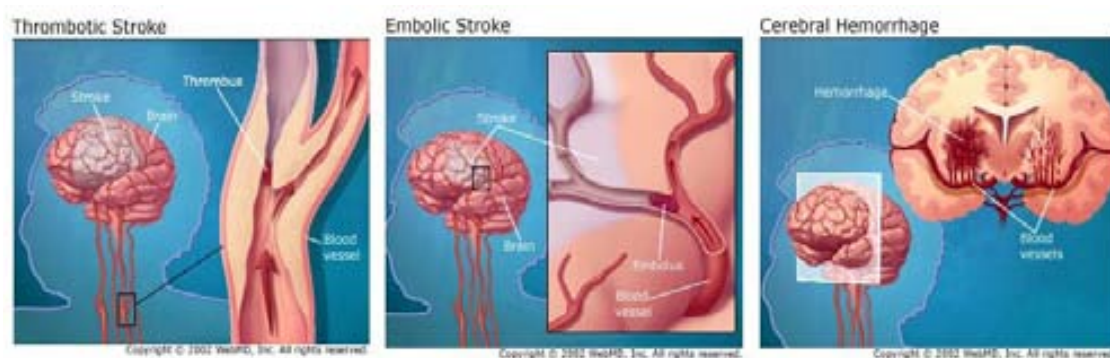


Figura 1.1. Tipologia de l'ictus isquèmic. Esquema simplificat d'un ictus causat per un trombe, un èmbol o una hemorràgia.

Ja que detectar un ictus a temps és fonamental, la conscienciació social sobre la malaltia i la millora assistencial estan permetent avenços en la disminució de les taxes de mortalitat de les malalties cerebrovasculares.

La classificació dels diferents subtipus etiològics es mostra a la Figura 2.

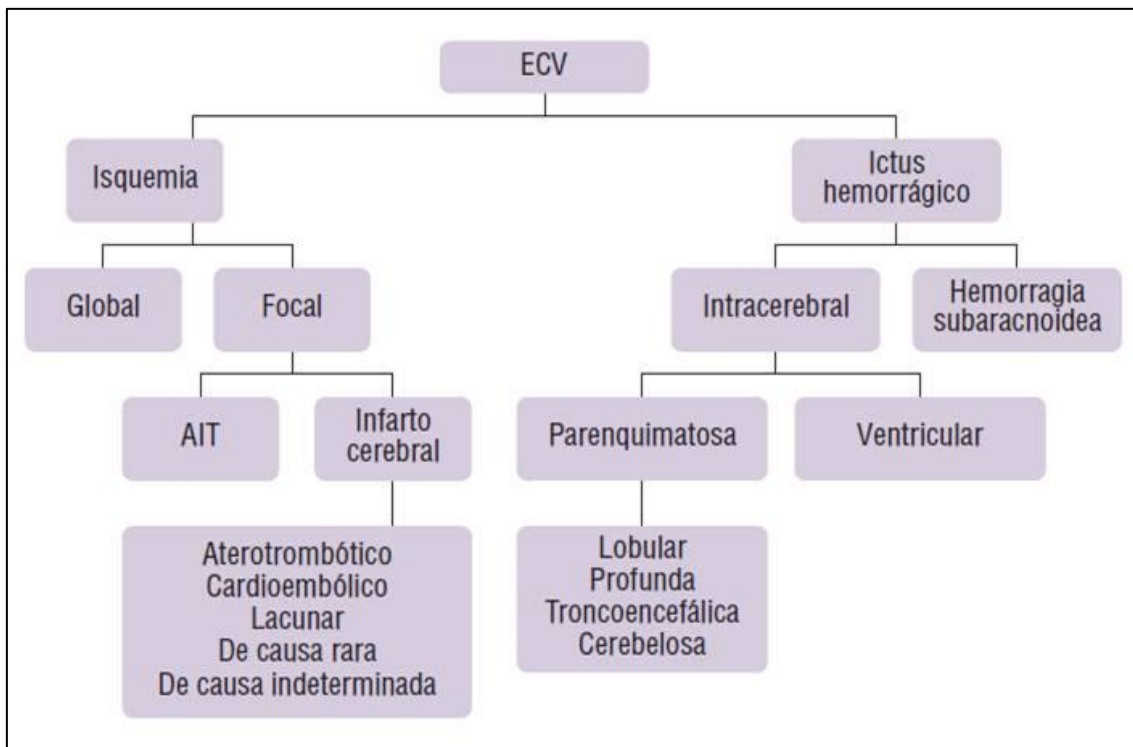


Figura 1.2. Classificació de l'ictus segons la seva naturalesa. ECV = enfermedad cerebrovascular; AIT = atac isquèmic transitori (Soler-Gonzalez, Munoz-Torrero et al. 1999).

1.2 - Factors de risc

Un factor de risc per l'ictus és una característica d'un individu que incrementa el risc de patir un ictus respecte un altre individu sense la mateixa característica. Existeixen múltiples factors de risc en l'ictus, alguns dels quals no es poden modificar, com per exemple l'història familiar de malalties cerebrovasculares, l'edat avançada o el gènere masculí (Hankey 2006). Però altres factors sí que són modificables i la seva correcció redueix la probabilitat de patir un ictus (Figura 3). Aquests factors, que sovint coexisteixen, són els responsables del 60-80 % del risc de patir un ictus en la població general (Allen and Bayraktutan 2008). Molts d'aquests factors de risc tenen una incidència directa en la estructura i funció dels vasos sanguinis, promovent la formació de plaques d'ateroma i endurint les artèries, cosa que provoca l'estretament,

l'engruiximent i l'augment en la tortuositat de les arterioles i els capil·lars (Iadecola and Davisson 2008).

Classification	Risk Factor	References
Causal ^a	hypertension	Lawes et al., 2004a
	diabetes	Lawes et al., 2004b
	hypercholesterolemia	Amarenco et al., 2006
	cigarette smoking	Bonita et al., 1999
	atrial fibrillation	Hart et al., 1999
	valvular heart disease	Kizer et al., 2005
	ischemic cardiomyopathy	Loh et al., 1997
	carotid stenosis	Rothwell et al., 2003
Probable ^b	hyperhomocysteinemia	Wald et al., 2002
	increased inflammatory markers (WBC, CRP, infection)	Di Napoli et al., 2005
	elevated plasma fibrinogen	Rothwell et al., 2004
	dyslipidemia	Holme et al., 2009
	patent foramen ovale	Nedeltchev et al., 2008
	obstructive sleep apnea	Culebras, 2009
	body mass index	Hu et al., 2007
	lack of exercise	Hu et al., 2005
	low fruit and vegetable diet	Dauchet et al., 2005
	psychosocial stress	Simons et al., 1998

Taula 1.1. Factors de risc modificables en l'ictus. (a) Factors en els quals s'ha demostrat, mitjançant assajos clínics aleatoris, que la seva correcció redueix el risc de patir un ictus (Hankey 2006). (b) Factors els quals la associació amb l'ictus és menys sòlida o no han estat establerts com a causa. WBC=White blood cells; CRP=C-reactive protein (Moskowitz, Lo et al. 2010).

En el cervell, tots aquests canvis estan associats a la disminució i l'alteració de la regulació del flux sanguini basal. L'edat, l'hipercolesterolèmia i la diabetis alteren el correcte funcionament de mecanismes que són vitals per la correcta irrigació del cervell (Arrick, Sharpe et al. 2007; Iadecola and Davisson 2008; Black and Iadecola 2009).

L'habilitat de l'endoteli per regular el flux sanguini microvascular s'altera, no hi ha un augment del flux sanguini com a resposta a l'increment de l'activitat neuronal i això provoca una desequilibri entre el subministrament i la demanda energètica al cervell (Zou, Cohen et al. 2004; Arrick, Sharpe et al. 2007).

1.3. Fisiopatologia del ictus

El teixit que envolta la oclusió del vas és sovint heterogeni i diferent en quan a estabilitat i susceptibilitat al dany isquèmic (Astrup, Siesjo et al. 1981). En l'ictus, independentment de la seva causa, i segons els nivells de irrigació, es poden distingir tres zones: el *core* o nucli, la penombra isquèmica i la zona d'oligohèmia benigna.

- El *core* isquèmic es refereix al teixit danyat irreversiblement i que es caracteritza per tenir una baixa irrigació sanguínia (<20%), una depleció dels nivells d'ATP i per tant un dany irreversible en el metabolisme energètic (Lo 2008).
- La penombra isquèmica es caracteritza per una reducció del flux sanguini que és suficient per mantenir uns nivells d'ATP basals i els gradients iònics normals en presència d'un silenciament elèctric i una inhibició de la síntesis proteica.
- Zona d'oligohèmia benigna: és la zona en la qual el flux sanguini es troba reduït però les neurones són funcionalment actives. Aquesta zona es confonia clàssicament amb la penombra isquèmica però en la zona d'oligohèmia les neurones no estan en risc (Kamalian, Konstas et al. 2012).

La mesura de la penombra isquèmica és important per tal de detectar aquelles persones que es beneficiaran més dels tractaments aguts per restaurar el flux sanguini així com de les possibles teràpies futures. Això és possible gràcies a les tècniques d'imatge per ressonància magnètica: DWI (del anglès, *diffusion-weighted imaging*) i PWI (del anglès, *perfusion-weighted imaging*). PWI mesura l'extensió de la zona on el flux sanguini està compromès mentre que DWI detecta la regió amb una menor difusió de l'aigua, un possible marcador del teixit més severament danyat o *core* isquèmic. El "mismatch" entre les dues imatges dona una idea de la zona de penombra isquèmica tot i que més recentment s'ha vist que les fronteres no són tan clares i hi ha zones on s'observa una alta difusió que són potencialment salvables (Ebinger, De Silva et al. 2009) (Figura 4).

Així doncs la penombra isquèmica es refereix a un teixit "en risc" amb dèficits funcionals però potencialment salvable. Tot i això, si no hi ha reperfusió el teixit en risc mor a les poques hores (Lo 2008).

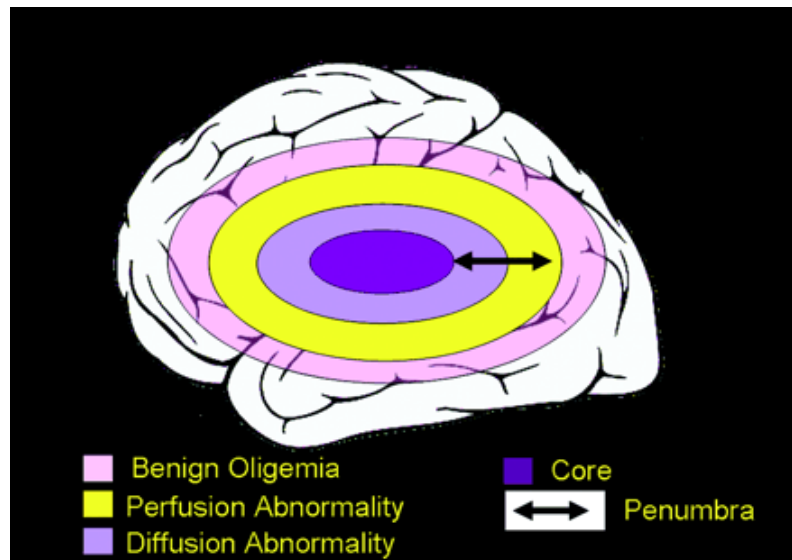


Figura 1.3. Nucli i penombra en l'isquèmia cerebral. Esquema de les diferents regions després d'un ictus segons les tècniques d'imatge per ressonància magnètica DWI i PWI (Kamalian, Konstas et al. 2012).

1.4 - MODELS EXPERIMENTALS D'ISQUÈMIA CEREBRAL

1.4.1 – Models *in vivo* d'isquèmia

1.4.1.1 – Models d'isquèmia global

La isquèmia global es caracteritza per la reducció crítica del flux sanguini a tot el cervell. En isquèmies curtes, l'única regió danyada és la zona CA1 de l'hipocamp però en isquèmies llargues altres zones es veuen afectades fins a un punt de no retorn on la reperfusió no és efectiva (Bottiger, Krumnikl et al. 1997). La majoria de casos d'isquèmia global són causats per una parada cardíaca. Els models experimentals d'isquèmia global s'utilitzen per estudiar el dany cerebral causat al cervell per un problema circulatori o parada cardíaca després del restabliment del flux sanguini.

Oclusió de quatre vasos: En aquest model es du a terme una oclusió de les dues artèries caròtides comuns així com la cauterització de les artèries vertebrals. Això resulta en un dany reproduïble en l'hipocamp a l'estriat (Pulsinelli and Brierley 1979).

Oclusió de dos vasos: En aquest model es du a terme l'occlusió de les dues artèries caròtides comuns combinat amb la inducció d'un descens en la pressió sanguínia. En

aquest model d'isquèmia global es produeix un dany selectiu en la zona CA1 de l'hipocamp, el caudat putamen i el neocòrtex (Smith, Bendek et al. 1984).

1.4.1.2 – Models d'isquèmia focal

El nombre i la diversitat de models experimentals d'ictus a crescut en les últimes dècades i ha permès aconseguir la majoria dels coneixements que avui tenim sobre la patofisiologia i els mecanismes involucrats en la mort isquèmica.

Model embòlic: El model embolic o tromboembòlic es induït a partir de la injecció d'un trombe de sang autòloga en una artèria caròtida extracranial i d'allà es desplaça a una artèria més interna (Busch, Kruger et al. 1997). Aquest model causa una consistent reducció del flux sanguini al encèfal i dany histològic en l'àrea de l'arteria cerebral mitja (ACM). Potser el model tromboembòlic és el que s'apropa més a la clínica ja que la majoria d'ictus en humans són causats per un tromboembolisme. Un altre avantatge d'aquest model es que va permetre i permet l'estudi d'agents trombolítics (Overgaard 1994), l'estudi de la mort isquèmica després de la trombòlisis (Brinker, Franke et al. 1999) així com l'estudi de teràpies combinades, per exemple, l'administració d'un trombolític més un agent neuroprotector (Zhang, Zhang et al. 2004).

Sutura intraluminal de l'ACM: D'entre els diferents models experimentals d'isquèmia l'oclusió intraluminal de l'ACM en rates i ratolins és la més utilitzada. Aquest model és menys invasiu i permet realitzar isquèmies temporals o permanents d'una manera més controlada. Consisteix en l'inserció d'una sutura de niló a través de l'artèria caròtida interna la qual arriba fins l'origen de l'ACM. Al mateix temps i per evitar el flux col·lateral es lliguen les branques de l'artèria caròtida externa i interna (Longa, Weinstein et al. 1989). Aquest model permet produir volums d'infart reproduïbles i permet efectuar isquèmies tant permanents com temporals deixant o retirant la sutura i permetent la reperfusió en la zona de l'ACM.

Model de fototrombosi: La fototrombosi indueix un infart cortical a través de la injecció d'un colorant fotosensible (rosa de bengala) i la irradiació a una longitud d'ona determinada (560 nm) (Watson, Dietrich et al. 1985). La irradiació produeix agregació plaquetària en els vasos i la mort de les cèl·lules endotelials. Un problema d'aquest

model és que no es forma una zona de penombra isquèmica ja que la formació de l'edema i el trencament de la barrera hematoencefàlica succeeix en qüestió de minuts (Dietrich, Watson et al. 1987).

Ictus induït per endotelina-1: L'endotelina-1 actua com un potent vasoconstrictor i si és aplicada directament a l'ACM (Robinson, Macrae et al. 1990), adjacent a l'ACM a través d'una injecció (Sharkey, Ritchie et al. 1993) o en la superfície del còrtex (Fuxe, Bjelke et al. 1997) disminueix el flux sanguini (en un 70-93 %) en la zona de l'ACM i resulta en una lesió semblant a l'obtinguda per sutura de l'ACM (Macrae, Robinson et al. 1993).

Hipòxia-isquèmia perinatal: Aquest model pretén simular la hipòxia perinatal. Per això s'utilitzen ratolins de 7 dies als quals se'ls hi lliga l'artèria caròtida i després se'ls sotmet a condicions d'hipòxia (8 % oxigen) durant un temps determinat i després se'ls retorna a condicions de normòxia. Aquest model ha demostrat ser vàlid per l'estudi a curt i llarg termini del dany causat per la hipòxia-isquèmia perinatal en l'activitat motora, el comportament, l'efecte de la cirurgia i la maduració del cervell i altres òrgans i sistemes (Vannucci and Vannucci 2005).

1.4.2 – Models *in vitro*

Els models *in vitro* d'isquèmia permeten simular, en un entorn altament controlat, les condicions cel·lulars que es donen en un ictus. Es poden realitzar tant en cultius organotípics com en cultius primaris de neurones, astròcits, mixtes o línies cel·lulars i faciliten l'estudi en detall dels mecanismes moleculars involucrats en la patologia.

Privació d'oxigen i glucosa: En aquest mètode els efectes de la patologia a nivell cel·lular s'indueixen o simulen per la privació d'oxigen i glucosa (OGD, del anglès *oxygen and glucose deprivation*). És el model més acceptat i utilitzat. Per induir l'OGD als cultius se'ls hi canvia el medi per un tampó salí sense glucosa ni suplementes (HBSS o Krebs) i es posen en una cambra anaeròbica (95 % N₂, 5 % CO₂ o 90 % N₂, 5 % CO₂ i 5 % H₂) durant un cert temps (Goldberg and Choi 1993). Un cop finalitzada, per tal de simular la fase de reperfusió, es retorna el medi condicionat i les cèl·lules es retornen a

un incubador normal en condicions de normòxia. Com a control s'utilitzen cèl·lules amb un tampó salí suplementat amb glucosa i en condicions de normòxia.

Aquest model es pot utilitzar en cultius organotípics o en cultius cel·lulars. Els cultius organotípics presenten la avantatge de mantenir l'organització tridimensional fisiològica mentre que els cultius cel·lulars presenten altres avantatges com permetre un control més rigorós de les condicions, una major accessibilitat dels fàrmacs i, a més, el seguiment de cada tipus cel·lular és més senzill. Els cultius primaris, que s'obtenen directament d'un organisme viu per disgregació del teixit cerebral, són els cultius cel·lulars que més s'aproximen a les condicions reals. En especial els cultius mixtes de cèl·lules corticals, on creixen conjuntament neurones, astròcits i microglia, permetent recrear de forma més fidedigne l'entorn cel·lular fisiològic. És per això que vam decidir utilitzar aquest model d'OGD en aquest tipus de cultiu.

Model d'exitotoxicitat: En aquest model els cultius són exposats a agonistes dels receptors ionotròpics del glutamat (NMDA i kainat) durant un cert temps (Hasbani, Hyrc et al. 1998). Els agonistes es dissolen en una solució salina (HEPES o una solució salina tamponada amb bicarbonat) i en alguns experiments, després de ser exposats al estímul exitotòxic, es reemplaça la solució per una amb inhibidors (MK-801 o NBQX) (Hasbani, Schlieb et al. 2001).

Isquèmia química: Aquest model intenta simular l'hipòxia a través de l'adició de molècules com la cianida (KCN), que inhibeix la citocrom C oxidasa, o la oligomicina, que inhibeix l'ATP sintasa, per generar un ambient hipòxic. Aquests tractaments es poden combinar a més amb l'inducció d'hipoglucèmia, utilitzant un medi baix en glucosa.

1.5 - MECANISMES DE MORT EN L'ISQUÈMIA CEREBRAL

En la penombra isquèmica, múltiples mecanismes han sigut identificats com a causants d'un dany irreversible en el teixit cerebral (Figura 5). Quan el flux sanguini decau, d'utilització d'ATP continua duent a l'acidosi i la pèrdua de l'homeòstasi iònica. Però la mort isquèmica no és deguda només a un descens en els nivells d'ATP sinó que hi ha

una sèrie d'esdeveniments a nivell iònic, bioquímic i cel·lular que sumen estrès a un teixit ja compromès (Dirnagl, Iadecola et al. 1999; Lo, Dalkara et al. 2003).

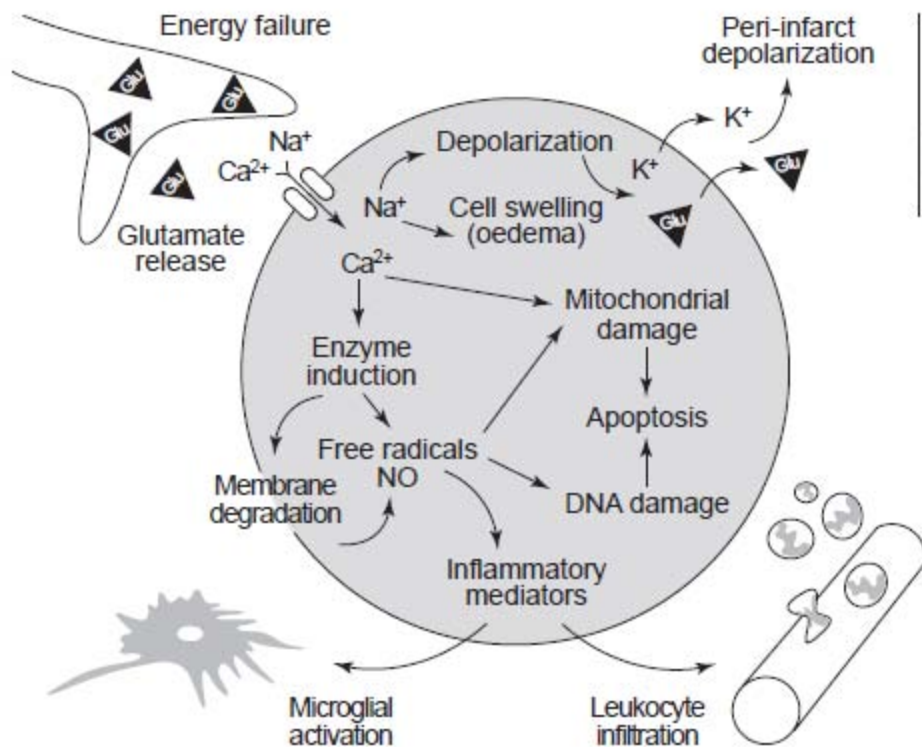


Figura 1.4. Mecanismes de mort en l'isquèmia cerebral. Esquema simplificat dels diferents mecanismes fisiopatològics implicats en l'isquèmia cerebral (Dirnagl, Iadecola et al. 1999).

1.5.1 – Exitotoxicitat

Degut a la seva elevada activitat metabòlica i la alta concentració del neurotransmissor-exitotoxina glutamat (Choi 1992), el cervell és especialment vulnerable a la isquèmia. En la isquèmia, el glutamat s'acumula a l'espai extracel·lular com a conseqüència de la depleció energètica i el mal funcionament del transport actiu i els mecanismes de recaptació (Choi and Rothman 1990). L'acumulació del glutamat causa una estimulació sostinguda dels receptors ionotròpics AMPA i NMDA i provoca una entrada massiva de calci, sodi i aigua dins la cèl·lula. L'entrada de calci activa processos catabòlics mediat per proteases, lipases i nucleases (Ankarcrona, Dypbukt et al. 1995). A més, l'activació de nNOS, PLA2 i altres enzims dependents de calci duen a la producció de NO, metabòlits de l'àcid araquidònic i superòxid que actuen com a iniciadors de processos de mort (Dirnagl, Iadecola et al. 1999; Lo, Dalkara

et al. 2003). A més a més, la localització i la composició en diferents subunitats del receptor d'NMDA regula de manera diferent la supervivència o mort de les neurones, tot i que en tots els casos l'últim causant de la mort és una sobrecarrega de calci i el dany mitocondrial (Stanika, Pivovarova et al. 2009).

L'alliberació massiva de glutamat i la pèrdua de la homeòstasi iònica també té un efecte negatiu a nivell del teixit. Les *cortical spreading depolarization* (CSD) o *perinfarct depolarization* (PID) són un fenomen que consumeix gran quantitat d'energia, causat bàsicament per l'alliberament del glutamat i el K^+ però també de els altres processos implicats en el desequilibri iònic (p.ex.: canals dependents de voltatge, canals de Ca^{2+}), que es caracteritza per una lenta i massiva despolarització de neurones i astròcits i que causa un desequilibri dels gradients iònics (Somjen 2001). S'ha observat aquest fenomen per tècniques d'imatge i electrofisiologia en pacients d'ictus (Dohmen, Sakowitz et al. 2008).

Tot i la clara implicació del glutamat en la mort isquèmica en el laboratori, diversos assajos clínics dirigits als receptors NMDA i AMPA no han estat capaços de millorar el pronòstic en pacients d'ictus (Ginsberg 2009).

1.5.2 – Despolarització anòxica

Amb la pèrdua de càrrega energètica per la disminució de la concentració d'ATP s'inactiva el transport actiu a través de la membrana per part de la bomba de Na^+/K^+ . Això produeix canvis en la homeòstasi iònica ja que augmenta el K^+ extracel·lular, i a la vegada es produeix una entrada de Na^+ i Ca^{2+} al interior neuronal. Aquest intercanvi iònic fa que la membrana es despolaritzi perdent el potencial de membrana de repòs (Katsura, Kristian et al. 1994). La entrada de Ca^{2+} a l'interior de la neurona permet que la vesícula sinàptica es fusioni amb la membrana i alliberar neurotransmissors excitadors al espai sinàptic (exitotoxicitat) (Meyer 1989). Aquesta hiperexcitabilitat neuronal que té efectes neurotòxics en el cervell es desencadena de forma massiva en el cervell isquèmic (Choi 1988; Siesjo and Bengtsson 1989).

Una de les complicacions secundàries d'aquest procés és que per compensar l'entrada d'ions també entra aigua a l'interior de neurones i astròcits. Aquesta entrada és la

causant de l'edema citotòxic (Ito, Ohno et al. 1979) que és una de les principals causes de mort cel·lular en la fase aguda ja que pot comprimir estructures sanes del cervell (Douglas, Callaway et al. 2011). L'edema es considera màxim entre les 13 i 48 hores post-isquèmia (Gotoh, Asano et al. 1985).

1.5.3 – Estrès oxidatiu i nitrosatiu

L'estrès oxidatiu i nitrosatiu és també un potent mediador en el dany isquèmic. El cervell es particularment vulnerable al dany oxidatiu degut al seu alt percentatge lipídic i el seu elevat consum d'oxigen (20 % del total del cos) (Adibhatla and Hatcher 2010). Les espècies reactives del oxigen (ROS), en condicions fisiològiques, juguen un paper en mecanismes de senyalització cel·lular, la mitogènesi, la resposta immune, la senescència cel·lular, l'apoptosi o l'eliminació de compostos tòxics (Bergendi, Benes et al. 1999). La coordinació i regulació de ROS esta controlada pels antioxidants endògens de la cèl·lula. Quan els antioxidants no són capaços de controlar els nivells de ROS en resulta l'estrès oxidatiu (Crack and Taylor 2005). La producció descontrolada de ROS produeix danys en estructures cel·lulars tals com la peroxidació lipídica, la desnaturalització de proteïnes, l'inactivació d'enzims o dany al DNA (Allen and Bayraktutan 2009). Fins fa poc es creia que la majoria de ROS generat durant la isquèmia era degut al mitocondri durant el transport electrònic i la fosforilació oxidativa. Recentment però s'ha vist que les NADPH oxidases són les principals productores de l'anió superòxid tant *in vivo* com *in vitro* durant l'activació dels receptors NMDA i l'isquèmia (Brennan, Suh et al. 2009). Així doncs, sembla que el mitocondri no seria la principal font de radicals lliures després de l'activació dels receptors NMDA. El ROS produït per la NADPH oxidasa podria tenir però un efecte de desacoblament de la funció mitocondrial i es generaria ROS al mitocondri de forma secundària. Aquests descobriments posen de relleu la necessitat de entendre millor la relació entre les diferents fonts de ROS.

L'òxid nítric (NO) té un paper fisiològic important al cervell. És produït per les dues isoformes de la sintasa d'òxid nítric (NOS): eNOS o NOS tipus III, que es troba en les cèl·lules endotelials, i la nNOS o NOS tipus I que es troba en les neurones. L'NO generat per les dues isoformes es produeix en petites quantitats per increments transitoris de

calci. Aquest NO és essencial per el control del flux sanguini al cervell ja que té un efecte vasodilatador. El NO produït per la nNOS, a més, té funcions de neurotransmissor i esta implicat en plasticitat sinàptica, modulació de la funcions endocrines, la formació de la memòria i el comportament (Szabo 1996; Guix, Uribealago et al. 2005). Les espècies reactives del nitrogen (RNS) però, resultat de la interacció amb ROS (Figura 6), tenen efectes nocius sobre la cèl·lula tals com: l'inhibició d'enzims mitocondrials, facilitant la formació del pore de transició mitocondrial, el dany en el ADN, l'activació de PARP, que pot induir la sortida d'AIF del mitocondri o l'activació del canal TRPM7, que és permeable al calci (Aarts and Tymianski 2005; Pacher, Beckman et al. 2007).

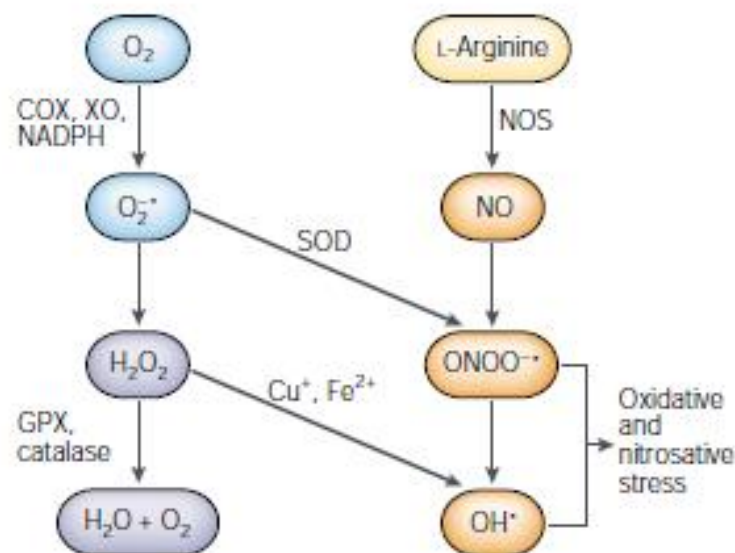


Figura 1.5. Interacció entre els radicals de l'oxigen i el nitrogen en l'isquèmia. Relació entre les vies de senyalització implicades en la producció dels radicals de l'oxigen i el nitrogen en l'isquèmia. COX: cyclooxygenase; GPX: glutathione peroxidasa; NOS: nitric oxide sintasa; SOD: superoxide dismutase; XO: xanthine oxidase (Lo, Dalkara et al. 2003).

A més, l'NO també es capaç de modificar proteïnes unint-se de manera covalent a les cisteïnes formant grups S-nitrosothiol. Aquesta modificació post-traduccional afecta la supervivència cel·lular ja que modifica i afecta la funció de proteïnes com les caspases, les *matrix metalloproteinases* (MMP's) (Gu, Kaul et al. 2002) o la GAPDH (Nakamura and Lipton 2009).

Així doncs, la evidència experimental de l'implicació de l'estrès oxidatiu i nitrosatiu en la isquèmia és clara. Tot i això, i igual que en el cas dels receptors NMDA, de moment ningun compost antioxidant ni dirigit a neutralitzar aquestes espècies reactives ha passat a la clínica (Shuaib, Lees et al. 2007; Kamat, Gadal et al. 2008).

1.5.4 – Desregulació dels nivells de calci

Es sabut que l'augment de calci degut a l'activació sostinguda dels receptors de glutamat combinat amb l'alliberament dels dipòsits de calci del mitocondri i el reticle endoplasmàtic no representa el total del influx de calci resultant de l'estímul isquèmic. Altres receptors i bombes iòniques activats durant la isquèmia estan implicats en la entrada de calci: l'antiport de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (Bano, Munarriz et al. 2007), hemicanals de conexina (Contreras, Sanchez et al. 2004), Canals iònics àcid-sensibles (ASICs) (Xiong, Zhu et al. 2004) i canals TRP (del anglès, *transient receptor potential*) (Aarts and Tymianski 2005).

En particular, ASIC1a, activat per l'acidosis isquèmica, està implicat en l'entrada de Ca^{2+} i la seva inhibició té un efecte neuroprotector (Simon 2006). Els receptors ASICs són estimulats en el rang de pH que es troba en el teixit cerebral durant l'isquèmia, explicant així la relació que s'ha trobat entre l'acidosis i l'empitjorament en el pronòstic en animals i humans. El mal funcionament dels canals encarregats de bombejar Ca^{2+} a l'exterior, com l'antiport $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, també contribuiria a l'acumulació del calci dins la cèl·lula. El receptor de prostaglandina E2 EP1 juga un paper en el mal funcionament de l'antiport $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ i la seva inhibició també té un efecte neuroprotector (Kawano, Anrather et al. 2006; Abe, Kunz et al. 2009).

Així doncs, a part de l'exitotoxicitat per glutamat, altres mecanismes juguen un paper important en el desequilibri en l'influx-eflux del calci durant l'isquèmia

1.5.5 – Inflamació

L'isquèmia focal provoca una forta resposta inflamatòria que comença a les poques hores de l'obstrucció del vas i representa una resposta secundària i tardana a l'isquèmia. Implica l'activació de la microglia i els astròcits així com de cèl·lules provinents del torrent sanguini que són atretes per citocines, molècules d'adhesió i

quimioquines a través de les parets del vas. Les diferents cèl·lules i el vas es comuniquen a través d'una xarxa complexa de senyals paracrins i autocrins. La resposta immune evoluciona durant dies (Figura 7) (Kleinig and Vink 2009). Participa tant el sistema immune adaptatiu com l'innat. Amplifica la lesió isquèmica al principi però es creu que podria preparar el terreny per la reparació del teixit en la fase post-isquèmica (Sughrue, Mehra et al. 2004).

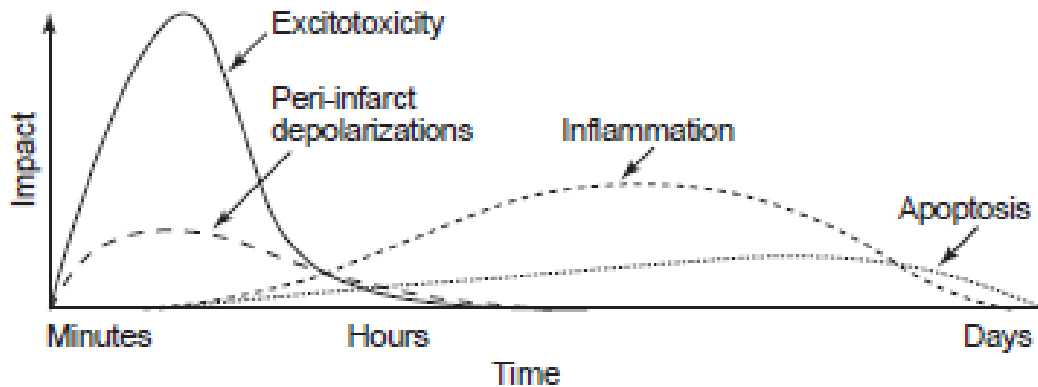


Figura 1.6. Possible cascada d'esdeveniments al llarg del temps després de l'ictus. Extret de (Dirnagl, Iadecola et al. 1999).

Les cèl·lules endotelials del vas obstruït són les primeres en rebre l'efecte de la isquèmia i la seva reacció inicia la resposta inflamatòria. La producció de citocines com el TNF α i la IL1 β en les cèl·lules vasculares, macròfags i microglia del voltant augmenten l'expressió de molècules d'adhesió (p.ex.: ICAM-1, P i E-selectin) que, juntament amb les integrines, promouen l'adhesió dels leucòcits a les parets del vas (Zhang, Chopp et al. 1998). Els neutròfils són les primeres cèl·lules de la sang en passar al cervell, seguides pels monòcits i, a partir de 1-2 dies, els limfòcits. La majoria de cèl·lules immunes presents però són la microglia del propi cervell que es transforma en macròfags i migra a la zona fronterera i, junt amb els macròfags d'origen sanguini, ajuda a fagocitar les cèl·lules mortes i a produir substàncies proinflamatòries (Schilling, Besselmann et al. 2003).

Les molècules alliberades per cèl·lules danyades o mortes contribueixen a la resposta inflamatòria. Lipoproteïnes, *heat shock proteins* o l'àcid hialurònic són capaces d'activar el sistema immune innat a través de l'unió als TLR (*toll-like receptors*). Els

TLR's s'expressen en diferents cèl·lules i, conjuntament amb altres receptors, serveixen per detectar senyals perilloses i activar la resposta immune depenent de NF- κ B (Oppenheim and Yang 2005; Wang, Tang et al. 2007). A part de l'NF- κ B, altres factors de transcripció com *activator protein-1*, STAT-3 i C/EBP beta tenen un efecte proinflamatori (Kapadia, Tureyen et al. 2006) mentre que PPARgamma actuaria com un regulador negatiu (Kapadia, Yi et al. 2008). A més dels neutròfils i els monòcits, les cèl·lules T també estarien implicades en la progressió secundària de l'infart. Les cèl·lules T reguladores, que expressen les citocines antiinflamatòries IL10 i TGF β , i que regulen la resposta immune suprimint l'activitat de les cèl·lules T efectores (Liesz, Suri-Payer et al. 2009); i les cèl·lules T gamma-delta, que produïrien la citocina proinflamatòria IL-17 i la supressió de les quals té un efecte neuroprotector (Shichita, Sugiyama et al. 2009).

1.6 – TIPUS DE MORT EN L'ISQUÈMIA CEREBRAL

La necrosi i l'apoptosi són els dos principals mecanismes de mort cel·lular en l'ictus (Figura 8) (Yuan 2006; Yuan 2009). Depenent en part de la magnitud, el tipus d'estímul i el tipus cel·lular la cèl·lula inicia un procés apoptòtic o necròtic, i a vegades característiques de les dues vies es troben de manera conjunta. Tot i l'expressió de procaspases, caspases actives i productes processats per les caspases, la morfologia apoptòtica clàssica rarament es troba en humans adults amb ictus.

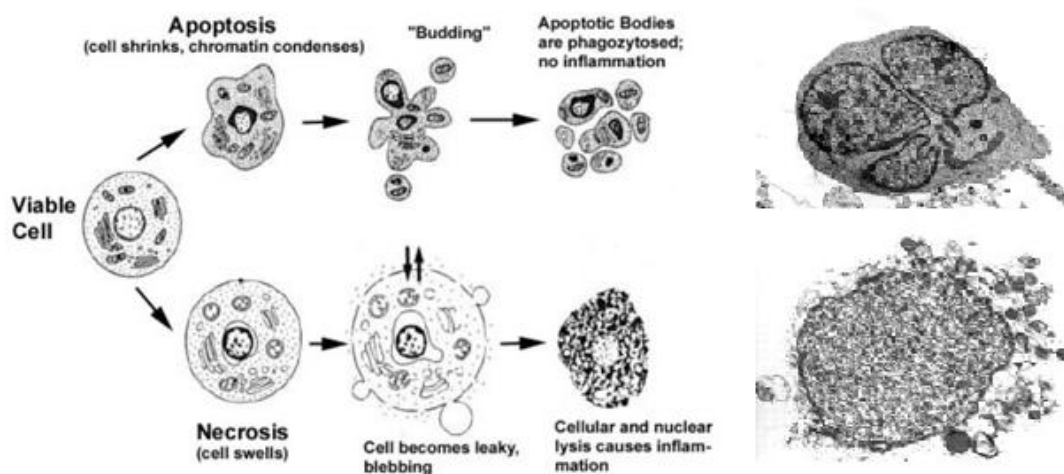


Figura 1.7. Esquema dels processos de mort per necrosi i apoptosi. Les imatges de la dreta

corresponen a imatges de microscòpia electrònica de neurones corticals de rata en cultiu (Ueda, Fujita et al. 2007). Imatge modificada de (Scarabelli, Knight et al. 2006).

1.6.1. - Necrosi

Aquest tipus de mort es caracteritza perquè les cèl·lules no poden mantenir la seva integritat estructural, normalment a causa del influx d'ions i aigua a l'interior cel·lular, fet que provoca edema citotòxic de les cèl·lules, la dissolució nuclear (*karyolisis*) i finalment la lisis cel·lular (Trump and Berezsky 1996). Aquest tipus de mort causa dany en la mitocòndria i el col·lapse energètic. Es considera que és el tipus de mort que succeeix en qüestió de minuts inicialment en el nucli isquèmic (Pamenter, Perkins et al. 2012).

Fins fa poc es creia que la necrosi era un procés no regulat ni programat, sense cap via de senyalització cel·lular. Ara se sap que algunes cèl·lules, incloses les del cervell, tenen un interruptor molecular dependent dels lligands dels receptors de mort TNF α , Fas i TRAIL (Holler, Zaru et al. 2000) que determina si moriran per necrosi o apoptosi. En aquesta variació de mort cel·lular la necrosi és iniciada per dos cinases: RIP1 i RIP3, que interactuen de manera recíproca (Cho, Challa et al. 2009). RIP3 activa es capaç d'activar enzims com l'encarregat de degradar el glicogen, la glicogen fosforilasa, i dirigir l'apoptosi dependent de TNF α cap a una mort necròtica a través de l'increment del metabolisme energètic i la producció de ROS (Zhang, Shao et al. 2009).

1.6.2 - Apoptosi

L'apoptosi és un tipus de mort cel·lular programada. L'apoptosi clàssica es caracteritza per l'activació de caspases des de la via intrínseca (a través de la sortida del citocrom C del mitocondri) o la via extrínseca (a través de l'activació dels receptors de mort) (Figura 9) (Broughton, Reutens et al. 2009). La cèl·lula manté la integritat estructural externa però en el seu interior s'esdevenen canvis en la composició de la membrana cel·lular, la contracció del citoplasma cel·lular, la fragmentació de l'ADN, la condensació de la cromatina del nucli i finalment la formació dels cossos apoptòtics que són retirats pels macròfags

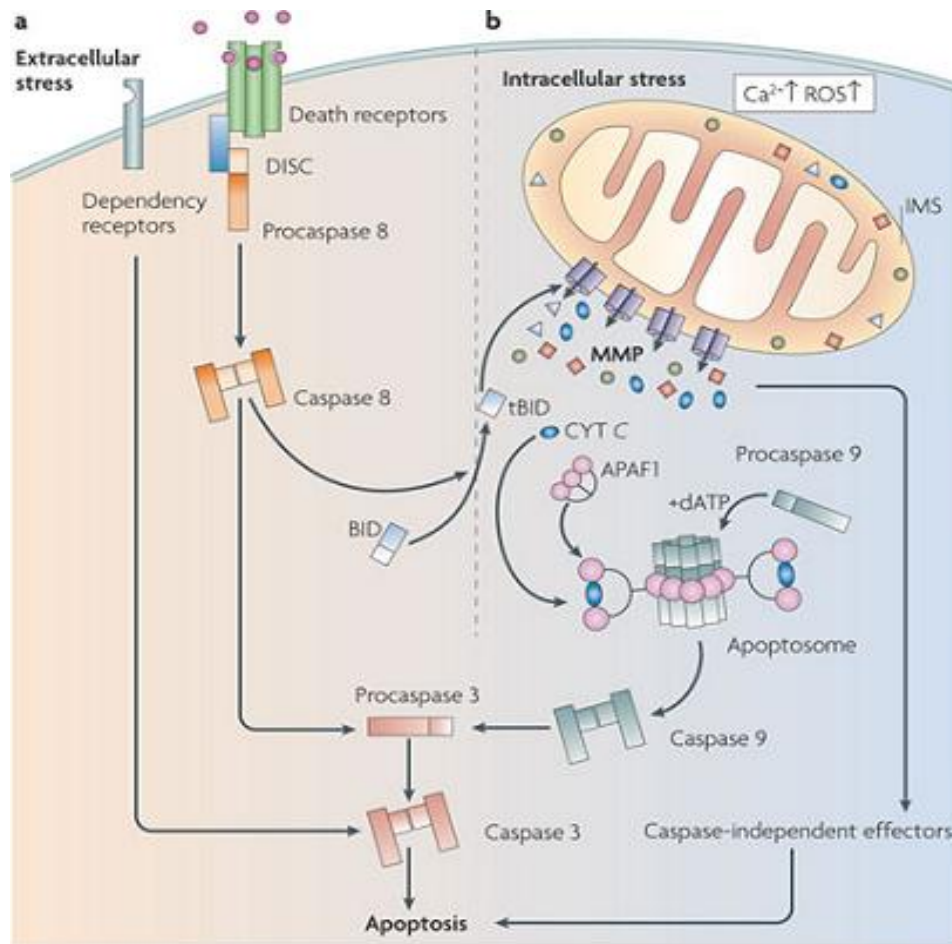


Figura 1.8. Esquema simplificat de les vies apoptòtiques. L'extrínseca, a partir de l'activació dels receptors de mort, i l'intrínseca, a partir de la sortida del citocrom c del mitocondri. Extret de (Galluzzi, Blomgren et al. 2009).

És una mort dependent d'energia ja que requereix el consum de NAD, per als processos de poli ADP-ribosilació, i un mínim d'ATP/dATP per la formació del apoptosoma (Kim, Du et al. 2005), i per això s'associa a la zona de penombra on la isquèmia és menys severa (Bonfoco, Krainc et al. 1995).

1.6.2.1 - Via intrínseca i extrínseca

La via intrínseca requereix l'alliberament al citosol de proteïnes específiques que normalment resideixen en l'espai intermembrana del mitocondri (Kroemer, Galluzzi et al. 2007). Aquestes proteïnes surten del mitocondri per la formació del MTP (*mitochondrial transition pore*). Aquest canal, que es forma degut a l'augment en la concentració de Ca^{2+} , l'estrès oxidatiu i la depleció dels nucleòtids d'adenina deixa passar de manera inespecífica soluts més petits que 1,5 kDa (Halestrap 2006). No es

coneix completament la composició del por però s'han identificat tres proteïnes fortament implicades: *l'adenine nucleotide translocase* (en la membrana mitocondrial interna), un canal aniònic dependent de voltatge en la membrana externa i la ciclofilina D (Leung and Halestrap 2008). El MTP esta implicat directament en la mort isquèmica ja que el tractament amb ciclosporina A, un inhibidor de l'obertura del por a través de la unió amb la ciclofilina D, redueix de forma dramàtica (65-90 %) el volum d'infart quan és administrada immediatament després de la reperfusió (Shiga, Onodera et al. 1992). En la mateixa direcció, ratolins deficients en ciclofilina D tenen infarts menors (Schinzel, Takeuchi et al. 2005). Semblaria però, que la formació del MTP tindria més a veure amb la necrosis que amb la apòdosi clàssica, ja que cèl·lules deficients en ciclofilina D mostrarien resistència contra la necrosis induïda per excés de Ca^{2+} o ROS però no per inductors de l'apoptosi com l'staurosporina (Nakagawa, Shimizu et al. 2005).

La més caracteritzada d'aquestes proteïnes que s'alliberen al citosol durant la formació del MTP és el citocrom c. En el citosol, el citocrom c forma un complex anomenat apoptosoma conjuntament amb la procaspasa-9, APAF-1 (*apoptotic protease activating factor*) i dATP. La formació de l'apoptosoma activa la caspasa-9 que talla i activa altres caspases. Particularment important és l'activació de la caspasa-3, que té com substrat, entre d'altres, la nucleasa ICAD, la qual un cop activa (CAD) és l'encarregada de tallar el DNA genòmic entre nucleosomes i formar el *ladder* observat en la morfologia apoptòtica (Hengartner 2000). S'ha observat un alliberament de citocrom c al citosol per diverses tècniques després d'una isquèmia focal. Aquest alliberament s'observa només en les neurones (Fujimura, Morita-Fujimura et al. 1998). Tot i això, no hi ha una forta correlació entre l'alliberament del citocrom C i la morfologia apoptòtica. Això pot ser degut a que l'alliberament del citocrom c i la posterior mort depenent de la formació de l'apoptosoma es vegin tapades per altres vies (Sims and Muyderman 2010).

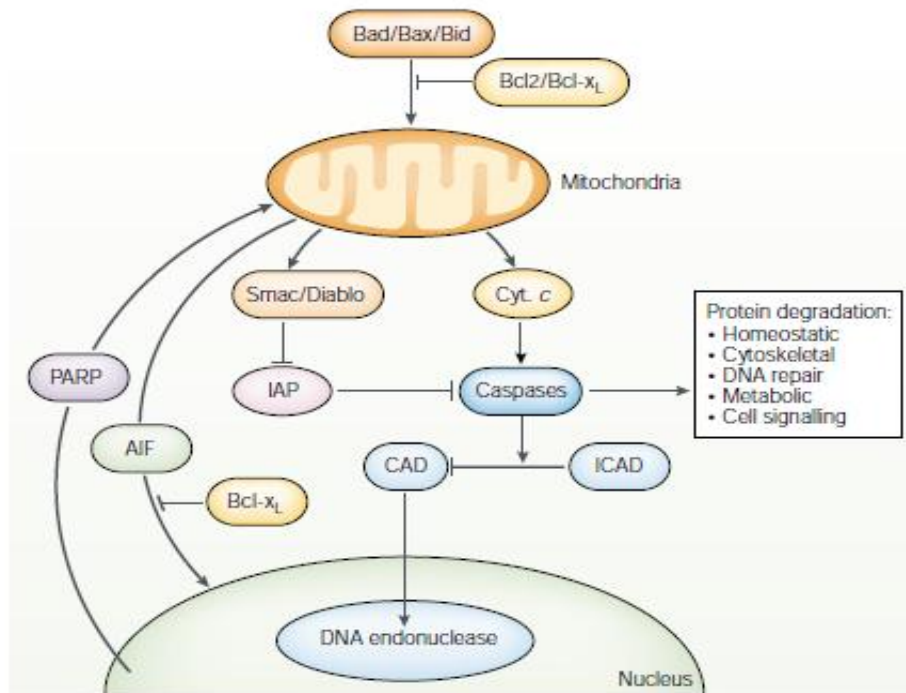


Figura 1.9. Esquema simplificat de la via intrínseca en l'isquèmia. Mecanismes de mort cel·lular presents en l'isquèmia a partir de la permeabilització del mitocondri. Extret de (Lo, Dalkara et al. 2003).

Altres proteïnes alliberades de l'espai intermembrana també promouen l'activació de les caspases però d'una forma menys directa que el citocrom C. Smac/DIABLO i Omi/HtrA2 s'uneixen i bloquegen l'acció de les proteïnes de la família de les IAP's (*inhibitor of apoptosis proteins*). Les IAP's inhibeixen les caspases 3, 7 i 9. Bloquejant les IAP's Smac/DIABLO i Omi/HtrA2 incrementen les conseqüències de l'activació de les caspases i promouen la mort neuronal. El tractament amb un inhibidor de l'activitat proteolítica de Omi/HtrA2 abans de l'inducció de la isquèmia en rates disminueix moderadament el dany en el DNA en el teixit post-isquèmic (Althaus, Siegelin et al. 2007). Tot i que sembla que sí hi hauria una activació de la via intrínseca en la isquèmia, s'ha vist que no hi ha una forta correlació entre la presència del citocrom C al citosol i la morfologia apoptòtica (Sims and Muyderman 2010).

Via extrínseca: És la via que depèn de l'activació dels receptors de mort (explicada a l'apartat 5.2).

La caspasa-3 és la més abundant al cervell. S'ha vist un increment de la caspasa-3 activa a les poques hores de la isquèmia en neurones i es pot observar tant en el *core* o

nucli isquèmic com en la penombra isquèmica després de la reperfusió. L'ús de ratolins sense caspasa-3 (la majoria de línies no són viables) (Namura, Zhu et al. 1998) o l'ús d'inhibidors de les caspases (Endres, Namura et al. 1998) o específicament de la caspasa-3 (Hara, Friedlander et al. 1997) tenen un efecte neuroprotector reduint el volum d'infart en un model d'isquèmia temporal.

1.6.2.2 - Mecanismes de mort independent de caspases

La permeabilització de la membrana mitocondrial també pot alliberar proteïnes que inicien apoptosi independent de caspases (Krantic, Mechawar et al. 2007). El mediador més estudiat d'aquest tipus de mort és l'AIF (*apoptosis inducing factor*). L'AIF és una proteïna transmembrana de 62 kDa que resideix en la membrana interna del mitocondri. Després de la permeabilització del mitocondri la porció intermembrana (57 kDa) és tallada i alliberada al citosol per catepsines i calpaïnes activades per Ca^{2+} . Un cop al citosol l'AIF es transloca al nucli on degrada el DNA en fragments més grans que els produïts per l'activació de la caspasa-3 (Kroemer, Galluzzi et al. 2007).

S'ha observat que l'AIF juga un paper en la mort isquèmica, ja que la regulació negativa dels nivells d'AIF redueix la mort apoptòtica en un model d'OGD. A més, en ratolins *Harlequin*, els quals expressen AIF en nivells més baixos (un 20 % respecte els wt), presenten volums d'infart menors en un model d'isquèmia focal (Culmsee, Zhu et al. 2005).

Una altra proteïna implicada en la mort isquèmica independent de caspases és l'enzim PARP. PARP és un enzim que s'activa quan hi ha dany en el DNA i genera cues de poli-ADP ribosa que serveixen com a senyal pels mecanismes de reparació (Dawson and Dawson 2004). En un model d'isquèmia focal el volum d'infart es veia reduït tan en ratolins *PARP*^{-/-} en més d'un 50 % (Goto, Xue et al. 2002) com amb l'ús d'inhibidors contra PARP (Endres, Wang et al. 1997). L'activació de PARP indueix la sortida de l'AIF al citosol i aquests dos esdeveniments alhora són dependents de l'estrès oxidatiu ja que es veuen disminuïts per l'ús d'inhibidors de la NOS (Culmsee, Zhu et al. 2005; Li, Nemoto et al. 2007). PARP també es capaç de produir necrosis en determinades situacions (Festjens, Vanden Berghe et al. 2006). L'excessiva activitat de PARP pot buidar el dipòsit de NAD^+ , el substrat per la formació de poli-ADP ribosa, i els baixos

nivells d'ATP poden limitar la formació de nou NAD⁺ a partir de la reacció depenent d'ATP NAD sintasa. Aquesta depleció de NAD⁺ i ATP pot dur a la necrosi (Soane, Kahraman et al. 2007).

1.7- RECEPTORS DE MORT

1.7.1 -Classificació

Els receptors de mort o receptors de la superfamília del factor de necrosi tumoral (TNF, del anglès *tumor necrosis factor*) estan involucrats en processos de proliferació, diferenciació i apoptosi. Són proteïnes integrals de membrana, la majoria de tipus I (amb un sol pas transmembrana), amb l'extrem N-terminal a la cara extracel·lular i el C-terminal intracel·lular. Tenen un domini extracel·lular conservat format per dominis rics en cisteïnes, una regió transmembrana i un domini intracel·lular conservat anomenat *domini de mort* (DD, del anglès, *death domain*). A través del DD es poden reclutar proteïnes adaptadores que inicien la senyalització apoptòtica (Ashkenazi and Dixit 1998).

Actualment s'han caracteritzat vuit receptors de la superfamília del TNF- α amb DD en la cara intracel·lular: el receptor de TNF- α tipus I (TNFR1; també conegut com DR1, CD120a, p55 i p60), el CD95 (també conegut per FasR, DR2 i APO-1), el DR3 (també conegut com APO-3, LARD, TRAMP, i WSLT), el TRAILR1 (del anglès *TNF-related apoptosis-inducing ligand*; també conegut com DR4 o APO-2), el TRAILR2 (conegut també com DR5, KILLER i TRICK2), el DR6, el receptor de la ectodisplasina A i el receptor del factor de creixement nerviós p75 (p75^{NTR}) (Ashkenazi and Dixit 1998).

Els lligands que activen aquests receptors, amb l'excepció del factor de creixement nerviós (NGF), són molècules relacionades estructuralment que pertanyen a la superfamília gènica del TNF- α . CD95L s'uneix a CD95; TNF- α i linfoxina α s'uneixen a TNFR1; el lligand TL1A (també anomenat VEG1, del anglès, *vascular endothelial cell growth inhibitor*) s'uneix al DR3; i TRAIL s'uneix a DR4 i DR5 (Ashkenazi and Dixit 1998).

Després de l'unió dels lligands al receptor es poden formar dos tipus de complexes de senyalització. El primer tipus de complex de senyalització és l'anomenat *complex inductor de la senyalització de mort* (DISC, del anglès, *death inducing signaling*

complex), que es forma per l'activació dels receptors CD95, TRAILR1 i TRAILR2. Aquests tres receptors formen un DISC de composició molt semblant, que té com a conseqüència l'activació de la caspasa-8 i l'inici de la senyalització apoptòtica. El segon tipus de complex te lloc després de l'activació dels receptors TNFR1, DR4 i DR6. La seva activació provoca el reclutament de tota una sèrie de proteïnes adaptadores que poden donar lloc a senyalització d'apoptosi o supervivència.

1.7.2 – Via de senyalització de FasR i TNFR1

TNFR1 i Fas formen part dels receptors de la família dels receptors de mort. Fas indueix apoptosi. Quan el lligand (FasL) s'uneix a la regió extracel·lular de Fas, a la regió intracel·lular s'uneix la proteïna adaptadora FADD a través del DD. FADD alhora conté un domini DED (del anglès, *death effector domain*) al qual s'uneix la caspasa-8, que conté dos dominis DED en el seu prodomini (Carrington, Sandu et al. 2006). Aquest complex format per Fas, FADD i la caspasa-8 forma el DISC, el qual aproxima els dominis catalítics de les caspases per la seva dimerització, autoprocessament i activació (Figura 11) (Kischkel, Hellbardt et al. 1995).

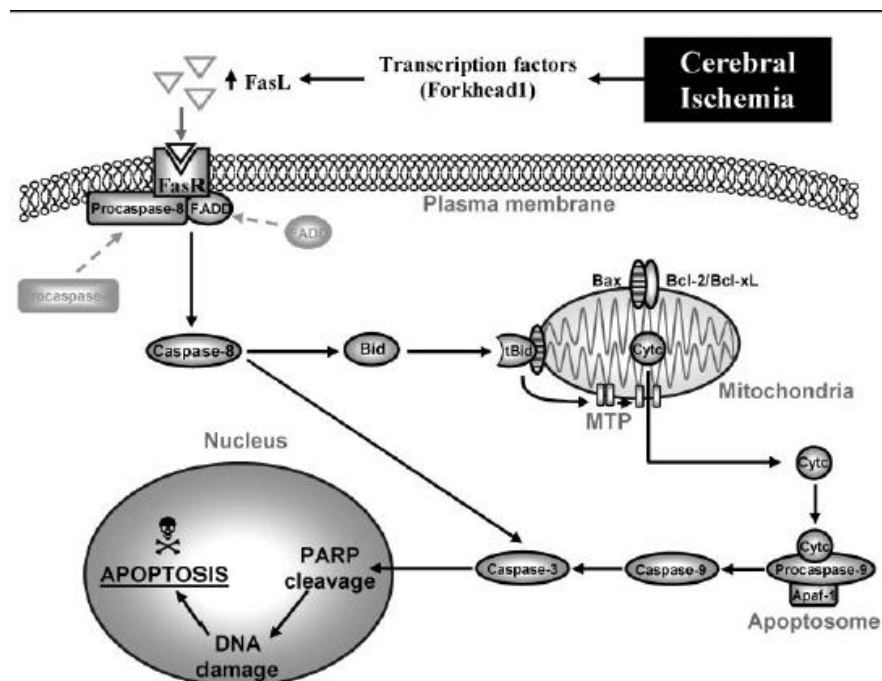


Figura 1.10. Esquema de la via de FasL/FasR en l'isquèmia cerebral. Activació de la via apoptòtica extrínseca a partir del receptor de mort Fas després de l'isquèmia cerebral. Extret de (Broughton, Reutens et al. 2009).

Un cop el TNF α s'uneix al receptor TNFR1 a la cara extracel·lular, al DD de la cara citosòlica se li uneix la proteïna TRADD (del anglès *TNF receptor-associated DD*) a la qual se li uneixen RIP1 (del anglès *receptor-interacting protein kinase 1*), cIAP1 i 2 (del anglès *celular inhibitor of apoptosis 1 i 2*), i TRAF2 (del anglès *TNF receptor-associated factor 2*) (Park, Ye et al. 2000). A aquest complex se l'anomena complex I. RIP1 és poliubiquitinat per cIAP1 i 2, i la cadena d'ubiquitina serveix per reclutar el complex I κ B cinasa (IKK), duent a l'activació del factor NF- κ B (Ea, Deng et al. 2006; Dynek, Goncharov et al. 2010). Si es retira la cadena de poliubiquitina de RIP1 amb una desubiquitinasa (Sun 2010) o bloquejant l'activitat ubiquitina lligasa de cIAP1 i 2 (amb antagonistes o bloquejant la seva expressió), llavors RIP1 i la proteïna de la seva mateixa família RIP3 són reclutades en un altre complex conjuntament amb TRADD, FADD i caspasa-8 formant el complex II al citoplasma (Figura 1)(Micheau and Tschopp 2003; Feoktistova, Geserick et al. 2011). Aquest complex, en absència d'inhibidors de la caspasa-8, promou l'activació d'aquesta i l'inducció de l'apoptosi. L'activació de la caspasa-8 també talla Bid. Bid activa es transloca al mitocondri i facilita l'alliberament del citocrom c, connectant així la vies apoptòtiques extrínseca i intrínseca (Yin 2000). L'activació o no de la via apoptòtica induïda per TNFR1 depèn de l'equilibri entre els factors de transcripció NF- κ B i JNK, on NF- κ B promou la supervivència cel·lular mentre que una activació prolongada de JNK incrementa la mort depenent de TNF α (De Smaele, Zazzeroni et al. 2001; Karin and Lin 2002; Papa, Zazzeroni et al. 2004).

La caspasa-8 activa talla RIP1 i RIP3 (Bertrand, Milutinovic et al. 2008). Quan s'inhibeixen les caspases a través de l'ús d'inhibidors farmacològics o sota determinades situacions com les infeccions virals, RIP1 i RIP3 formen un complex anomenat necrosoma que inicia una mort necròtica programada o necroptosi (Cho, Challa et al. 2009; Zhang, Shao et al. 2009). A més de RIP1/RIP3 el complex està format per la proteïna MLKL (del anglès, *mixed lineage kinase domain like protein*).

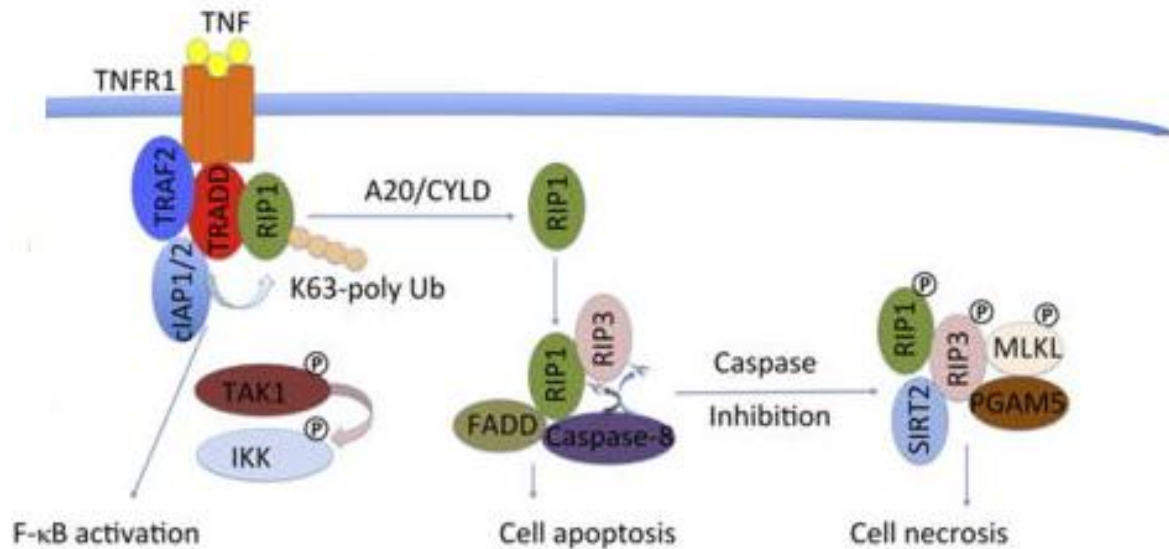


Figura 1.11. Esquema de la via TNF α /TNFR1 en l'apoptosi i la necrosis. Activació de vies de senyalització de mort a partir del receptor TNFR1. Extret de (Li, Yin et al. 2013).

1.7.3 - Fas i TNF α en l'isquèmia

Tant Fas com TNF α són lligands involucrats en la mort cel·lular isquèmica. El dany isquèmic provoca l'activació de les JNK's (del anglès *c-Jun N-terminal kinases*) (Knight and Buxton 1996) que activen el factor de transcripció c-Jun (Hibi, Lin et al. 1993) que indueix l'expressió de TNF α (Kramer, Wiegmann et al. 1995) i FasL (Faris, Kokot et al. 1998) així com TRAIL (Martin-Villalba, Herr et al. 1999). L'augment dels nivells d'aquests agonistes es detecta a partir de les 12 hores, lo qual esta en línia amb l'inici tardà de la mort apoptòtica. *In vitro* tan TNF α , FasL com TRAIL són capaços d'induir la mort (60-70 %) tant en cèl·lules de neuroblastoma com en cultius corticals neuronals (Martin-Villalba, Herr et al. 1999; Badiola, Malagelada et al. 2009).

L'evidència més directa de l'implicació de FasR en el dany isquèmic és la que s'ha vist en ratolins *lpr*, els quals tenen una mutació al receptor Fas que el fa inactiu, i que presenten un menor dany isquèmic en un model d'isquèmia focal (Martin-Villalba, Herr et al. 1999; Rosenbaum, Gupta et al. 2000). També s'ha vist una disminució de la necrosis i l'inhibició de la mort apoptòtica en un model d'infart cardíac a través del silenciament de la proteïna adaptadora del DISC, FADD (Fan, Huang et al. 2013).

El paper del TNF α genera més controvèrsia degut a l'existència de resultats en sentits oposats. En un sentit, s'ha descrit que l'addició de TNF α exogen abans de l'isquèmia en un model d'oclusió de l'ACM incrementa el volum d'infart d'una manera dosis dependent (Barone, Arvin et al. 1997). En el mateix sentit la injecció de TNF α directament al cervell provoca el trencament de la barrera hematoencefàlica (Trembovler, Beit-Yannai et al. 1999). Inversament, el pretractament amb anticossos solubles anti-TNF α , els quals s'uneixen al TNF α i eviten l'unió amb el receptor, també redueix el dany isquèmic en un model d'oclusió de l'ACM. A més disminueixen l'expressió de la molècula d'adhesió ICAM-1 (del anglès, *intercelular adhesión molecule-1*) respecte els controls (Lavine, Hofman et al. 1998; Yang, Gong et al. 1998). També el bloqueig del TNF α a través d'altres vies com la proteïna TBP (de anglès, *tnf binding protein*), un inhibidor endogen del TNF α que surt de la proteòlisis de la part extracel·lular del receptor i competeix amb el TNF α per la unió al receptor, així com de dímers solubles de TNFR1 han demostrat una millora en la recuperació motora, la reducció en la formació de l'edema i un menor volum d'infart (Dawson, Martin et al. 1996; Shohami, Bass et al. 1996; Nawashiro, Martin et al. 1997).

Per altre banda, s'ha descrit que l'ús de ratolins sense receptors de TNF α (TNFR1 i TNFR2) tenen un volum d'infart major així com un augment en l'estrès oxidatiu 24 hores després de l'infart respecte els controls en un model d'oclusió de l'ACM (Bruce, Boling et al. 1996). El silenciament per separat dels receptors TNFR1 i TNFR2 tampoc ha ajudat a aclarir-ho. Tot i que en principi TNFR2 activa NF- κ B i està més associat amb vies de supervivència i TNFR1 amb vies de mort hi ha resultats que indiquen un augment del volum d'infart en ratolins TNFR1 $^{-/-}$ (Gary, Bruce-Keller et al. 1998) i resultats on ratolins TNFR2 $^{-/-}$ tenen una major sensibilitat a la mort per hipòxia (Shen, Li et al. 1997).

La majoria de resultats semblen indicar que el TNF α té un efecte deleteri en la isquèmia. Així s'ha vist també en un model de privació d'oxigen i glucosa, on l'addició d'anticossos anti-TNF α disminueix la mort apoptòtica observada però no la necròtica. L'apoptosi és en part induïda per el TNFR1 i l'activació de la caspasa-8 i 3 (Badiola, Malagelada et al. 2009).

1.8- ANTAGONISTES DELS RECEPTORS DE MORT

Els antagonistes dels receptors de mort són proteïnes que inhibeixen en algun punt la via de senyalització de mort induïda per aquests receptors.

1.8.1 –FLIP

FLIP (del anglès, *FLICE-inhibitory protein*) va ser trobat en un principi en virus (v-FLIP) com un mecanisme per evitar la resposta apoptòtica en la cèl·lula hoste (Thome, Schneider et al. 1997). Més tard es va trobar l'homòleg cel·lular (c-FLIP) (Irmeler, Thome et al. 1997). A nivell de proteïna c-FLIP existeix en tres variants d'*splicing*, la curta, FLIP_s, la llarga, FLIP_L, i més recentment una nova variant anomenada FLIP_R (Irmeler, Thome et al. 1997; Shu, Halpin et al. 1997). Estructuralment FLIP_L s'assembla a la caspasa-8, amb dos DED (*death effector domain*) i un domini *caspase-like*. La diferència rau en que al domini caspasa de FLIP_L li falta la cisteïna del centre actiu i no és per tant funcional. FLIP_s i FLIP_R són estructuralment iguals a v-FLIP, contenint els dos dominis DED però sense domini caspasa (Yu, Jeffrey et al. 2009).

c-FLIP és un important modulador dels receptors de mort ja que les tres variants competeixen amb la caspasa-8 per la unió al complex de senyalització de mort a través dels DED. Degut a la seva similitud estructural amb la caspasa-8, cFLIP_L pot ser tallat per la caspasa-8 deixant un fragment de 43 kDa que encara conté els DEDs i per tant roman unit a FADD i evita el processament complet i l'activació de la caspasa-8 (Krueger, Schmitz et al. 2001). L'expressió de c-FLIP és depenent de NF-κB (Thome and Tschopp 2001) i la degradació de FLIP_L és depenent de l'activitat de JNK a través de la fosforilació i activació de la proteïna ubiquitina ligasa Itch que ubiquitinitza i provoca la seva degradació pel proteosoma (Chang, Kamata et al. 2006).

FLIP confereix resistència a l'apoptosi induïda pels receptors de mort en un gran nombre de tipus cel·lulars (Irmeler, Thome et al. 1997; Thome, Schneider et al. 1997; Yeh, Itie et al. 2000). FLIP també juga un paper important en la regulació del sistema immune (Tseveleki, Bauer et al. 2004). En el sistema nerviós central juga un paper en el creixement neurític controlat per neurotrofines (Moubarak, Sole et al. 2010) o en el

control de la mort per apoptosi de les motoneurons durant el desenvolupament embriogènic (Raoul, Henderson et al. 1999).

En l'ictus, s'ha vist que FLIP_L és capaç de protegir les neurones en un model d'isquèmia *in vivo* així com en un model de privació de glucosa *in vitro* (Taoufik, Valable et al. 2007).

1.8.2 -IAPs

Les proteïnes de la família de les IAPs (del anglès, *inhibitor of apoptosis protein*) juguen un paper important en l'apoptosi i la proliferació cel·lular i estan presents en un ampli espectre d'organismes tals com virus, llevats, nematodes, drosophila, peixos o mamífers. En humans la família de les IAP's esta formada per 8 membres: XIAP (del anglès, *X-chromosome-linked IAP*), cIAP1 i cIAP2, NAIP (del anglès, *neuronal apoptosis inhibitor protein*), ILP2 (del anglès, *IAP-like protein 2*), livin (o melanoma IAP, MLIAP), BRUCE (o Apollon) i survivin (Figura 13) (Hunter, LaCasse et al. 2007).

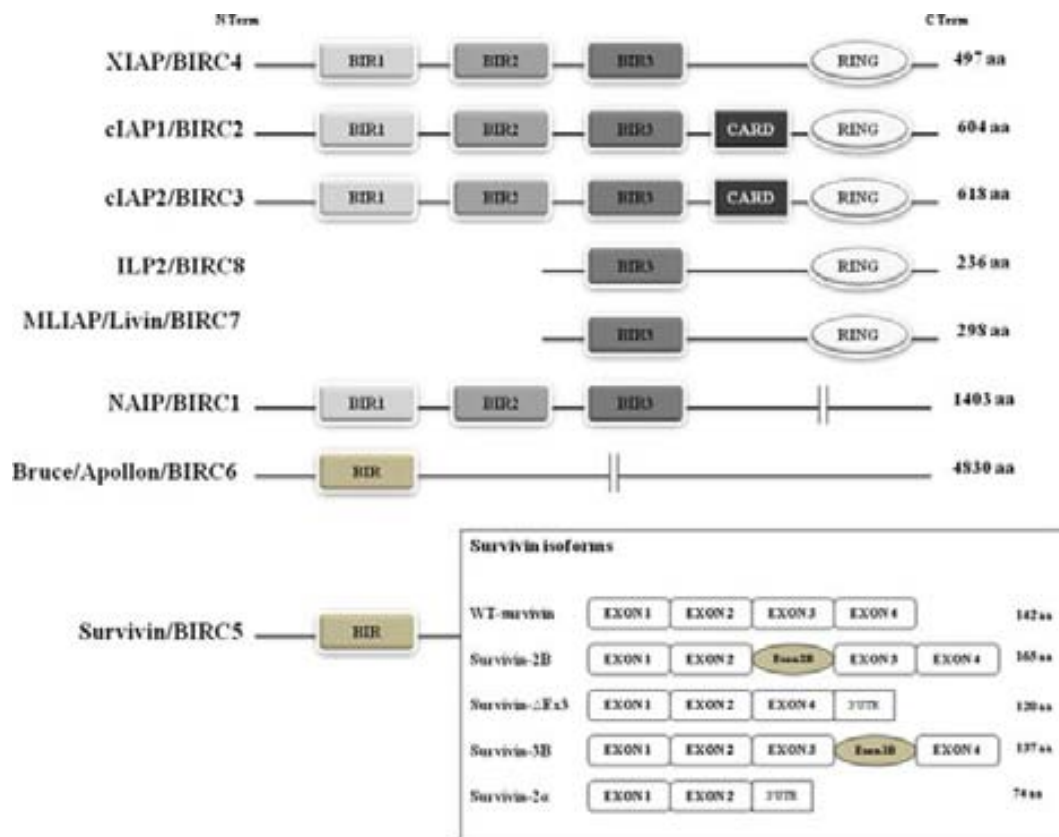


Figura 1.12. Esquema dels diferents membres de la família de les IAPs i els seus dominis. 3'UTR: 3' untranslated region; WT: wild-type. Extret de (Nogueira-Ferreira, Vitorino et al. 2013).

Tots els membres tenen en comú la presència d'un a tres dominis BIR (del anglès, *Baculovirus IAP Repeat*). Els dominis BIR uneixen i inhibeixen les caspases. Cada domini BIR té una especificitat per una caspasa, així, BIR1 i BIR2 inhibeixen les caspases 3 i 7 mentre que BIR3 inhibeix la caspasa-9 (Lukacs, Belunis et al. 2013). El domini RING de les IAP's forma dímers i té activitat ubiquitina ligasa (Metzger, Pruneda et al. 2014). I el domini CARD (del anglès, *caspase activation and recruitment domain*) present en cIAP1 i cIAP2 permet a aquestes proteïnes unir-se als complexos de senyalització del TNFR1 i 2 a través de la unió als dominis DED. A més poden reclutar altres proteïnes als complexos de senyalització.

XIAP és l'únic membre de les IAP's capaç d'inhibir caspases actives. XIAP pot inhibir l'apoptosi a través de l'unió i l'inactivació de la caspasa iniciadora caspasa-9 i les caspases executores 3 i 7 (Chai, Shiozaki et al. 2001; Riedl, Renatus et al. 2001; Shiozaki, Chai et al. 2003). Això col·loca a XIAP com un inhibidor de la fase efectora de l'apoptosi, per sota dels receptors de mort i la formació del DISC. En canvi, cIAP1 i cIAP2 poden unir-se però no inhibir directament les caspases (Eckelman and Salvesen 2006). En mamífers no s'ha demostrat l'efecte d'aquestes proteïnes sobre les caspases però a través d'estudis amb l'homòleg de cIAP en *drosophila melanogaster* DIAP1 s'ha observat que l'inhibició podria venir per una poliubiquitinització que inactiva el centre actiu i no senyalitza per degradació al proteosoma (Ditzel, Broemer et al. 2008). A més, a través del domini CARD, s'uneixen al DISC format pel receptor TNFR1 i permeten l'activació del factor de transcripció NF- κ B (explicat a l'apartat 5.2).

En l'ictus, l'ús de ratolins transgènics que sobreexpressen XIAP (Trapp, Korhonen et al. 2003) o l'ús de proteïnes de fusió amb XIAP o els dominis BIR2 o BIR3-RING per separat han demostrat reduir el volum de l'infart en un model d'isquèmia *in vivo* (Guegan, Braudeau et al. 2006). No s'ha vist una implicació directe de cIAP1 i 2 en la mort isquèmica, però s'ha vist un augment dels nivells en el preconditionament isquèmic (Tanaka, Yokota et al. 2004), i el seu paper en la via de senyalització del TNF α així com en l'inhibició de l'apoptosi i en la resposta inflamatòria (Bertrand, Doiron et al. 2009; Labbe, McIntire et al. 2011) fan pensar que juguen un paper.

1.8.3 - FAIM

FAIM (del anglès, *Fas apoptosis inhibitory molecule*) va ser clonat a partir de l'expressió diferencial del mRNA de limfòcits B resistents i sensibles a Fas. FAIM és una proteïna àmpliament conservada al llarg de l'evolució i s'expressa en diferents teixits (Schneider, Fischer et al. 1999). Més tard es va descobrir una forma llarga (FAIM_L), resultat d'una variant d'splicing. A diferència de la forma curta (FAIM_S), FAIM_L s'expressa de manera específica al cervell (Zhong, Schneider et al. 2001). El gen de FAIM està localitzat en el cromosoma 9 (9f1) en ratolins i en el cromosoma 3 (3q21-25) en humans, regions on s'han trobat anomalies associades al càncer en humans, indicant un possible paper de FAIM en l'oncogènesi (Zhong, Schneider et al. 2001).

Tot i que el gen que codifica per FAIM està altament conservat en diferents espècies la seva seqüència no té cap homologia amb cap proteïna antiapoptòtica coneguda (Schneider, Fischer et al. 1999) i la seva estructura en forma de β -sandwich no s'assembla a cap estructura proteica descrita (Hemond, Rothstein et al. 2009).

L'expressió de FAIM antagonitza la mort apoptòtica induïda pels receptors de mort en diferents tipus cel·lulars. En el sistema immune FAIM juga un paper en la resistència dels limfòcits B enfront els estímuls citotòxics d'altres limfòcits T. Aquest estímul és Fas dependent i s'ha observat que els limfòcits B que uneixen i presenten antigen adquireixen resistència a Fas a través de l'augment en l'expressió de FAIM, el qual augmenta l'expressió del factor de transcripció NF- κ B (augmentant també Bcl-xL i FLIP) (Rothstein, Wang et al. 1995; Foote, Schneider et al. 1996; Schneider, Fischer et al. 1999). FAIM i l'augment de l'activitat d'NF- κ B juguen un paper doncs en la diferenciació dels limfòcits B a cèl·lules plasmàtiques productores d'anticossos (Kaku and Rothstein 2009). S'ha observat també que FAIM juga un paper en el procés apoptòtic d'eliminació dels timòcits autoreactius o amb alta afinitat pels MHC (del anglès, *major histocompatibility complex*) durant la seva maduració a limfòcits T al timus. L'expressió de FAIM augmenta en els timòcits després de l'unió del TCR (del anglès, *T cell receptor*) a anticossos anti-CD3 (co-receptor que s'uneix al TCR i provoca la seva activació). I els timòcits de ratolins FAIM^{-/-} són més sensibles a la mort apoptòtica induïda per l'activació del TCR (Huo, Xu et al. 2010). A més, ratolins amb

una deleció gènica de FAIM tenen una població normal de limfòcits B i T però aquests presenten una major sensibilitat a la mort apoptòtica induïda per Fas, i el mateix s'observa en els hepatòcits (Huo, Xu et al. 2009).

En el sistema nerviós, s'ha observat que la sobreexpressió de FAIM_s incrementa el creixement neurític induït per NGF (del anglès, *nerve growth factor*) en cèl·lules PC12 i en cultius primaris de neurones del gangli cervical superior. A més, el paper del FAIM_s endogen també és important ja que el silenciament de l'expressió amb RNA's d'interferència per FAIM_s disminueix el creixement neurític en els mateixos tipus cel·lulars. L'efecte de FAIM_s en el creixement neurític és dependent de l'activació d'ERK i la sobreexpressió de FAIM_s provoca una augment en l'activació d'NF-κB (Sole, Dolcet et al. 2004). Al contrari que FAIM_s, FAIM_L sí que té un paper antiapoptòtic en el sistema nerviós. FAIM_L no augmenta l'expressió de NF-κB però la seva sobreexpressió protegeix cultius neuronals contra la mort apoptòtica induïda pels agonistes de FasR i TNFR1. De la mateixa manera, el silenciament de FAIM_L demostra que els nivells endògens de FAIM_L protegeixen contra la mort induïda pels receptors de mort. Semblaria que FAIM_L competeix amb FADD per la unió a Fas (Segura, Sole et al. 2007). També s'ha descrit que FAIM_L necessita XIAP per desenvolupar la seva funció antiapoptòtica contra FasL. FAIM_L es capaç d'unir-se al domini BIR2 de XIAP a través d'un domini IBM (*IAP binding motif*) i establir la proteïna mitjançant l'inhibició de la seva autoubiquitinació (Moubarak, Planells-Ferrer et al. 2013).

2. OBJECTIUS

Estudis previs realitzats en el nostre laboratori van establir la implicació de la via dels receptors de mort a través del $TNF\alpha$ i les caspases 8 i 3 en la mort apoptòtica induïda per l'OGD. Així, en aquest treball, ens va interessar profunditzar en aquesta via, i estudiar el possible paper de diferents antagonistes endògens dels receptors de mort en el nostre model d'OGD en cultius corticals mixtes.

A partir d'aquests resultats previs, els objectius específics plantejats van ser els següents:

1. Confirmar el model d'OGD establert a través d'estudis de viabilitat cel·lular, l'anàlisi de la morfologia apoptòtica i l'activació de la caspasa-3.
2. Avaluar l'expressió dels antagonistes dels receptors de mort IAP2, FLIP_L, XIAP i FAIM_L en cultius corticals mixtes sotmesos a OGD i determinar possibles alteracions que indiquin la seva implicació en la mort cel·lular isquèmica.
3. Establir un model d'infecció lentiviral en els cultius corticals mixtes i analitzar l'efecte del silenciament de FAIM_L en la mort induïda per l'OGD i determinar la seva implicació en la morfologia apoptòtica i la viabilitat dels cultius sotmesos a l'OGD.
4. Determinar l'efecte de la sobreexpressió de FAIM_L en la mort induïda per l'OGD i avaluar la seva implicació en la morfologia apoptòtica, l'activació de caspasa-3 i la viabilitat dels cultius sotmesos a la isquèmia.

3. MATERIALS I MÈTODES

3. MATERIALS I MÈTODES

3.1 – MATERIAL BIOLÒGIC

Per als cultius corticals mixtes de neurones i glia es van utilitzar embrions de rates de la soca Sprague-Dawley, de 17 dies de gestació, del servei d'estabulari de la Universitat Autònoma de Barcelona.

3.2 – PREPARACIÓ DELS CULTIUS PRIMARIS

3.2.1 – Solucions necessàries per la preparació del cultiu

Per la realització del cultiu primari a través d'un mètode de disgregació enzimàtica i mecànica prèviament es van preparar i filtrar abans d'utilitzar les següents solucions:

- Solució 1: 50 ml de tampó Krebs (NaCl 120mM, KCl 4.8mM, KH_2PO_4 1.2mM, Na HCO_3 25mM, Glucosa 14.3mM), 0.15g BSA (albúmina de sèrum boví; Sigma) i 0.4ml de una solució 3.8% de MgSO_4 .
- Solució 2: 10ml de la solució 1, 2.5mg de tripsina (Sigma)
- Solució 3: 10ml de la solució 1, 5.2mg d'inhibidor de tripsina (Sigma), 0.8mg de DNasa (Sigma), 0.1ml de la solució 3.8% MgSO_4 .
- Solució 4: 8.4ml de la solució 1, 1.6ml de la solució 3.
- Solució 5: 5ml de la solució 1, 40 μ l de la solució 3.8% MgSO_4 i 6 μ l d'una solució 1.2% de CaCl_2 .

3.2.2 – Composició dels medis de cultiu i el tampó fosfat

- Medi *Basal Eagle's Medium* (BME; Sigma) suplementat amb un 10% de sèrum fetal boví (FBS), 30mM de glucosa, 2mM de glutamina, 25.000u de penicil·lina i 25mg d'estreptomicina (GIBCO-Invitrogen).
- Medi BME suplementat amb un 10% de sèrum equí (HS), 30mM de glucosa, 2mM de glutamina, 25.000u de penicil·lina i 25mg d'estreptomicina
- Tampó fosfat (Phosphate Buffered Saline, PBS 1X; Sigma) suplementat amb 30mM de glucosa, 100.000 unitats de penicil·lina, 100mg d'estreptomicina.

3.2.3 – Dissecció i obtenció dels còrtex

Els còrtex es van extreure d'embrions de rata de 17 dies de gestació; es van netejar de meninges per limitar la contaminació de fibroblasts i se'ls va escindir l'estriat. L'hipocamp es va incloure en els casos en el que no s'escindia conjuntament amb la meninge.

3.2.4 – Obtenció de la solució cel·lular

Obtingut el teixit es va procedir a la disgregació mecanico-enzimàtica. Un cop nets els còrtex es van afegir al tampó Krebs de la solució 1. Es va fer un pols amb la centrifuga a 1500rpm i es va eliminar el sobrenedant. Posteriorment es va afegir al pelet la solució 2 rica en tripsina i es va deixar disgregar enzimàticament el teixit durant 10 minuts a un bany humit a 37°C. Passat aquest temps es va afegir la solució 4 amb l'inhibidor de tripsina i la DNasa per aturar la reacció i degradar el DNA de les cèl·lules que s'haguessin pogut llisar per acció de la tripsina. Es fa un pols de centrifuga a 1500rpm i s'aspirà el sobrenedant. Es va afegir al pelet la solució 3, concentrada en tripsina i Dnasa, i es va procedir a la disgregació mecànica mitjançant una pipeta Pasteur amb la punta roma. Es va pujar i baixar la suspensió cel·lular deu vegades i posteriorment es va fer passar deu cops més a través d'una malla de niló (amb un diàmetre de por de 40µm). Es va repetir el procés dues vegades per tal d'aconseguir una suspensió unicel·lular.

Posteriorment la suspensió cel·lular es va transferir a una solució amb magnesi i calci (solució 5) per tal de restablir l'homeòstasi cel·lular i es va centrifugar a 1000rpm durant 5 minuts. Es va aspirar el sobrenedant i es va resuspendre el pelet en 20 ml de medi BME 10% FHS. Posteriorment es va afegir blau de tripà 1:1 per detectar les cèl·lules mortes (no són capaces d'excloir el compost) i es va fer el recompte cel·lular amb una cambra de Neubauer.

Les neurones corticals es van sembrar a una densitat de 300.000 cèl·lules/cm² en plaques pretractades durant 24 hores amb polilisina (poly-L) a una concentració de 25 µg/ml (solució estoc d'1 mg/ml; Sigma). El medi utilitzat per sembrar les cèl·lules era BME amb un 5% de HS, 5% d'FBS, 30mM de glucosa, 2mM de glutamina, 25.000u de

penicil·lina i 25mg d'estreptomina. Al 7è dia *in vitro* (DIV) es va fer un únic canvi de medi i el medi de sembra es va reemplaçar per medi BME suplementat amb 5 % FHS i 10µM de Citosina Arabinòsid, per aturar la proliferació no neuronal del cultiu. Les plaques foren mantingudes dins d'un incubador en una atmosfera humida, amb un 5 % de CO₂ i a 37°C fins al dia d'utilització (entre els 12-14 DIV).

3.3 – PRIVACIÓ D'OXIGEN I GLUCOSA (OGD)

Els cultius corticals mixtes de 12-14 DIV es van sotmetre a una privació d'oxigen i glucosa (OGD) segons els protocols descrits anteriorment per (Goldberg and Choi 1993), amb mínimes modificacions.

Les cèl·lules es van rentar dues vegades amb el tampó BSS (del anglès, *Balanced Salt Solution*) amb la següent composició: NaCl 116mM, KCl 5.4mM, MgSO₄·7H₂O 0.8mM, NaH₂PO₄·2H₂O 1mM, NaHCO₃ 26.2mM, Glicina 0.01mM, CaCl₂·2H₂O 1.8mM amb un pH de 7.4 i preaterrat a 37°C. Amb aquests rentats s'aconseguia reduir la glucosa residual del medi unes 2000 vegades. Prèviament s'havia deixat un tub amb BSS equilibrat dins una cambra d'hipòxia (Invivo2 400, Ruskinn Technologies) en unes condicions de 0.5% d'O₂/94.5% N₂/5% CO₂ i a 37°C. El tercer i últim rentat es realitzava dins la cambra d'hipòxia amb el tampó equilibrat i es deixaven les cèl·lules en les condicions d'hipòxia el temps desitjat. Passat aquests temps es treia la placa de la cambra i es retornava el medi original que havia estat guardat en falcons estèrils i mantingut en un bany humit (medi condicionat).

Paral·lelament també es realitzava una placa control, a la qual se li realitzaven tres rentats amb BSS suplementat amb 5mM de glucosa i es deixava en condicions de normòxia en un incubador amb atmosfera humida amb un 5% de CO₂ i a 37°C el temps que durava l'OGD.

3.4 – DETERMINACIÓ DE LA VIABILITAT CEL·LULAR

3.4.1 – Assaig de reducció de l'MTT

El bromur de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazoli (MTT; Sigma) és una sal de tetrazoli hidrosoluble que es redueix a formazan, compost violeta insoluble en medi aquós, per l'acció de les deshidrogenases mitocondrials de les cèl·lules viables.

L'absorbància del formazan solubilitzat en DMSO (Dimetilsulfòxid; Sigma) és un valor que correlaciona directament amb la viabilitat cel·lular, malgrat que no permet discriminar entre mort apoptòtica i necròtica (Mosmann 1983).

Per tal de mesurar la viabilitat, es va afegir a plaques de 24 pouets MTT a 0,2 mg/ml (a partir d'una solució estoc de 2 mg/ml dissolta en aigua; Sigma) i es varen incubar a 37°C durant 45 minuts. Després, s'aspirà el medi i s'afegiren 500 µl de DMSO per tal de dissoldre el formazan. Finalment, es va fer una mesura de l'absorbància espectrofotomètrica en un lector de microplaques (labsystem Multiskan) a una longitud d'ona dual de 560nm i 620nm, correlacionant l'increment d'absorbància amb la viabilitat cel·lular.

3.4.2 – Hoechst 33258 i Iodur de propidi (PI)

El iodur de propidi (PI) (Sigma) és un compost fluorescent que tenyeix l'RNA i el DNA. És un compost molt polar i si s'afegeix abans de fixar els cultius, només tenyeix les cèl·lules que tenen la membrana trencada, trets essencials en la mort per necrosis o apoptosi tardana. D'altra banda el Hoechst 33258 o Bisbenzimidazol (2-[4-hidroxi-fenil]-5-[4-metil-1-piperazinil]2,5-bi-1H-benzimidazol) (Sigma) és un compost fluorescent que s'uneix al DNA. Si la cromatina es troba fragmentada o condensada, tal com esdevé en processos d'apoptosi, aquest compost es concentra degut a la condensació i la senyal obtinguda pel microscopi de fluorescència és més intensa.

Després del tractament amb l'OGD les cèl·lules es van incubar durant 12-16h amb 10µM de PI abans de la fixació. Passat aquest temps es van fer dos rentats amb TBS (del anglès, *Tris-Buffered Saline*; Trizma Base 0.05M, NaCl 0.15M, H₂O pH 7.4) i es van fixar les cèl·lules amb Paraformaldèhid al 4% en tampó fosfat 0.1M pH 7.2 durant deu minuts en agitació suau. Després es van fer dos rentats en TBS fred i es van incubar les cèl·lules durant 5 minuts en agitació suau amb una dissolució de Hoechst 33258 d'1µg/ml i protegit de la llum. Posteriorment es van realitzar dos rentats més amb TBS fred i es van muntar els cubres sobre els portas amb una gota de DAKO fluorescent mounting medium (Dako). Es van mantenir a 4°C i protegits de la llum fins la seva observació al microscopi. Les longituds d'ona per les observacions foren 650nm pel Hoechst i 538nm pel PI.

3.5 – DETECCIÓ DELS NIVELLS DE mRNA PER RT-PCR

3.5.1 – Extracció del RNA

Per tal d'extreure l'RNA total, les cèl·lules corticals mixtes es van cultivar en plaques de 12 pouets. Per tal de fer l'extracció es va utilitzar el kit RNeasy® (Qiagen). En els temps indicats depenent del tractament, es van posar les plaques sobre gel, es va aspirar el medi, es va fer un rentat amb PBS i es va afegir 600 µl de tampó de llisi RLT (amb un 1% de β-mercaptoetanol), es va "scrapejar" la mostra i es va guardar a -20°C. Un cop recollides totes les mostres es va continuar amb el procés, homogeneïtzant amb una xeringa de 20/21G i centrifugant 5 minuts a 13.000rpm. Posteriorment es va transferir el sobrenedant a eppendorfs RNasa free amb 600 µl d'etanol al 70% i es va agitar. La barreja resultant es va afegir a la columna del kit i es va centrifugar un pols a 10.000rpm i es va descartar l'eluit; es va afegir el tampó RW1 i es va repetir el procés; posteriorment es va afegir 80 µl de tampó RDD (70 µl RDD+ 10µl DNasa I) sobre el filtre de la columna i es va deixar reposar 15 minuts protegint-ho de la llum. Tot seguit es va tornar a afegir tampó RW1, es va fer un pols a 10.000 i es va descartar l'eluit. Posteriorment es van fer dos rentats amb el tampó RPE a 10.000 i 13.000rpm durant 15 segons i dos minuts respectivament i es va eluir l'RNA amb 50 µl d'aigua RNasa free durant 1 minut a 10.000rpm mantenint l'eluit en gel en tot moment. Es van separar 2 µl per la seva quantificació amb un biofotòmetre (Eppendorf) i es va córrer un gel d'1 % d'agarosa marcat amb SYBR Safe™ DNA gel stain (Molecular Probes), per tal de veure l'estat de degradació dels RNAs 18s i 28s ribosomals, doncs són els més abundants a la cèl·lula.

3.5.2 – Transcripció inversa

Amb la finalitat d'obtenir DNA complementari (cDNA) a partir de mRNA es va utilitzar el conjunt de productes recomanats per l'enzim SuperScript™ II Reverse Transcriptase (Invitrogen). Per cada mostra, es varen agafar 1 µg d'RNA, 2 µl de dNTPs 10mM, 2 µl d'oligodT (encebadors de la cua de polyA en 3' característica de la majoria dels mRNA; Invitrogen) i aigua tractada amb DEPC fins a 25 µl i es va mantenir a 65°C durant 5 minuts en un termociclador PTC-100 Peltier Termal Cycler (MJ Research). Tot seguit, es va fer un pols de centrifuga i s'afegiren 8 µl de 5x First-Strand Buffer , 4 µl de 0,1 M

DTT i 2 µl de RNaseOUT™ i es va tornar al termociclador durant 2 minuts a 42°C. En el tercer i últim pas, es va afegir 1 µl de transcriptasa reversa SSII per cada mostra i es va tornar al termociclador durant 50 min a 42°C i finalment durant 15 minuts a 70°C. Es va guardar el cDNA a -20°C.

3.5.3 – Amplificació per PCR semiquantitativa

Per dur a terme la reacció en cadena de la polimerasa (PCR) primerament es van dissenyar els encebadors amb el programa PRIMER mitjançant la seqüència nucleotídica de *Rattus Norvegicus* de les proteïnes: IAP2, XIAP, FLIP i FAIM. A més, es verificà que no existia jhomologia de seqüència amb altres RNA missatgers a través del programa FASTA (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/fasta33/index.html>). L'expressió del 18s es va utilitzar com a control de la quantitat de cDNA.

La barreja de reacció utilitzada estava constituïda per 0'5-1µl de mostra, 0'5µM d'encebador, 0'1mM de dNTP's, 1'5mM de MgCl₂, PCR buffer sense Mg 1X, 1 unitats de Platinum® *Taq* DNA Polimerase (Invitrogen) i aigua tractada amb DEPC fins un volum de 25µl. Posteriorment es van posar els tubs al termociclador i es va utilitzar el següent programa per l'amplificació dels cDNA's: 2' a 94°C per trencar la doble cadena i activar l'enzim, 31 cicles de 30'' a 94°C, 30'' a 60°C (temperatura d'hibridació), 30'' a 72° i 2 minuts a 72°C. Finalment, es van visualitzar els resultats en gels d'agarosa al 1% en tampó TAE amb SYBR safe™ (Invitrogen).

Gen	Encebador Fw (5'-3')	Encebador Rw (5'-3')	Referència
<i>cIAP2</i>	ACTCGCTACCTCTGGAACAA	ACTCGCTACCTCTGGAACAA	AF190020
<i>FLIP_{S/L}</i>	GCCAAGGACAAGAGTTTCTT	AGCATTCCACAGTAGTCATG	NM057138
<i>XIAP</i>	TGAAGAAGCCAGACCGAAGA	TGAAGAAGCCAGACCGAAGA	AF183429

Taula 3.1. Encebadors utilitzats per l'amplificació del cDNA. La seqüència genòmica d'aquestes proteïnes es pot consultar a la referència que s'indica a la taula.

3.6 – WESTERN-BLOT

Els tampons utilitzats pel wester-blot foren els següents:

Tampó de llisi: 20mM Tris pH 7.5, NP-40 1%, 150mM NaCl i 5mM EDTA suplementat amb inhibidors de proteases (1mM PMSF (Applichem), 1mM ortovanadat (Sigma),

cocktail de proteases (Sigma) i cocktail d'inhibidors de fosfatases (solució estoc 100X; Sigma).

Tampó de càrrega: Tris-HCL 250mM pH 6.8, SDS 5% (p/v), 5% Glicerol i una punta d'espàtula de blau de bromofenol. Prèviament a la seva utilització s'afegia una desena part de β -mercaptoetanol.

Tampó d'electroforesis: 25mM de Tris, 192mM de Glicina, 20% d' SDS

Tampó de transferència: 25mM de Tris, 192mM de Glicina, 20% metanol.

TBS (del anglès, *Tris-Buffered Saline*): 20mM de Tris, 137mM NaCl pH 7.6

TBS-T: TBS amb un 0.1% de Tween 20.

Tampó de bloqueig: TBS-T amb un 5% de llet en pols.

Anticossos primaris: anti-FLIP_{S/L} (1/1000; Santa Cruz Biotechnology), anti-Cleaved Caspase-3 (1/500; Asp175)(Cell Signaling), anti-FAIM_{S/L} (1/500; cedit pel Dr.J.X.Comella), anti-XIAP (1/1000; BD Biosciences), anti-IAP2 (1/1000;BD Biosciences), anti- β -tubulina (1/1000; Sigma), anti-GAPDH (1/40.000; BD PharMingen) i anti- β -actina (1/1000; Sigma).

Anticossos secundaris: Anticòs policlonal anti-rabbit i anticòs policlonal anti-mouse conjugats amb peroxidasa (1/1000 o 1/5000; BD Biosciences).

Primer es va fer un rentat amb PBS i posteriorment es van llisar les cèl·lules en fred sobre la placa amb el tampó de llisi. Es va centrifugar les mostres 10 minuts a 10.000 rpm i es va quantificar la quantitat de proteïna del sobrenedant pel mètode de Bradford (BioRad) [942051]. Posteriorment es van diluir les mostres en tampó de càrrega i es van bullir durant 5 minuts a 95°C.

Les proteïnes es van córrer mitjançant una electroforesis en gels de poliacrilamida (Acrilamida/Bis Solution 30%; BioRad) en condicions desnaturalitzants (PAGE-SDS, del anglès *Poly Acrilamide Gel Eletrophoresis-Sodium Dodecyl Sulfate*). El % d'acrilamida variava segons la grandària de la proteïna (10, 12 o 15%). En cada carril es va carregar la mateixa quantitat de proteïna, entre 20-40 μ g segons la proteïna a detectar. També

es va carregar un standard de proteïna pretenyit amb colorant blau (*Precision Plus ProteinTM Standard All Blue*; Bio-Rad). L'electroforesi es va deixar aproximadament 1 hora a una intensitat constant de 80mA. Un cop finalitzada l'electroforesi es van transferir les proteïnes del gel en membranes de Nitrocel·lulosa (Amersham pharmacia biotech) o PVDF (*Polyvinylidene Difluoride*; Hybond-P PVDF, Amersham pharmacia biotech) prèviament activades amb metanol. La transferència es va realitzar durant 1 hora a 90V. Un cop finalitzada la transferència es va tenyir la membrana amb Ponceau S per confirmar que s'hagués dut a terme i es va rentar la membrana amb TBS-T. Posteriorment es va deixar en el tampó de bloqueig 1 hora en agitació suau. Passat aquest temps es va incubar amb l'anticòs primari diluït en el tampó de bloqueig en un *roller* tota la nit a 4°C. Després de l'incubació es va fer un rentat de 10 minuts i dos de 5 minuts amb TBS-T i es va incubar la membrana amb l'anticòs secundari durant 1 hora a temperatura ambient.

Després de l'incubació amb l'anticòs secundari es van realitzar 4 rentats més de 5 minuts amb TBS-T i un de 10 minuts. Finalment es van detectar les proteïnes per quimioluminescència (*ECLTM Western Blotting Detection Reagent*; Amersham pharmacia). La densitometria de les bandes es va realitzar amb el programa ImageJ (Scion Corporation).

3.7 - IMMUNOCITOQUÍMICA

Tampó de bloqueig: TBS-T, 5% d'HS i 3% BSA

Anticossos primaris: anti-Cleaved Caspase-3 (Asp175)(Cell Signaling), anti-FAIM_{S/L} (cedit pel Dr.J.X.Comella), anti-XIAP (BD Biosciences), anti-IAP2 (BD Biosciences), anti-GFAP (Sigma) i anti-MAP2 (Sigma).

Anticossos secundaris: Alexa fluor® 594 anti-mouse (Molecular Probes), Alexa Fluor® 488 anti-mouse (Molecular Probes), Alexa Fluor® 594 anti-rabbit (Molecular Probes), Alexa Fluor® 488 anti-rabbit (Molecular Probes).

Els cultius corticals de 12-14 DIV sembrats sobre cubres rodons en plaques de 24 pouets se'ls hi va fer un rentat amb PBS i es van fixar amb paraformaldehid 4% (diluït en PBS) durant 1 hora a 4°C. Passat aquest temps es van realitzar 3 rentats de 5 minuts

amb TBS-T a temperatura ambient i dos rentats de 10 minuts amb un tampó Glicina 0.1M per bloquejar els grups aldehid del fixador. Després es van incubar 10 minuts més amb TBS-T 0.1% Tritó X-100 per permeabilitzar les cèl·lules i es va incubar amb el tampó de bloqueig durant 45-60 minuts a 4°C. Posteriorment es van incubar les cèl·lules amb l'anticòs primari diluït en TBS-T 5% BSA durant 24 hores a 4°C. Es van fer tres rentats de 5 minuts amb TBS-T i es van incubar durant una hora a temperatura ambient amb l'anticòs secundari pertinent diluït 1/500 en TBS-T 5% BSA. A partir d'aquí es van protegir les cèl·lules de la llum. Es van fer tres rentats més amb TBS-T i es van muntar els cubres sobre els portas amb una gota de DAKO *fluorescent mounting medium*. Els portas es van guardar a 4°C i protegits de la llum fins la seva observació al microscopi.

3.8 – MANTENIMENT I SUBCULTIU DE LÍNIES CEL·LULARS

3.8.1 – Descongelació i manteniment

La línia cel·lular derivada de feocromocitoma de medul·la adrenal de rata (PC12), establerta inicialment per Green i col·laboradors (Greene and Tischler 1976), va ser originàriament cedida pel Dr. Joan X. Comella (Institut de recerca Vall d'Hebron) mentre que la línia derivada de cèl·lules transformades de ronyó humà embrionari (HEK293T, (Aiello, Guilfoyle et al. 1979)) es va obtenir a partir de l'estoc del Servei de Cultiu Cel·lulars del mateix institut.

A partir d'una alíquota d'1 ml de cèl·lules conservades en nitrogen líquid, es va procedir a la descongelació submergint el criotub en un bany humit a 37°C i sembrant les cèl·lules en un flascó amb 12 ml de medi de cultiu adequat preescalfat, que es va mantenir en incubadors a 37°C, un 5% de CO₂ i atmosfera humida. A les 24 hores es va realitzar un canvi de medi. Quan les cèl·lules crescudes en monocapa estaven aproximadament a un 70-90% de confluència, cada 5-7 dies en el cas de les PC12 i cada 3-4 en el cas de les HEK293T, es duia a terme el pas a nous flascons, tot rentant un cop amb PBS preescalfat, tripsinitzant durant 3 minuts a 37°C, diluint amb el triple de medi i centrifugant 3 minuts a 1000 rpm per, finalment, resuspendre les cèl·lules en medi complet. Les plaques i flascons pel cultiu de les PC12 van ser pretractats amb col·lagen tipus I (BD Biosciences).

Solució de tripsinització: 0,05% de tripsina (p/v) i 0,53mM EDTA-4Na (Invitrogen)

Medi de cultiu PC12: Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM; Sigma), 7% FBS, 7% FHS, 11,4mM de HEPES (tamponat a pH 6.8) i 400u de penicil·lina i 4mg/ml d'estreptomicina.

Medi de cultiu HEK293T: DMEM, 10% de FBS, 2000u de penicil·lina i 20mg/ml d'estreptomicina.

3.8.2 – Congelació de cèl·lules

Per tal de disposar de cèl·lules estoc amb el menor nombre de passos possibles, es van conservar criotubs congelats en nitrogen líquid. Per fer-ho un flascó de 12 ml de cèl·lules crescudes a un confluència del 90% es va tripsinitzar, centrifugar i el precipitat cel·lular es va resuspendre en 5 ml de medi de cultiu amb el doble de sèrum i un 10% de DMSO. Després es van introduir els criotubs en un Cryo Freezing amb isopropanol (que permet un descens de la temperatura de 1-3°C/min) i es van conservar un mínim de 48h a -80°C abans d'introduir-los al tanc de nitrogen líquid.

3.9 – TRANSFECCIÓ MITJANÇANT VECTORS LENTIVIRALS

Per tal d'aconseguir un alt percentatge d'infecció i un silenciament o sobreexpressió sostingut en el temps es va decidir infectar els cultius amb vectors lentivirals. Els vectors lentivirals són capaços de induir de manera eficient l'integració i l'expressió de transgens o shRNA's de manera estable i independentment de si la cèl·lula està en divisió. Permeten una alta eficiència de transfecció i l'expressió de l'insert és estable per més de sis mesos. A diferència dels adenovirus, no expressa proteïnes virals de manera que no genera respostes immunes contra la cèl·lula hoste. A més permeten insertar fins a 10 kb de seqüència i són capaços d'infectar tant cèl·lules proliferants com diferenciades.

Un cop el lentivirus s'ha insertat a la cèl·lula diana, el vector que conté l'RNA del gen d'interès es retrotranscriu a DNA. El DNA conjuntament amb la proteïna vpr, la proteïna de matriu i el complex de preintegració travessen la membrana nuclear i el DNA s'integra en el genoma de la cèl·lula hoste (Blomer, Naldini et al. 1997).

Els lentivirus són generats a partir de la coexpressió de tres plasmidis en les cèl·lules productores HEK293T (del anglès, *human embryonic kidney cell*). Un plasmidi codifica pel sistema d'empaquetament del virió (psPAX2), l'altre per l'envolta (pM2.G) i un tercer conté l'shRNA o el transgen d'interès (pLVTHM o pWPI) (<http://tronolab.epfl.ch/>) (Figura M1). El vector pLVTHM-shFAIM_L i pWPI-FAIM_L van ser amablement cedits pel Dr.J.X.Comella.

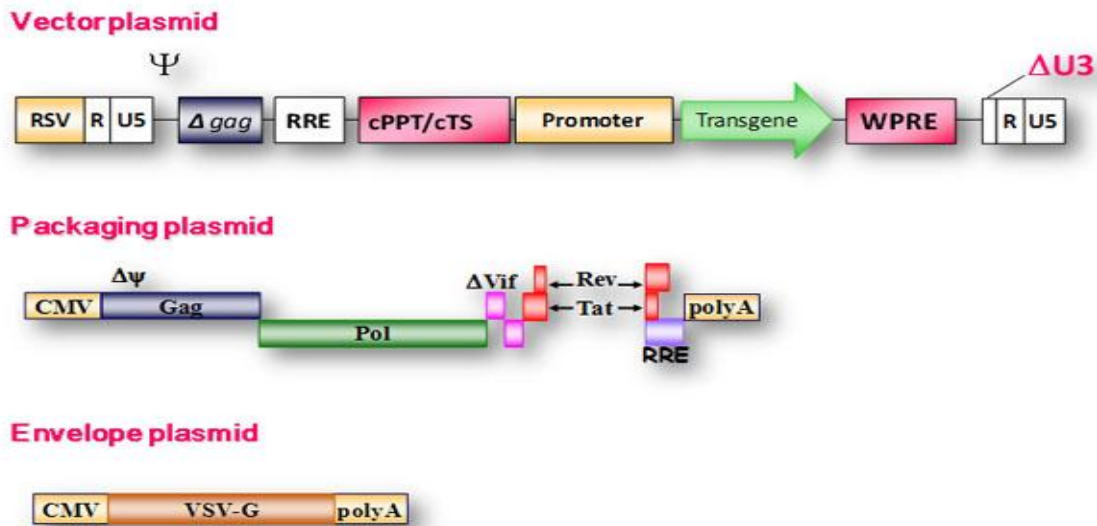


Fig 3.1. Composició genètica genèrica dels plasmidis necessaris per la generació dels lentivirus. Plasmidi vector: RSV-R-U5: promotor lentiviral quimèric, Δgag: conté la senyal d'empaquetament, RRE: Rev responsive element, necessari per la formació de l'embolcall, cPPT: central polypurine tract i WPRE: hepatitis virus post-transcriptional regulatory element augmenten la titració, ΔU3: una deleció en la cua 3' permet que el virus no es repliqui un cop integrat al genoma del hoste. Plasmidi d'empaquetament: Gag i Pol codifiquen pels components estructurals i enzimàtics del virió mentre Rev i Tat estan implicats en funcions transcripcionals i post-transcripcionals. Plasmidi d'envolta: CMV: promotor de citomegalovirus, VSV-G: glicoproteïna G, polyA: cua de poliadenines (<http://tcf.epfl.ch/>).

Plasmidi	Funció
pLVTHM	Conté el shRNA d'interès sota el promotor H1 i la proteïna GFP (per tal de facilitar l'identificació de les cèl·lules transfectades) sota el promotor EF1α (<i>elongation factor 1α</i>). L'shRNA ha estat prèviament sub-clonat a partir del vector pSUPER sota el promotor de la polimerasa III. Conté resistència a Ampicil·lina (http://www.addgene.org/lentiviral).
pWPI	Subclonat desde el vector pcDNA3 conté el gen d'interès a transferir a la cèl·lula hoste i la proteïna GFP per tal de identificar les cèl·lules transfectades. Conté també una resistència a ampicil·lina.

psPAX2	Codifica pel sistema d'empaquetament del virió. Conté les poliproteïnes Gag i Pol les quals són necessàries per el transport nuclear del complex de preintegració al genoma del hoste. Se li han eliminat una sèrie de gens virulents no necessaris per la formació del virus [9306402].
pM2.G	Conté les proteïnes que codifiquen per la formació de l'embolcall.

Taula 3.2. Plasmidis utilitzats per la generació dels vectors lentivirals.

3.9.1 – Mecanisme d'acció dels shRNA's

L'RNA d'interferència (RNAi) és un mecanisme endogen a través del qual la cèl·lula pot modular o silenciar l'expressió de determinats gens (Fire, Xu et al. 1998). Existeixen diferents mecanismes d'RNAi en la cèl·lula com els miRNA (*microRNA's*) o els siRNA's (*small interference RNA*) (Xia, Joyce et al. 2013). A nivell experimental l'efecte d'interferència del RNA es pot aconseguir a través dels siRNA o els shRNA. Els siRNA són molècules de RNA de doble cadena de 21-23 nucleòtids transfectades per mètodes químics mentre el shRNA es poden transfectar a través d'un vector lentiviral i estan formats per RNA plegat en forma de pinça (igual que la preforma dels miRNA). El vector amb l'shRNA entra al nucli i es transcriu a pri-shRNA, el qual és processat pel complex Drosha/DGCR8 formant el pre-shRNA. El pre-shRNA es transportat al citoplasma a través de la exportina 5 on és processat pel complex Dicer/TRBP/PACT tallant l'RNA en petits fragments de 20 nucleòtids. Posteriorment la cadena antisentit és incorporada al complex proteic de silenciament induït per RNA (RISC). Després el complex es dirigeix a la seqüència de mRNA complementària i el degrada (Figura M2)

Els shRNA presenten diverses avantatges respecte els siRNA: són més específics, de manera que no modulen l'expressió de proteïnes que no sigui la diana, el silenciament és estable en el temps i degut a que el siRNA no entra al nucli i per tant no està subjecte a la regulació endògena dels mecanismes cel·lulars (poliadenilació) és més inestable i necessita un major nombre de molècules per obtenir el mateix efecte de silenciament (Rao, Senzer et al. 2009).

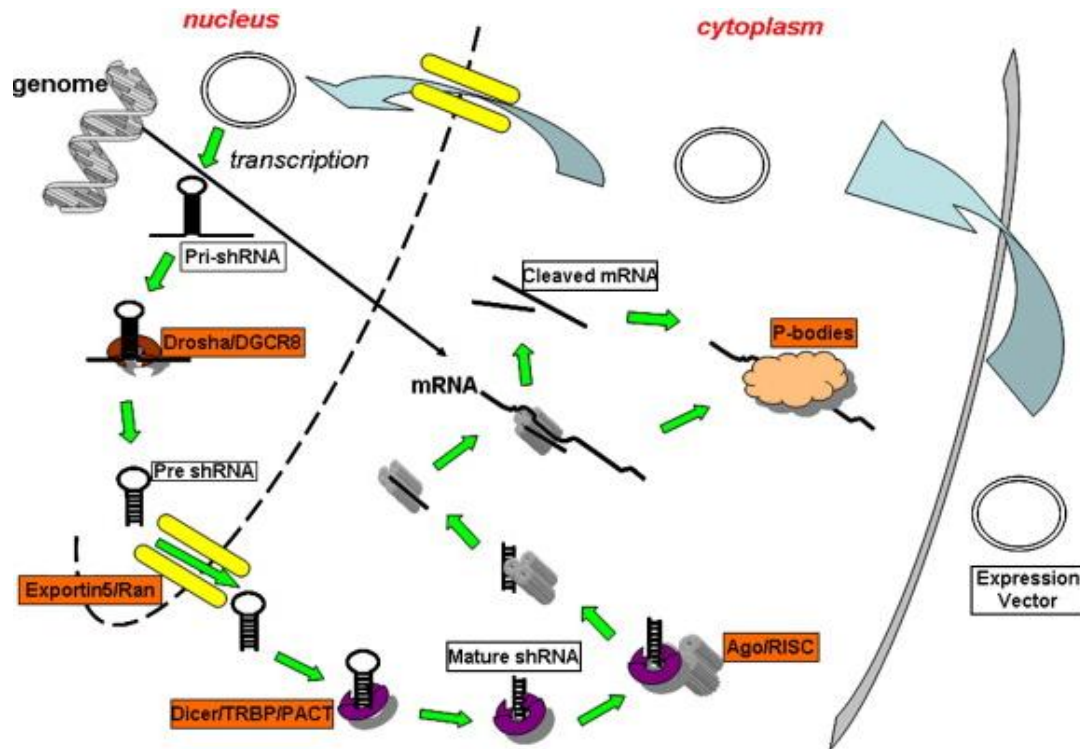


Figura 3.2. Esquema del procés de silenciament del mRNA induït pel shRNA. Extret de (Rao, Vorhies et al. 2009)

3.9.2 – Transformació de bacteris per xoc tèrmic

Amb la finalitat d'amplificar els plasmidis per la generació dels vectors lentivirals primer es va transformar la soca bacteriana E.Coli DH5 α amb els plasmidis desitjats. Per fer-ho es va agafar 30 μ l de E.Coli DH5 α en un eppendorf de 2ml i es va afegir 10ng del plasmidi. Es va deixar 30 minuts en gel. Passat aquest temps es va posar a 42 $^{\circ}$ C 45 segons i 2 minuts en gel. Tot seguit es va afegir 970 μ l de medi LB i es va deixar 1 hora a 37 $^{\circ}$ C en agitació per tal de fer créixer totes les bactèries. Passat aquest temps es va sembrar en plaques de LB-ampicil·lina-agar per tal de seleccionar les colònies amb el plasmidi (amb resistència per ampicil·lina). I es va deixar créixer tota la nit. Després d'utilitzar les plaques es van guardar tancar amb parafilm i cap per avall a 4 $^{\circ}$ C. Com a control es va digerir 1 μ g de plasmidi amb un o varis enzims de restricció durant 1h en un bany humit a 37 $^{\circ}$ C i es va comprovar que el pes de les bandes fos correcte en un gel d'agarosa al 1%.

LB-ampicil·lina (1l): 10g NaCl, 10g Triptona (Pronadisa), 5g extracte de llevat (Pronadisa), pH 7, autoclavats més 50mg/l d'ampicil·lina (Sigma).

LB-ampicil·lina-agar (1): LB amb 20g d'agar (Pronadisa).

3.9.3 – Amplificació dels plasmidis: Maxiprep

Es va picar una colònia de bacteris crescuts en plaques de LB-ampicil·lina-Agar i es va ficar dins de 5ml de LB-ampicil·lina líquid. Es va deixar al bany sec en agitació a 275rpm i 37°C durant 8 hores. Passat aquest temps es va passar el contingut del tub a un erlenmeyer amb 250ml d'LB-ampicil·lina preescalfat. Es va tornar al bany sec i es va deixar 12-16 hores a les mateixes condicions. Després es va centrifugar el contingut a 6000g durant 15 minuts a 4°C amb el rotor JA14 en una centrifuga J2-21 (Beckman). Per tal de fer l'extracció del plasmidi es va seguir el protocol descrit en el kit Maxi tip 500 (Qiagen). Breument primer es va dur a terme una llisi alcalina resuspenent el pelet en buffer de resuspensió (buffer P1: 50mM Tris-HCl pH 8, 10mM EDTA, 100µg/ml RNasa A) amb RNasa i posteriorment afegint un buffer de llisi (buffer P2: 200mM NaOH, 1% SDS (p/v)) i incubant durant 5 minuts. Passat aquest temps es va afegir buffer de neutralització a 4°C (buffer P3: 3M acetat potassi pH 5.5) i es va invertir 4-6 cops. Es va deixar incubant en gel durant 20 minuts. Durant aquest temps es va equilibrar la columna amb tampó d'estabilització (tampó QBT: 750mM NaCl, 50mM MOPS pH 7, 15% isopropanol (v/v), 0.15% Tritó X-100 (v/v)) i posteriorment es va filtrar i afegir la solució a la columna. Un cop unit el DNA es va dur a terme dos rentats (tampó QC: 1M NaCl, 50mM MOPS pH 7, 15% isopropanol (v/v)). Posteriorment es va eluir el DNA plasmídic amb el tampó d'elució (tampó QF: 1.25M NaCl, 50mM Tris-HCl pH 8.5, 15% isopropanol). Després es va precipitar el DNA plasmídic amb isopropanol barrejant i centrifugant immediatament a 15.000g durant 30 minuts a 4°C. Posteriorment es va decantar el sobrenedant i es va rentar el pelet amb etanol al 70% a temperatura ambient i centrifugant 10 minuts més a 15.000g. Finalment es va decantar el sobrenedant i es va deixar assecar el pelet 5-10 minuts i es va resuspendre el DNA amb TE o aigua MiliQ.

TE: 10mM Tris-HCl (Trizma-base; Sigma), 1mM EDTA (Sigma), pH 8.0

3.9.4 – Transfecció dels plasmidis mitjançant fosfat de calci

La generació de partícules víriques es va realitzar a partir de la coexpressió de tres vectors: el pLVTHM-H1-shRNA (silenciament) o el pWPI-RNA (sobrexpressió), el psPAX2 (empaquetament) i el pMD2.G (proteïna d'envolta) en les cèl·lules productores HEK293T. La transfecció transitòria dels plasmidis es va realitzar mitjançant fosfat de calci.

Les cèl·lules es van sembrar en plaques de 100mm de diàmetre a una densitat aproximada de 300.000 cèl/ml en la meitat del volum (5ml), per tal d'obtenir en el moment de la transfecció un 70% de confluència. L'endemà es va fer un canvi de medi i es va preparar la barreja dels plasmidis, el tampó HBS i el fosfat de calci. Per fer-ho, per cada lentivirus es va barrejar primer els plasmidis pLVTHM-H1-shRNA/pWPI-RNA (20µg), psPAX2 (15µg) i pMD2.G (6µg) amb aigua MiliQ estèril fins un volum de 450 µl. Immediatament després es va barrejar amb 50µl d'una solució 2.5M de CaCl₂ i el conjunt es va anar afegint (en volums d'1/8) i vortejant sobre 500µl del tampó HBS 2X per tal de precipitar el fosfat de calci lentament. La barreja es va deixar reposar un mínim de 20 minuts a temperatura ambient i es va afegir gota a gota a les plaques, intentant cobrir el màxim de superfície. Transcorregudes 6-8 hores es va fer un canvi de medi amb volum complet (10ml) i es van deixar les cèl·lules 48 hores a l'incubador. Passat aquest temps es va retirar el medi i es va centrifugar a 25.000rpm durant 2h a 4°C amb el rotor vasculant SW24 (Sorval) per tal de concentrar les partícules víriques alliberades per la lisi cel·lular. Un cop centrifugat es va decantar el sobrenedant i es va afegir al pelet 75µl del tampó TNE i es va deixar resuspenent en agitació a 175rpm a 4°C durant tota la nit. Passat aquest temps es van aliquotar i conservar els lentivirus a -80°C.

Tampó HBS 2X: 16g/l NaCl, 0.19g/l KCl, 0.2g/l Na₂HPO₄, 10g/l HEPES i 2g/l de glucosa a pH 7.05

Tampó TNE: 50mM Tris-HCl pH 7.5, 130mM NaCl i 1mM EDTA.

3.9.5 – Titulació de les partícules víriques

Per tal d'infectar amb la mateixa quantitat de partícules infeccioses es va fer la titració dels lentivirus produïts. Per fer-ho es van sembrar HEK293T en una placa de 24 pouets a una densitat aproximada de 60.000cèls/ml. Al dia següent es van recollir i comptar les cèl·lules de dos pous (rentant, tripsinitzant, resuspenent en el triple de medi i comptant en una cambra de Neubauer) i es va retirar la meitat del medi de la resta dels pouets. Es va infectar amb 1µl de dilucions seriades (2µl, 1µl, ½µl... fins un total de 8) en medi dels lentivirus obtinguts. L'endemà es va afegir 1ml de medi a cada pouet i es va deixar incubant 48h. Passat aquest temps es van recollir les cèl·lules infectades amb les diferents dilucions i es van centrifugar 1 minut a 10.000rpm. El pelet es va rentar dos cops amb PBS i es va resuspendre en 500µl de PBS. L'anàlisi del nombre de cèl·lules infectades (GFP positives) es va dur a terme amb el citòmetre Cytomics FC 500 (Beckam Coulter), equipat amb un làser d'argó (488nm) en el canal FL1 (525/15nm). Es van comptar 10.000 esdeveniments de cada mostra i mitjançant el programa Cytomic RXP Analysis es va analitzar el percentatge d'esdeveniments que emetien fluorescència. A partir de la fórmula (Figura M3) es va determinar el nombre de partícules infectives (TU/ml).

$$\frac{TU}{ml} = \frac{\% \text{ cèl. infectades} \times n^{\circ} \text{ cèls. comptades a 2 DIV}}{\mu l \text{ virus}}$$

Figura 3.3. Fórmula per calcular el nombre de partícules infectives (TU/ml). Es calcula per cada dilució de lentivirus i es representa respecte el volum de virus addicionat. El TU/ml final es la mitja dels valors obtinguts en la part lineal de la gràfica (normalment les tres últimes dilucions).

3.9.6 – Infecció lentiviral dels cultius primaris i línies cel·lulars

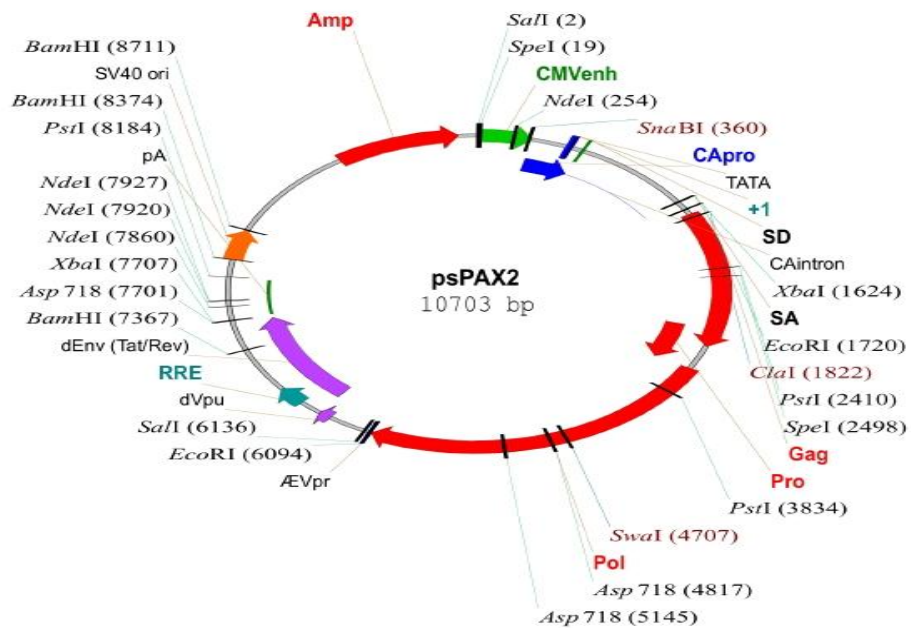
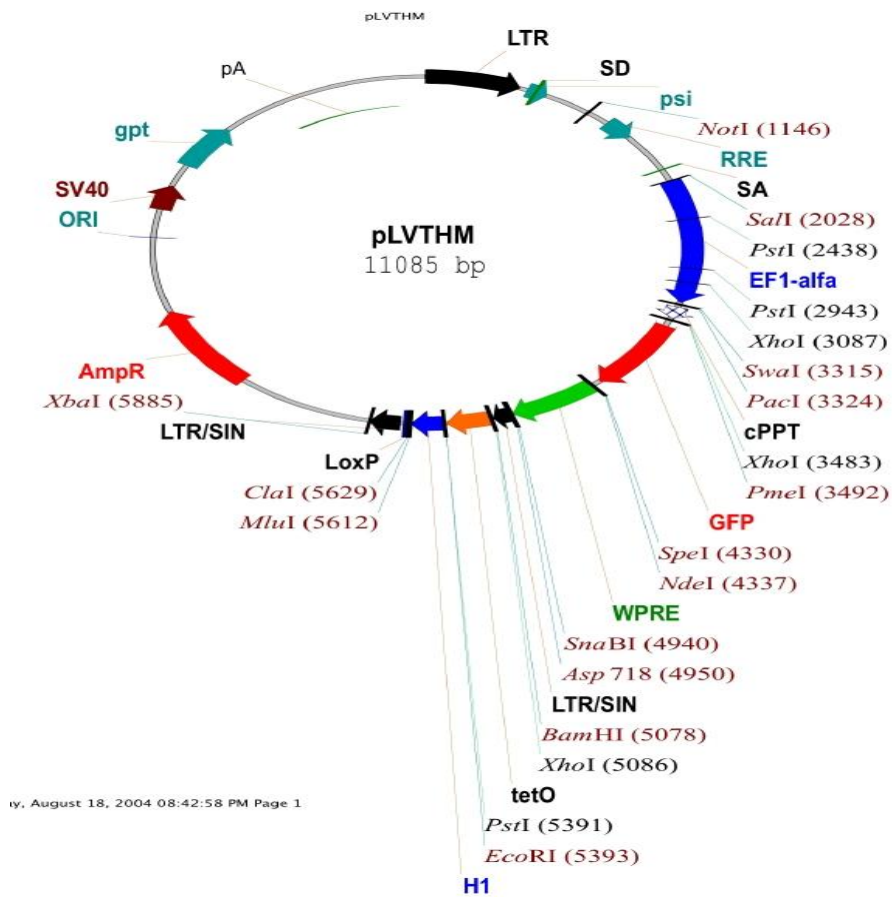
En el cas de les PC12, els lentivirus eren afegits alhora de sembrar el cultiu, amb la meitat de volum i el doble de la densitat final desitjada. Els cultius corticals van ser infectats als 4-5 DIV. Es retirava la meitat del medi i s'afegia el lentivirus. 1 TU/cèl era suficient per veure el silenciament o la sobreexpressió de FAIM_L. En ambdós casos passades 4-6 hores es retirava el medi i s'afegia medi nou en un volum complet. En el cas de les PC12 els llistats per veure l'efecte del lentivirus es van realitzar 48 hores

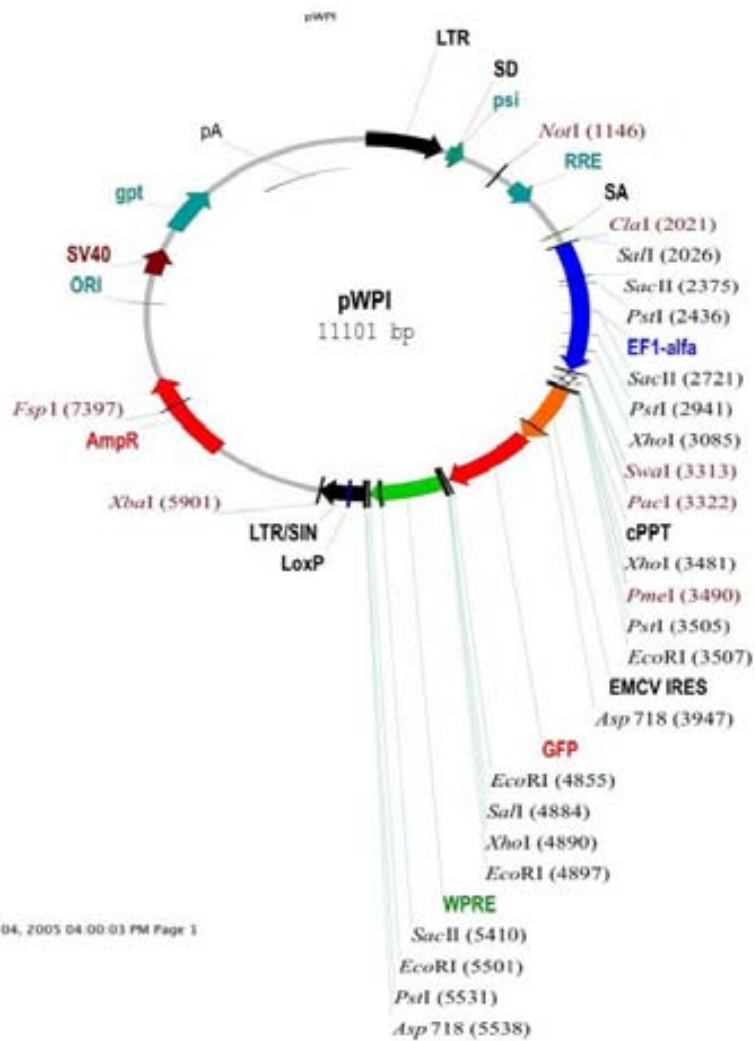
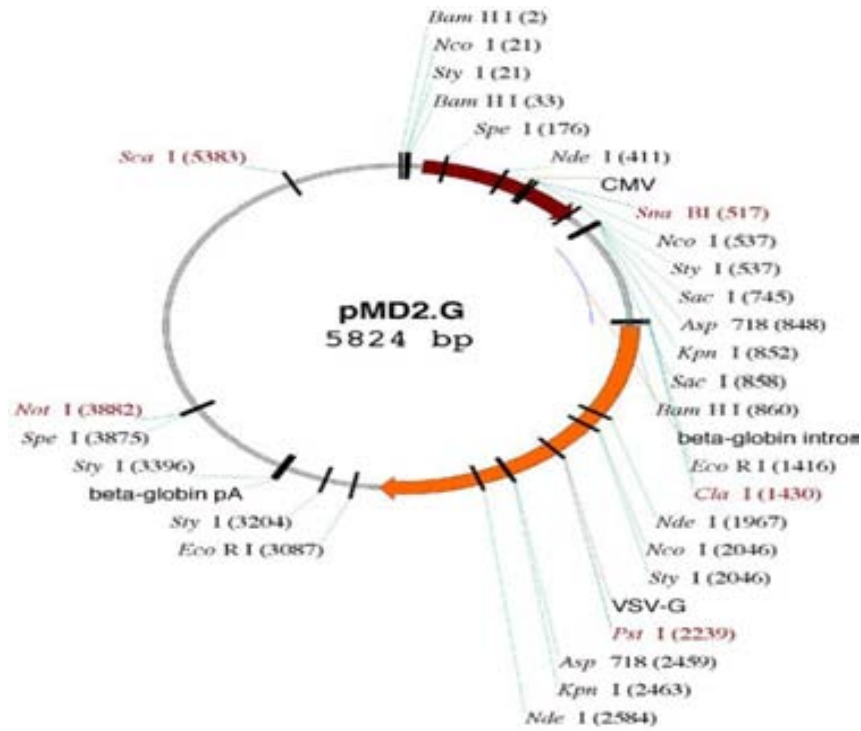
després de l'infecció mentre que en el cas dels cultius primaris es va realitzar després del tractament entre 12-14 DIV (8-10 dies post-infecció).

3.10 – ANÀLISI ESTADÍSTICA

L'anàlisi estadística es va realitzar amb el programa GraphPad Prism 4. Els resultats de les gràfiques estan expressats com a mitja \pm SEM i van ser comparats a través d'una ANOVA (*one-way o two-way*) seguit d'un test de multicomparació (Tukey o Bonferroni) quan era necessari. Els valors de $p < 0,05$ foren considerats significatius.

ANNEX I. MAPA DELS PLASMIDIS EMPRATS





4. RESULTATS

4. RESULTATS

4.1. MORT INDUÏDA PER L'OGD

4.1.1. Viabilitat cel·lular i morfologia nuclear

Tal i com s'ha determinat en la part d'hipòtesis i d'objectius, el treball d'aquesta tesi està centrat en l'estudi dels antagonistes dels receptors de mort en un model de privació d'oxigen i glucosa (OGD). Per fer-ho es van utilitzar cultius corticals mixtes d'embrions de rata. A la setmana del cultiu se'ls hi canviava el medi amb un antimitòtic per tal de frenar la proliferació de la glia. I els cultius eren tractats entre els 12 i els 14 DIV, un cop madurs. En un primer moment es va analitzar la viabilitat dels cultius a les 24 hores de ser sotmesos a diferents temps de OGD. El medi va ser substituït pel buffer de privació i els cultius es van ficar dins la cambra d'hipòxia durant 30, 75 i 90 min. Passat aquest temps es va retornar el medi condicionat i a les 24h es va mesurar la viabilitat a través de l'assaig de reducció de l'MTT. Es va veure que en les nostres condicions una exposició de 30 minuts no era suficient per veure mort a les 24 hores per l'assaig de l'MTT. En canvi, en OGD's de 75 o 90 minuts la viabilitat cel·lular era del voltant del 50 % a les 24 hores de retornar el medi condicionat (Fig 1).

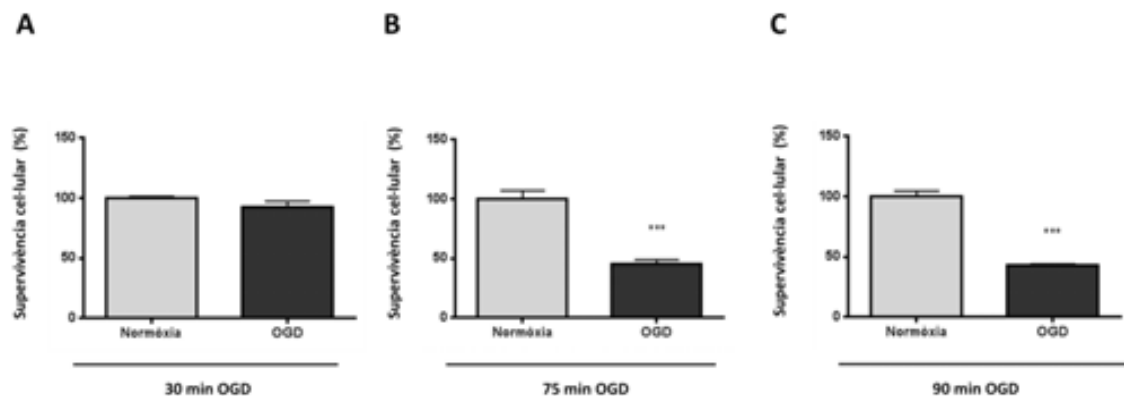


Figura 4.1. Viabilitat cel·lular en l'OGD. Assaig de viabilitat per MTT al cap de 24 hores de 30 (A), 75 (B) i 90 (C) minuts d'OGD. Resultats normalitzats respecte la normòxia i expressats com la mitjana \pm SEM; n=3 (A) i n=5 (B,C). ***p<0,0001 denota significància respecte la normòxia (student's t-test)

Posteriorment, es va procedir a analitzar la integritat de la membrana plasmàtica de les cèl·lules exposades a 75 minuts de OGD després de 24 hores mitjançant una tinció amb el marcador fluorescent iodur de propidi (PI). Aquest es va afegir abans de fixar

les cèl·lules i només penetra en aquelles on la membrana plasmàtica està trencada. Per altre banda, també es va utilitzar el marcador Hoechst 33258 que ens va permetre avaluar l'estat de condensació de la cromatina. Tenint en compte aquestes dues tincions, podem considerar que les cèl·lules amb el nucli condensat però PI negatives (amb la membrana íntegra) segueixen un patró de mort apoptòtica. Mentre que en les cèl·lules amb el nucli condensat i PI positives correspondrien a una apoptosi més tardana, on la membrana cel·lular ja s'ha fragmentat.

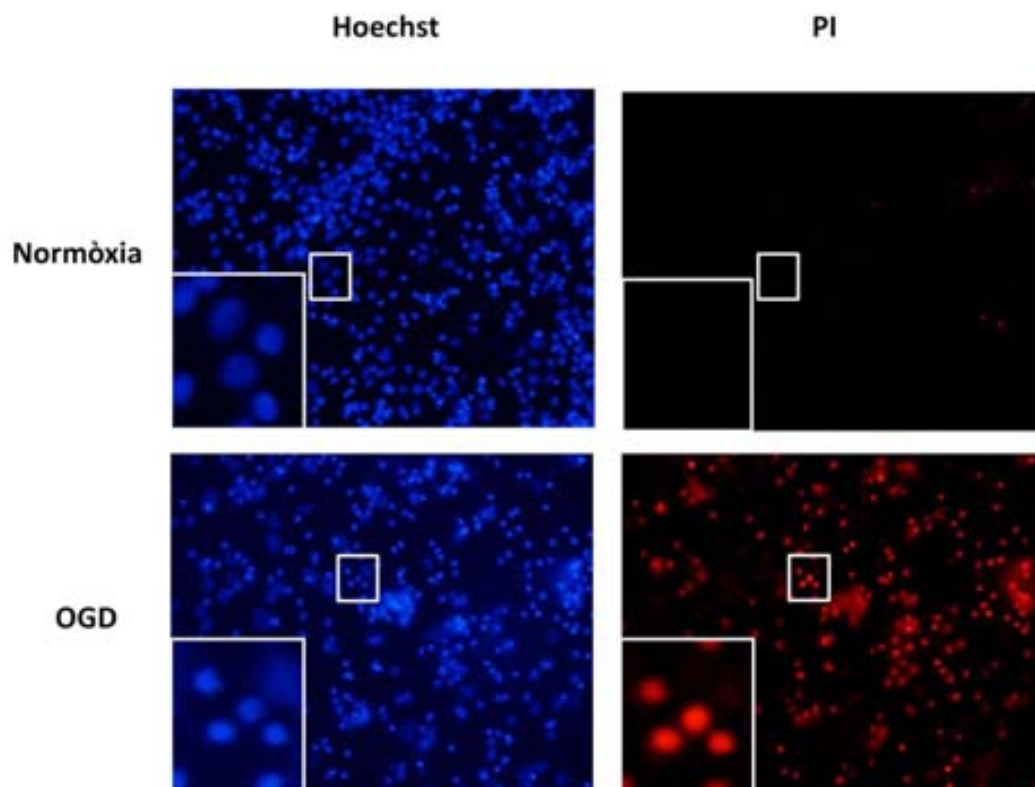


Figura 4.2. Tinció fluorescent amb Hoechst 33258 i PI. Cèl·lules fixades a les 24 hores de 75 minuts d'OGD.

L'anàlisi morfològic ens va permetre valorar que la majoria de neurones a les 24 hores de la OGD mostraven els nuclis altament condensats (picnòtics) i PI positius, mentre que els astròcits tenien una major resistència i mantenien la cromatina laxa sense presentar un marcatge pel PI (Fig 2). Per tant, el conjunt de resultats indica, en el nostre cas, que els cultius corticals mixtes pateixen una citotoxicitat per la OGD al cap d'una exposició mínima de 75 minuts. A més a més, en aquest procés de mort cel·lular les neurones mostren una morfologia apoptòtica caracteritzada per una alta condensació de la cromatina.

4.1.2. Neuroprotecció en l'OGD per inhibició dels receptors NMDA

Posteriorment es van fer experiments amb l'antagonista no-competitiu dels receptors d'NMDA MK-801. L'MK-801 s'uneix a l'interior del canal iònic evitant l'entrada massiva de calci a l'interior de la cèl·lula. Els cultius es van pretractar amb 10 μ M d'MK-801 mitja hora abans de realitzar OGD's de 75 i 90 minuts. En concret, l'inhibidor es va diluir en el tampó de privació dins la cambra anòxica i posteriorment en el medi condicionat. A continuació, es va realitzar un anàlisi de la viabilitat cel·lular mitjançant l'assaig de supervivència MTT al cap de 24 hores de les diferents OGDs. Tal i com s'observa en la figura 3, en els cultius tractats amb l'inhibidor hi havia una recuperació del 80% i 90% respecte la seva normòxia en els cultius sotmesos a 75 i 90 minuts d'OGD respectivament (Fig 3). Per tant, aquests resultats indiquen la implicació dels receptors NMDA en el procés de mort induït per la OGD, donat que detectem una neuroprotecció significativa amb l'inhibidor MK-801.

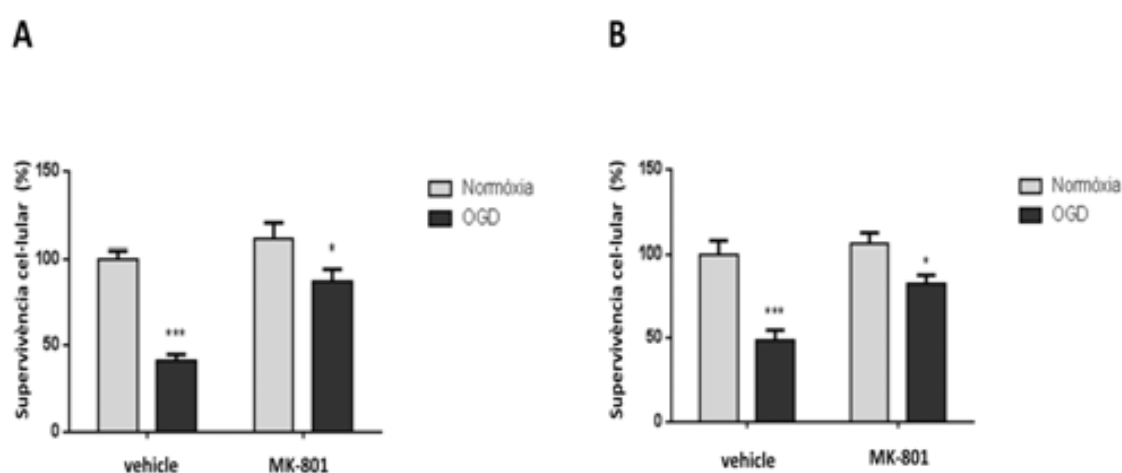


Figura 4.3. Pretractament amb MK-801 en l'OGD. Assaig de viabilitat per MTT al cap de 24 hores de A) 75 i B) 90 minuts d'OGD pretractant amb l'inhibidor dels receptors NMDA MK-801. Resultats expressats com la mitjana \pm SEM; n=3. *p<0,05 denota significància respecte la normòxia de cada condició (Student's t-test).

4.1.3. Estudi de l'activació de la caspasa-3 en l'OGD

Tenint en compte l'aspecte apoptòtic dels nuclis examinats anteriorment durant el procés de mort induït per la OGD, vam procedir a analitzar l'activació de les caspases.

En concret, vam analitzar l'activació de la caspasa efectora caspasa-3, donada la seva rellevància en el desmantellament apoptòtic de les cèl·lules i en l'adquisició de les principals característiques morfològiques apoptòtiques. L'anàlisi es dugué a terme mitjançant les tècniques de Western Blot i immunocitoquímica. Tal i com es pot apreciar a la figura 4, la caspasa-3 es proteolitzava al seu fragment actiu p17 a partir de les 3h i fins les 24h després d'exposar els cultius a la OGD (fig 4A). Pel que fa a l'anàlisi per immunocitoquímica, aquest ens va revelar que a les 6h la majoria de nuclis picnòtics eren caspasa-3 positius (fig 4B). Així, el conjunt d'aquests resultats suggereixen que les cèl·lules que estan patint un procés de mort provocat per la OGD, no solament presenten una morfologia nuclear de tipus picnòtica sinó que a més tenen activa la caspasa-3. A més a més, aquesta activació ja es detecta a partir de les 3h posteriors a la OGD.

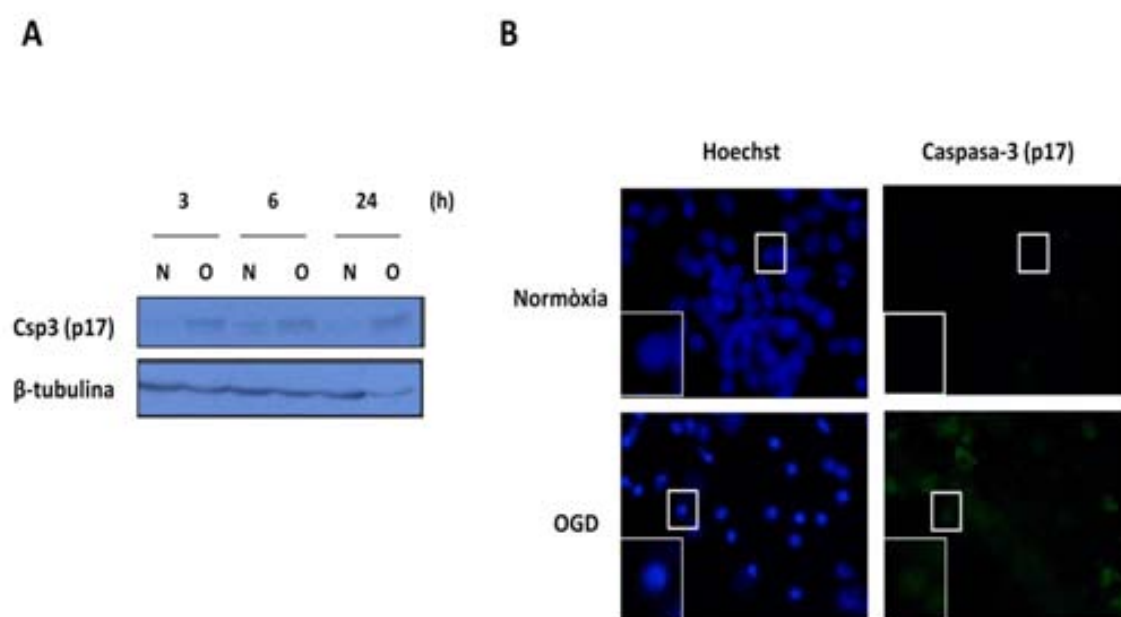


Figura 4.4. Activació de la caspasa-3 en l'OGD. A) Western-blot de caspasa-3 activa (p17) en llisats a 3, 6 i 24 hores després de l'OGD (O) i la normòxia (N). B) Immunocitoquímica de caspasa-3 activa (p17) i tinció fluorescent amb Hoechst 33258 a les 6 hores de l'OGD.

4.2. ESTUDI DE L'EXPRESSIÓ DELS ANTAGONISTES DELS RECEPTORS DE MORT EN L'OGD

Resultats previs del grup van demostrar l'implicació del TNF α a través del receptor TNFR1 i la caspasa-8 en la mort induïda per la OGD (Badiola, Malagelada et al. 2009). Per això, a continuació es va voler analitzar l'expressió de diferents antagonistes de la senyalització pels receptors de mort després de sotmetre les cèl·lules a una exposició d'OGD. En concret, es van examinar els nivells d'expressió de XIAP, IAP2, FLIP_L i FAIM_L. D'aquesta manera, es pretenia determinar si en el procés de mort provocat per la OGD s'estava produint una alteració dels nivells d'expressió d'aquests antagonistes que pogués suggerir la seva implicació en la citotoxicitat provocada per la OGD.

4.2.1. XIAP

L'XIAP (*X-linked inhibitor of apoptosis*) és una proteïna de la família de les IAP's (del anglès, *Inhibitors of apoptosis*). Aquesta família de proteïnes es caracteritza per contenir un domini BIR (*Baculovirus IAP Repeat*) d'unió a caspases. XIAP és capaç d'inhibir directament les caspases 3, 7 i 9.

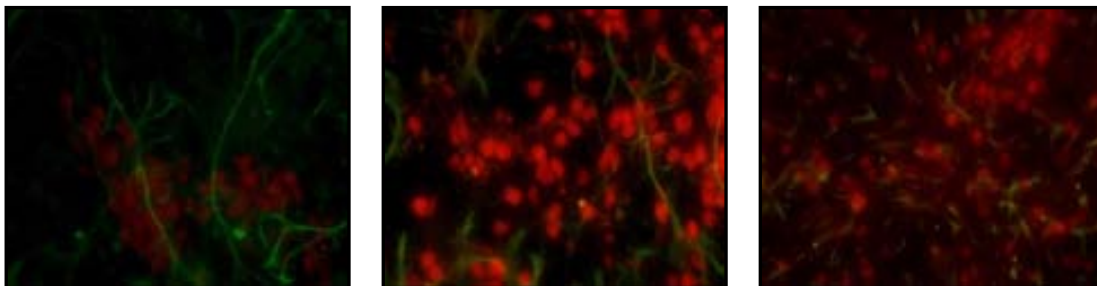


Figura 4.5. Expressió d'XIAP en cultius corticals mixtes. Immunocitoquímica de XIAP (vermell) i GFAP (verd) en cultius corticals mixtes de 12 DIV sense tractar.

Per tal d'analitzar els nivells d'expressió d'XIAP primer es van realitzar immunocitoquímiques en cultius de 12-14 DIV. Tal i com mostra la figura 5, vam observar l'expressió de XIAP en neurones i no en astròcits. Posteriorment també es van analitzar els nivells d'expressió de la proteïna i del mRNA als temps de 0, 1, 3, 6 i 24 hores de la OGD mitjançant les tècniques de RT-PCR i Western Blot respectivament (Fig 6). Tal i com s'observa a la figura 6, l'expressió d'XIAP no va variar de manera

significativa en cap dels temps posteriors a la OGD, tant a nivell proteic com a nivell de mRNA respecte al control de normòxia ni al llarg del temps. El conjunt d'aquests resultats indiquen que l'expressió d'XIAP es manté constant fins a les 24 hores després de la OGD, de manera que el manteniment de la seva expressió a nivell endogen no és suficient per bloquejar la mort induïda per la OGD.

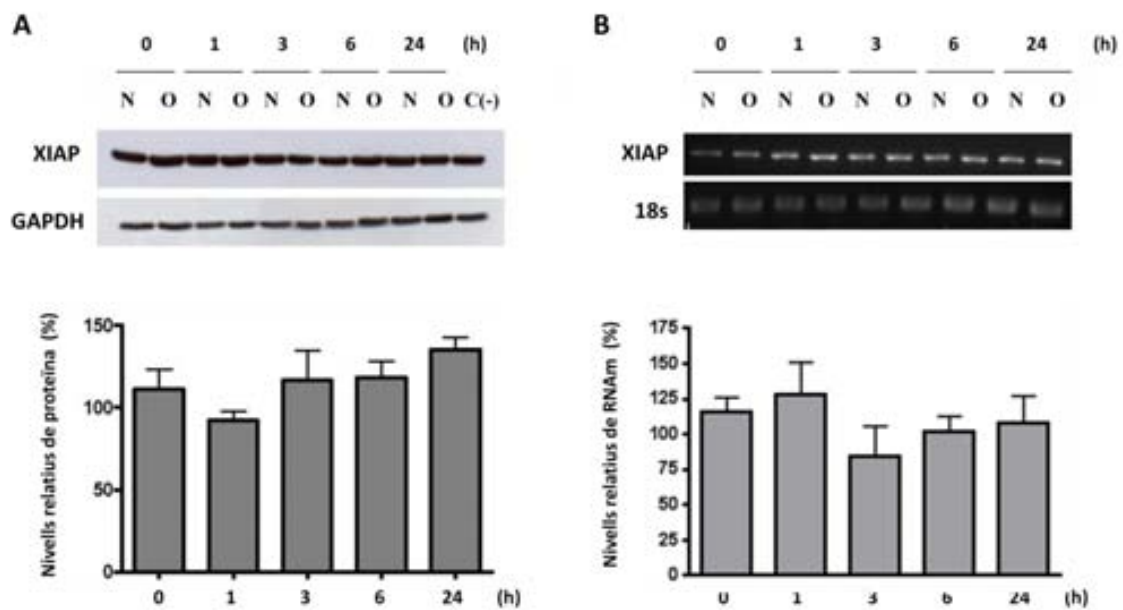


Figura 4.6. Expressió de XIAP després de l'OGD. A) Western-blot de XIAP en llisats a 0,1,3,6 i 24 hores després de l'OGD (O) i la normòxia (N). B) RT-PCR de XIAP al cap de 0, 1, 3, 6 i 24 hores després de l'OGD. Resultats normalitzats amb el control de càrrega i expressats com a % respecte la normòxia a cada temps \pm SEM; n=4 (A) i n=3 (B).

4.2.2. IAP2

A continuació es va procedir a analitzar l'expressió de IAP2 (del anglès, *inhibitor of apoptosis 2*), una altre proteïna de la família de les IAP's. L'estudi de l'expressió d'IAP2 també es va realitzar a nivell de proteïna i mRNA a diferents temps posteriors a l'exposició dels cultius a la OGD. L'anàlisi obtingut per Western Blot va indicar una degradació d'IAP2 al llarg del temps en les cèl·lules exposades a la OGD respecte la normòxia i accentuada de manera significativa a les 24 hores (Fig 7A). Aquesta degradació es produïa a nivell proteic, ja que la quantitat d'mRNA transcrit de la proteïna es mantenia gairebé constant al llarg de tot el curs temporal (Fig 7B). En conjunt, els resultats suggereixen una degradació proteica d'IAP2 rellevant

principalment a les 24 hores de la OGD, malgrat no es detecti una disminució en els nivells de missatger.

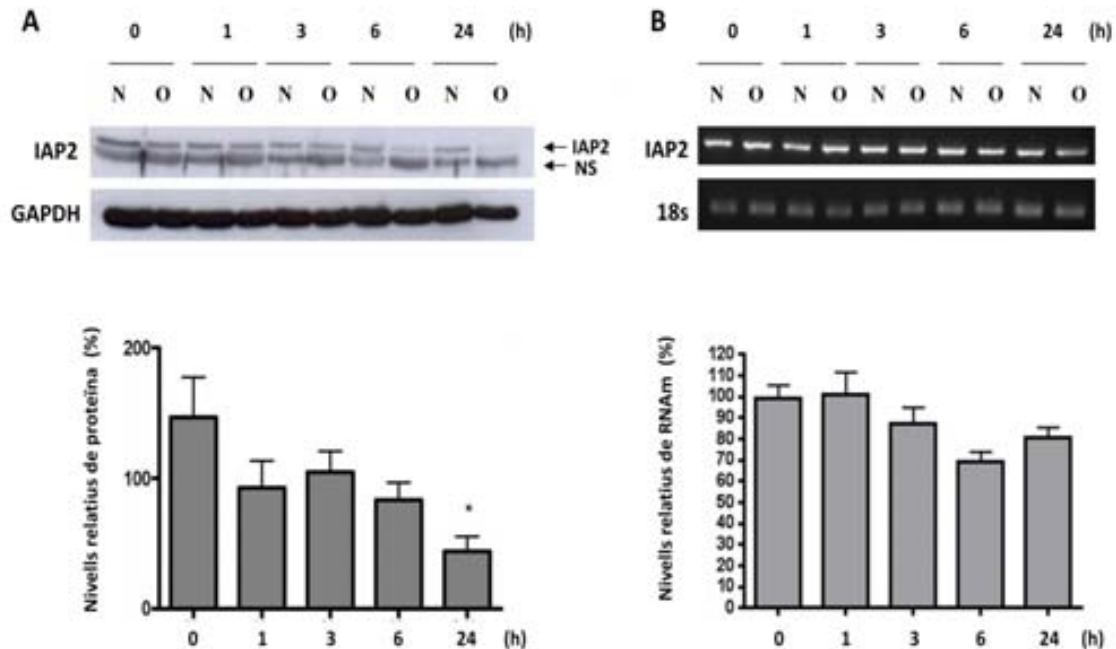


Figura 4.7. Expressió de IAP2 després de l'OGD. A) Western-blot de IAP2 en llisats a 0, 1, 3, 6 i 24 hores després de l'OGD (O) i la normòxia (N). NS: banda no específica; B) RT-PCR de IAP2 al cap de 0, 1, 3, 6 i 24 hores després de l'OGD. Resultats normalitzats respecte el control de càrrega i expressats com % respecte la normòxia a cada temps \pm SEM; n=5 (A), n=3 (B). *p<0,05 denota significància respecte el temps 0h (One-way ANOVA, Tukey multiple comparison test).

4.2.3. FLIP_L

De la mateixa manera, es va examinar l'expressió de la isoforma llarga de FLIP (FLIP_L) en diferents temps posteriors a l'exposició de les cèl·lules a la OGD. L'anàlisi dels nivells de proteïna per Western Blot van mostrar una disminució gairebé completa dels nivells de FLIP_L al llarg de tot el curs temporal en les cèl·lules sotmeses a OGD respecte la normòxia (Fig 8A). En aquest cas, a diferència del que succeïa amb IAP2, la degradació de FLIP_L es va detectar de manera immediata després de la OGD (Fig 8A). De fet ja en el temps de 0 hores la baixada de FLIP_L era considerable respecte el seu control de normòxia (Fig 8A). A més, cal afegir que la desaparició de la proteïna es donava de forma casi completa a les 24 hores (Fig 8A). Per altre banda, cal esmentar que la degradació proteica de FLIP_L detectada al llarg de tot el curs temporal en les

cèl·lules exposades a la OGD, es donava tant en la seva forma lliure, p55, com en la processada i unida al complex d'inducció de mort (DISC), p43 (Fig 8A). A nivell de missatger, no es va detectar una baixada considerable de FLIP_L en cap dels temps posteriors a la OGD (Fig 8B). En conjunt, aquests resultats indiquen una disminució gairebé completa i immediata dels nivells després de la OGD. No obstant, aquests canvis en l'expressió només succeïen a nivell proteic

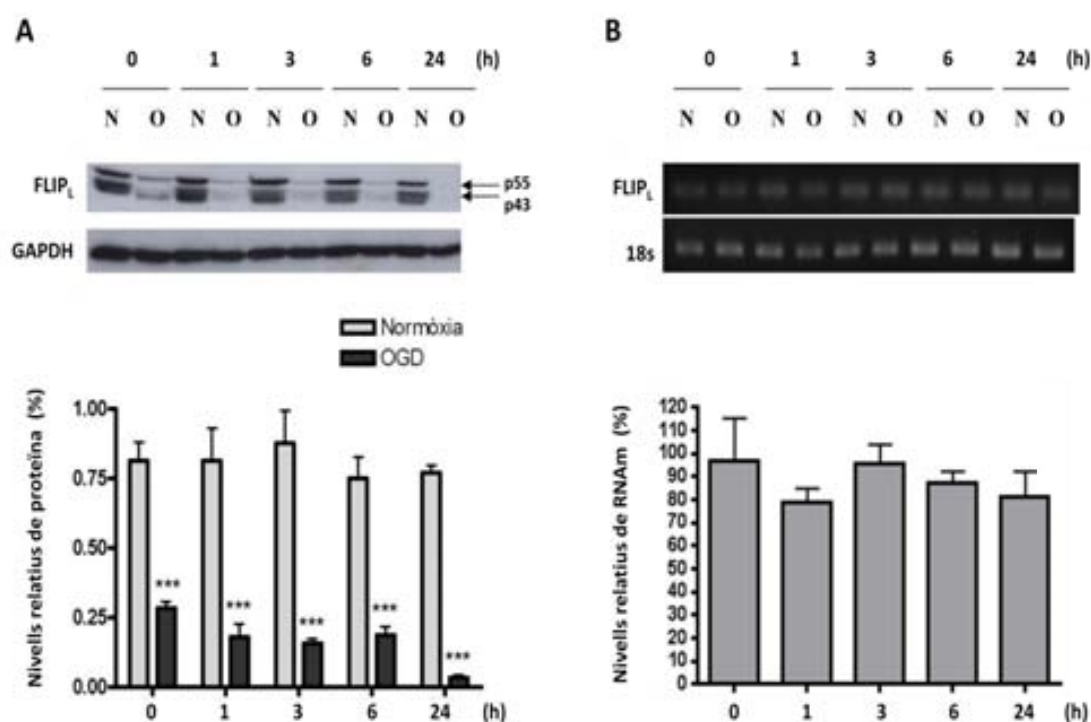


Figura 4.8. Expressió de FLIP_L després de l'OGD. Western-blot de FLIP_L en llisats a 0, 1, 3, 6 i 24 hores després de l'OGD (O) i la normòxia (N). B) RT-PCR de FLIP_L al cap de 0, 1, 3, 6 i 24 hores després de l'OGD. Resultats normalitzats respecte el control de càrrega i expressats com la mitjana ± SEM (A) i el % respecte la normòxia ± SEM (B); n=5 (A), n=3 (B). ***p<0,0001 denota significància respecte la normòxia en cada temps (student's t-test).

4.2.4. FAIM_L

Finalment es va mirar l'expressió de FAIM_L. L'anàlisi per Western Blot va mostrar un increment a les 3 hores posteriors a l'exposició a la OGD respecte al seu control de normòxia (Fig 9A). Aquest increment només era evident en aquest punt temporal ja que posteriorment recuperava els nivells inicials (Fig 9A). Posteriorment, tenint en

compte que FAIM_L està descrita com una proteïna neuronal, vam voler comprovar aquesta expressió realitzant una immunocitoquímica en els cultius corticals mixtes. Per fer-ho, vam emprar GFAP com a marcador d'astròcits i MAP2 com a control de neurones (Fig 10). Tal i com es pot observar en la figura 10, la immunocitoquímica va revelar l'expressió de FAIM en neurones però no en astròcits.

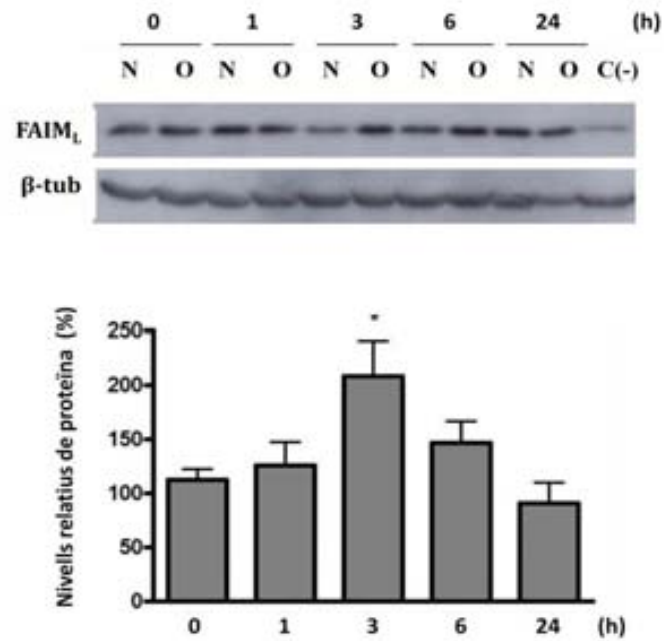


Figura 4.9. Expressió de FAIM_L després de l'OGD. Western-blot de FAIM_L en llisats a 0, 1, 3, 6 i 24 hores després de l'OGD (O) i la normòxia (N). C(-): llisat previ a l'OGD. Resultats normalitzats respecte el control de càrrega i expressats com a % ± SEM respecte la normòxia en cada temps; n=5. p<0,05 denota significància respecte 0h (One-way ANOVA, Bonferroni multiple comparison).

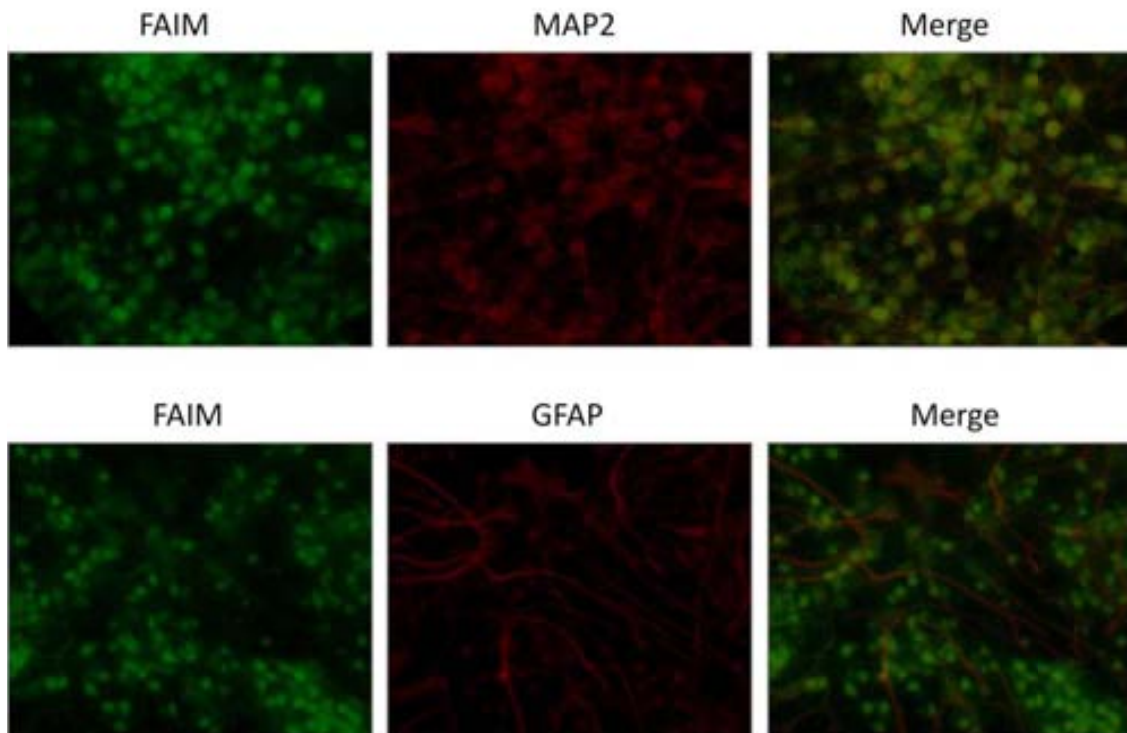


Figura 4.10. Expressió de FAIM en cultius corticals mixtes. Immunocitoquímica de FAIM (verd) i MAP2 i GFAP (vermell) en cultius corticals mixtes.

4.3. REGULACIÓ DE FAIM_L EN L'OGD

En aquest punt, vam voler analitzar quines vies de senyalització estaven implicades en la modulació dels nivells endògens de FAIM_L durant la mort induïda per l'OGD. La regulació de FAIM_L s'ha relacionat amb la via de senyalització de les MAP cinases durant la diferenciació a neurones de la línia cel·lular PC12 (Segura, Sole et al. 2007). Tenint en compte la implicació d'aquesta via, vam procedir a analitzar els nivells d'expressió de FAIM_L i la viabilitat cel·lular en cèl·lules pretractades amb un inhibidor de les MAP cinases (PD098059) i posteriorment sotmeses a l'OGD.

4.3.1. Pretractament amb PD098059

Després de pretractar les cèl·lules del cultiu mitja hora abans de l'OGD amb l'inhibidor de les MAP cinases PD098059, es van examinar els nivells d'expressió de FAIM_L a les 0, 3, 6 i 24 hores posteriors a l'OGD, així com també la viabilitat cel·lular a les 24 hores de l'OGD (Figs. 11 i 12).

Tal i com es pot observar a la figura 25, i com s'havia descrit amb anterioritat, la normalització dels nivells de proteïna de FAIM_L respecte als del control de càrrega no van revelar diferències significatives dels nivells de FAIM_L en les cèl·lules sense pretractar sotmeses a OGD i els respectius controls de normòxia a cada temps, excepte a les 3 hores posteriors a l'OGD. En aquest darrer temps, en les cèl·lules pretractades amb PD098059 es va deixar de detectar aquest increment dels nivells d'expressió de FAIM_L en les cèl·lules sotmeses a OGD respecte el control de normòxia (Fig. 11).

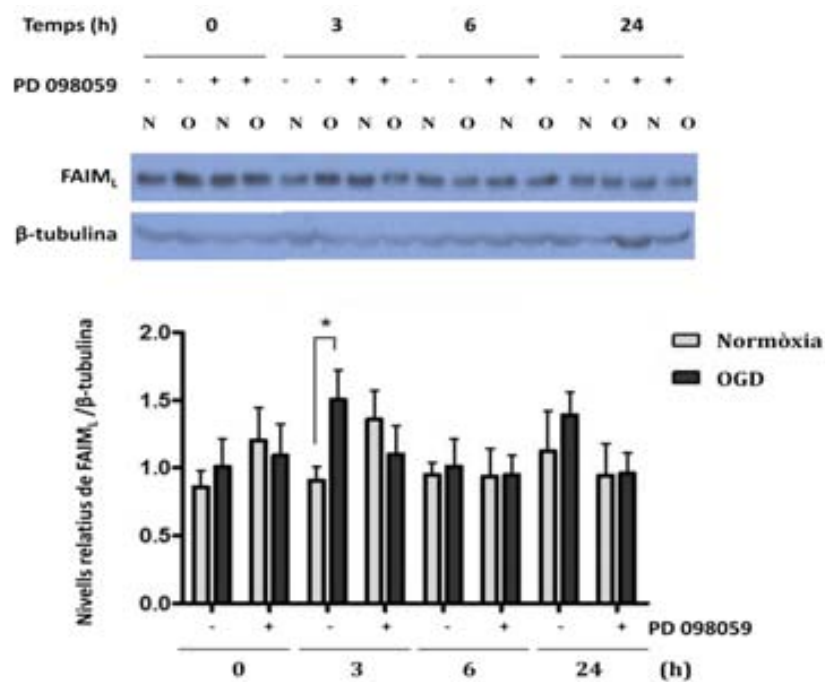


Figura 4.11. Expressió de FAIM_L en l'OGD pretractant amb PD098059. Western-blot de FAIM_L en cultius pretractats amb PD098059 a 0, 3, 6 i 24 hores després de l'OGD. Resultats normalitzats respecte el control de càrrega i expressats com la mitjana ± SEM; n=4. *p<0,05 denota significància respecte la normòxia (student's t-test).

Pel que fa a l'assaig de viabilitat cel·lular, no es van observar diferències significatives entre els percentatges de supervivència cel·lular obtinguts en absència i en presència de l'inhibidor PD098059 a les 24 hores de l'OGD (Fig. 26).

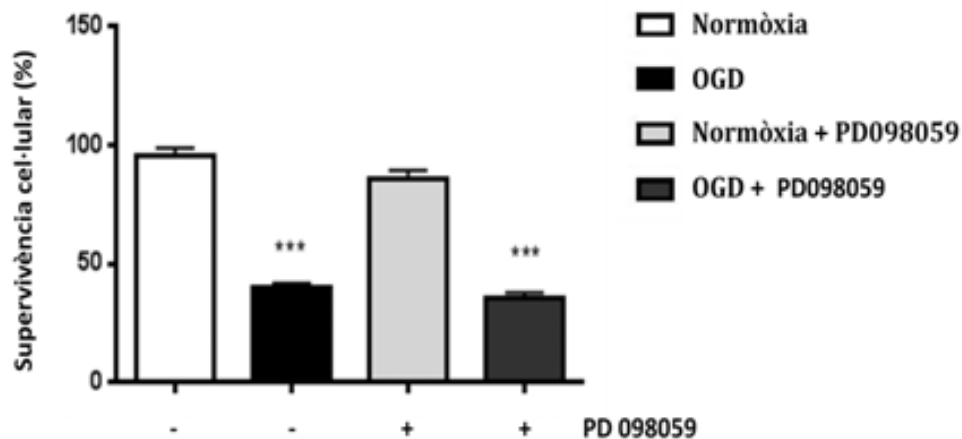


Figura 4.12. Viabilitat cel·lular en l'OGD pretractant amb l'inhibidor PD098059. Assaig de reducció de l'MTT a les 24 hores de l'OGD pretractant amb l'inhibidor de les MAP quinases PD098059. Resultats normalitzats respecte la normòxia i expressats com % \pm SEM; n=3. ***p<0,0001 denota significància respecte la normòxia (unpaired t-test).

De tots els antagonistes analitzats, FAIM_L és l'únic del que no s'ha descrit un paper neuroprotector en un model d'isquèmia. Resultats anteriors del grup van indicar l'implicació del TNF α a través del receptor TNFR1 i la caspasa-8 i 3 en la mort induïda per la OGD (Badiola, Malagelada et al. 2009). Per altra banda, també es coneix el paper antiapoptòtic de FAIM_L en l'apoptosi neuronal provocada per l'activació dels receptors de mort FasR i TNFR1 (Segura, Sole et al. 2007). Tenint en compte aquests resultats, ens vam plantejar analitzar el possible paper de FAIM_L en el nostre model. Per fer-ho, vam procedir a silenciar i sobreexpressar FAIM_L en els cultius corticals mixtes. D'aquesta manera, es pretenia analitzar si el silenciament o la sobreexpressió eren capaços d'alterar la mort induïda per la OGD i intentar establir, així, el rol d'aquest antagonista en un model d'isquèmia.

4.4. SILENCIAMENT DE FAIM_L EN L'OGD

El silenciament de l'expressió de FAIM_L es dugué a terme a partir de la generació de vectors lentivirals amb un shRNA (*short hairpin RNA*) per FAIM_L. En paral·lel, també es van generar vectors lentivirals amb una seqüència *scramble* com a control d'infecció. Per tal de determinar l'efectivitat en el silenciament de l'expressió de FAIM_L es van realitzar varies infeccions amb diferents dilucions dels lentivirus esmentats en la línia cel·lular de rata PC12. Posteriorment, s'obtingueren els llisats corresponents a les 48

hores de l'infecció i s'analitzaren els nivells d'expressió de FAIM_L mitjançant la tècnica de Western Blot (Fig 13).

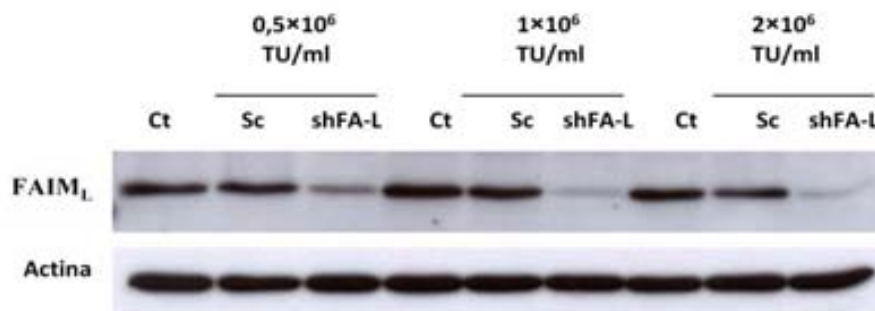


Figura 4.13. Proves d'infecció amb el lentivirus shFAIM_L en PC12. Western-blot de FAIM amb diferents concentracions de lentivirus. Sc: lentivirus amb la seqüència scramble; shFA-L: lentivirus amb l'shRNA per FAIM_L. Ct: cèl·lules sense infectar.

Tal i com es pot observar en la figura 13, l'expressió de FAIM_L va disminuir de forma lineal d'acord amb un major nombre de partícules virals. El silenciament, però, obtingut amb les dues concentracions majors de partícules infectives era similar i aconseguia una disminució gairebé completa dels nivells de proteïna (Fig 13). Posteriorment, vam passar a realitzar les proves d'infecció en els cultius corticals mixtes. Aquestes proves es van dur a terme en diferents DIV per tal d'establir les condicions òptimes per a l'infecció. En aquest sentit, es pretenia obtenir la màxima quantitat de cèl·lules infectades i, alhora, endarrerir al màxim el dia d'infecció del cultiu per tal de minimitzar la possible citotoxicitat derivada de l'exposició dels cultius corticals mixtes amb els lentivirus. Per fer-ho, vam infectar els cultius amb el lentivirus *scramble* més la GFP (*green fluorescent protein*) a diferents DIV. Posteriorment, es va avaluar l'efectivitat de l'infecció observant l'emissió de fluorescència verda de la proteïna GFP mitjançant un anàlisi per microscòpia. Les cèl·lules es van infectar a 0, 2 i 4 DIV i l'expressió de la GFP s'examinà als 8 DIV i 12 DV per cada un dels diferents dies d'infecció realitzats (Fig 14). Als 8 DIV la quantitat de cèl·lules positives per GFP era superior en les cèl·lules infectades el dia del cultiu (0 DIV) que no pas en les infectades a 2 o 4 DIV (Fig 14A). Als 12 DIV, en canvi, la quantitat de cèl·lules positives per GFP era semblant en els tres dies d'infecció utilitzats (Fig 14B). Així doncs, tenint en compte aquestes dades, vam decidir infectar als 4 DIV i avaluar els nivells d'expressió als 12 DIV. D'aquesta manera, podríem obtenir l'expressió del shRNA o la sobreexpressió de la

proteïna desitjada en cèl·lules exposades a l'infecció lentiviral el menor temps possible.

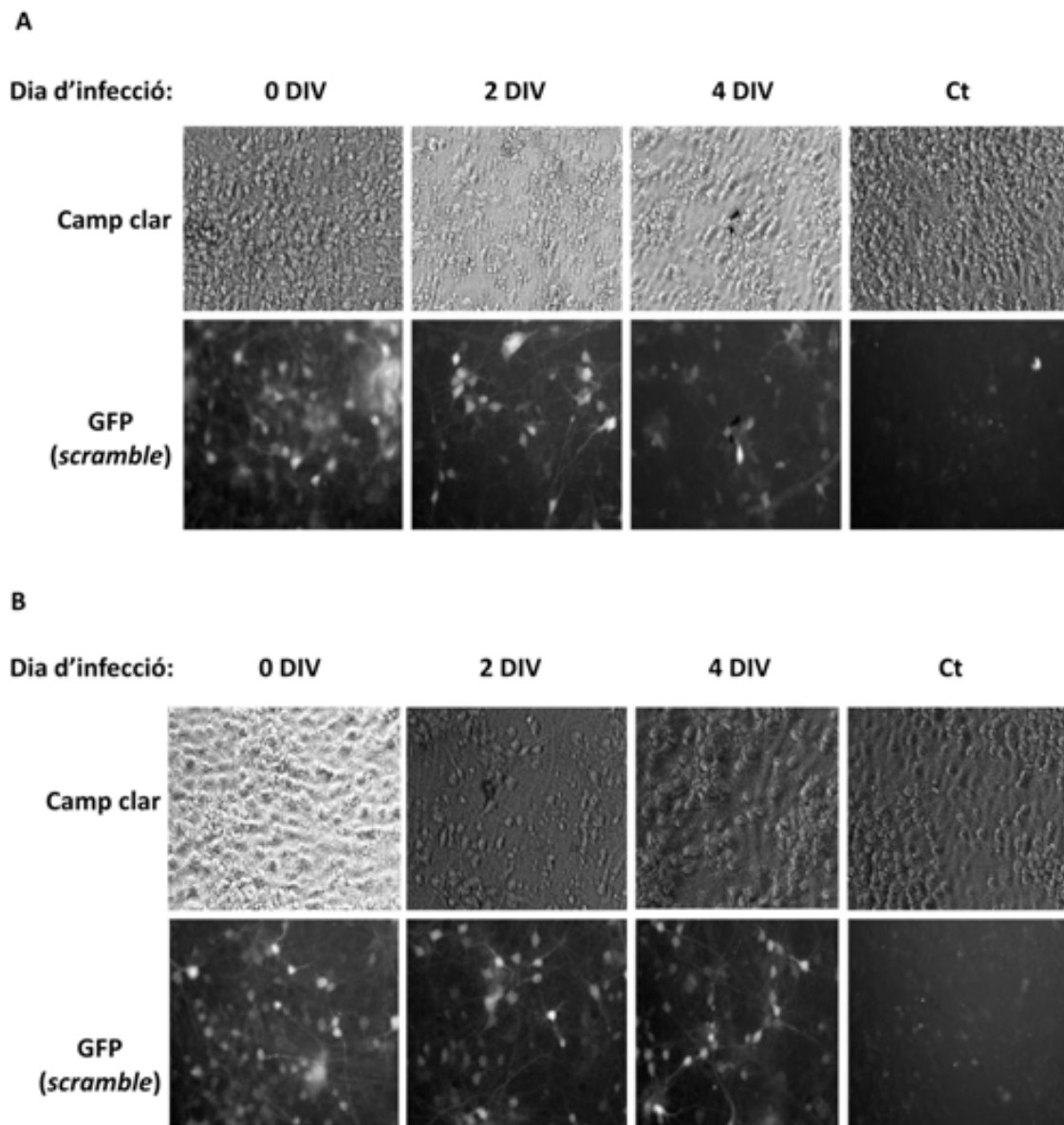


Figura 4.14. Proves d'infecció en cultius corticals mixtes. Fotos amb camp clar i fluorescència (GFP) de cultius infectats a 0, 2 i 4 DIV amb el lentivirus *scramble*. Visum als 8 (A) i 12 (B) DIV. Ct: cèl·lules sense infectar

Un cop estandarditzat el procés d'infecció, vam procedir a silenciar l'expressió de FAIM_L. Així, l'anàlisi dels nivells d'expressió per Western Blot realitzat als 12 DIV va revelar una disminució completa de l'expressió de FAIM_L en les cèl·lules infectades amb el shRNA de FAIM_L (iFAIM_L) en comparació amb les infectades amb el lentivirus *scramble* (Fig 13A). En paral·lel, també es va controlar el l'efectivitat de l'infecció

realitzant el comptatge de cèl·lules positives per GFP respecte a les totals tenyides amb Hoechst 33258 (Fig 13B). El percentatge d'infecció estava al voltant del 60% (Fig 13B).

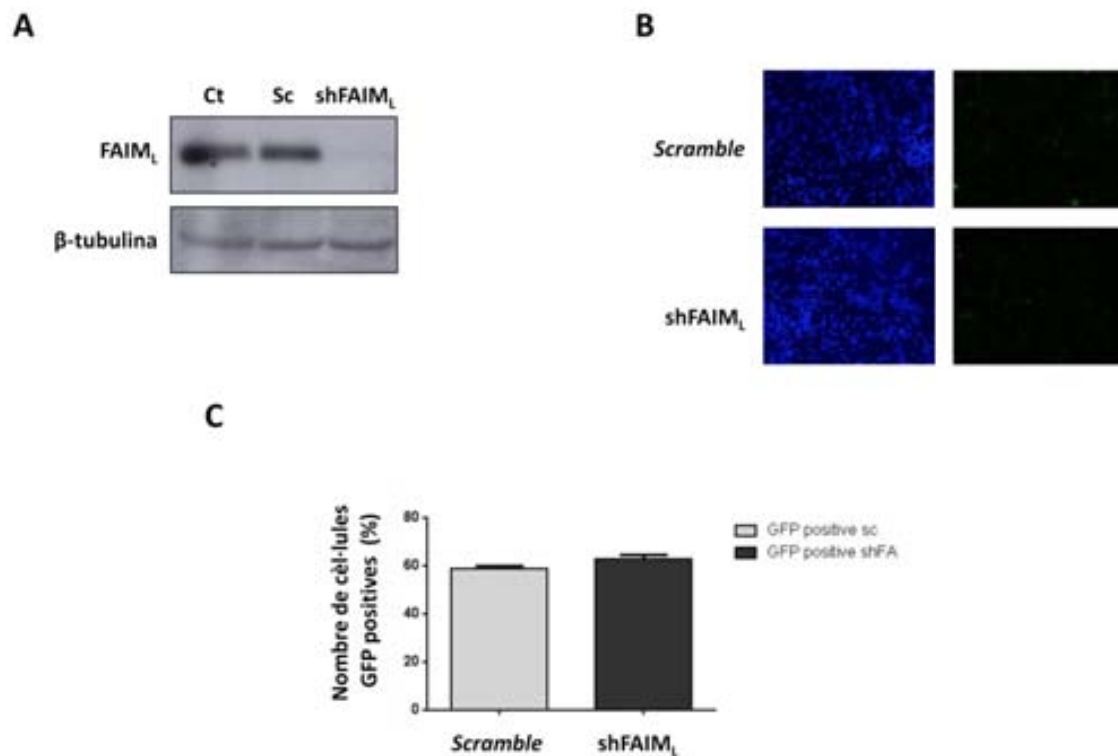


Figura 4.15. Quantificació de l'infecció amb els lentivirus shFAIM_L i scramble en cultius corticals mixtes. A) Western-blot de FAIM_L de cultius control sense infectar (ct), infectats amb el lentivirus *scramble* (Sc) i amb el lentivirus amb l'shRNA de FAIM_L (shFAIM_L). Llissats als 12 DIV. B) Marcatge amb Hoechst 33258 i observació de la GFP viral dels cultius infectats amb el lentivirus *scramble* i shFAIM_L. C) Quantificació del percentatge d'infecció respecte el nombre total marcat amb Hoechst. Resultats expressats com la mitjana ± SEM; n=3.

Un cop comprovat el silenciament en l'expressió de FAIM_L als 12 DIV de cultiu, vam realitzar l'OGD de les cèl·lules infectades. Primer, però, es va analitzar la viabilitat cel·lular dels cultius infectats tant amb el *scramble* com amb el shFAIM_L en condicions control (sense tractar) (Fig. 14A). D'aquesta manera, es pretenia descartar possibles efectes de citotoxicitat cel·lular derivats del procés d'infecció. Tal i com es pot observar en la figura 14A, els percentatges de viabilitat cel·lular pràcticament no es van alterar en les condicions control en les cèl·lules infectades amb el *scramble* com amb el shFAIM_L. Tan sols es va apreciar una reducció del voltant d'un 10% en les dues condicions d'infecció en comparació a les cèl·lules control (Fig. 14A). Finalment, es va procedir a analitzar la viabilitat cel·lular en els cultius corticals mixtes de 12 DIV

infectats als 4 DIV amb els lentivirus amb la seqüència *scramble* i el shRNA per FAIM_L després de ser sotmesos a una OGD de 75 minuts i en comparació als seus respectius controls de normòxia (Figs 14B, 15 i 16). En concret, l'estudi de viabilitat cel·lular es dugué a terme 24 hores després de la OGD mitjançant l'assaig de supervivència per MTT (Fig. 14B) i la quantificació de mort cel·lular a través del comptatge dels nuclis positius per la tinció amb PI respecte als totals tenyits amb Hoechst 33258 (Figs. 15 i 16). Pel que fa a l'assaig MTT, vam obtenir una reducció dels percentatges de supervivència similar en les cèl·lules infectades amb el shRNA per FAIM_L i amb les infectades amb el *scramble* i a les cèl·lules control (sense infectar) (Fig. 14B). De manera semblant, no s'observaren diferències considerables en els percentatges de mort obtinguts mitjançant la tinció dels nuclis amb PI i Hoechst 33258 en les cèl·lules infectades amb l'shFAIM_L en comparació al de les infectades amb l'*scramble* i als obtinguts en les cèl·lules control (Fig. 16). Per altre banda, la tinció amb PI i Hoechst 33258 també ens va permetre avaluar la morfologia nuclear adquirida en la mort induïda per l'OGD en cada una de les diferents condicions cel·lulars (Fig. 15). Tal i com es pot observar en la figura 15, les cèl·lules sotmeses a OGD mostraven els nuclis picnòtics en les diferents condicions d'infecció i similars als de les cèl·lules control. Per contra, en les diferents condicions de normòxia vam poder observar l'absència d'aquest tipus de morfologia nuclear (Fig. 15). Per tant, el silenciament de FAIM_L no estava alterant la morfologia nuclear observada en l'OGD. Així, el conjunt d'aquests resultats ens indica que el silenciament de l'expressió de FAIM_L no altera ni els percentatges de mort cel·lulars induïts per l'OGD, ni la morfologia nuclear picnòtica que manifesten les cèl·lules durant el procés de mort cel·lular.

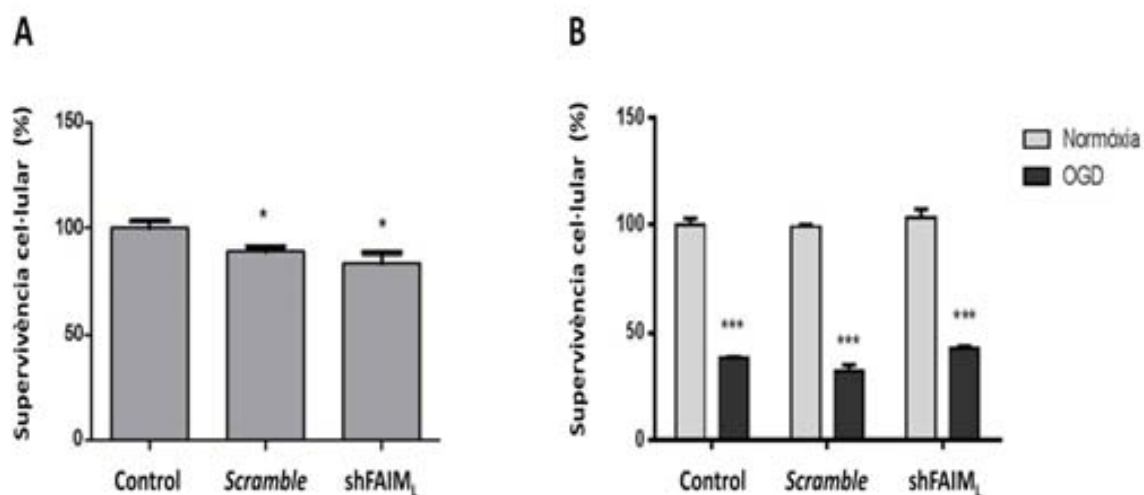


Figura 4.16. Assaig de viabilitat amb el lentivirus shFAIM_L en l'OGD. A) Assaig de viabilitat per MTT de cèl·lules sense tractar de 12DIV control sense infectar, i infectades amb el lentivirus *scramble* i amb el lentivirus amb l'shRNA de FAIM_L (shFAIM_L). Resultats normalitzats respecte el control i expressats com la mitjana ± SEM; n=3. *p<0,05 denota significància respecte el control (One-way ANOVA, Bonferroni). B) Assaig de viabilitat per MTT 24h després d'una OGD de 75 min en cultius control, i infectats amb el lentivirus *scramble* i shFAIM_L. Resultats normalitzats i expressats com la mitjana ± SEM. ***p<0,0001 denota significància respecte la normòxia en cada condició (two-way ANOVA i t-tes per cada condició).

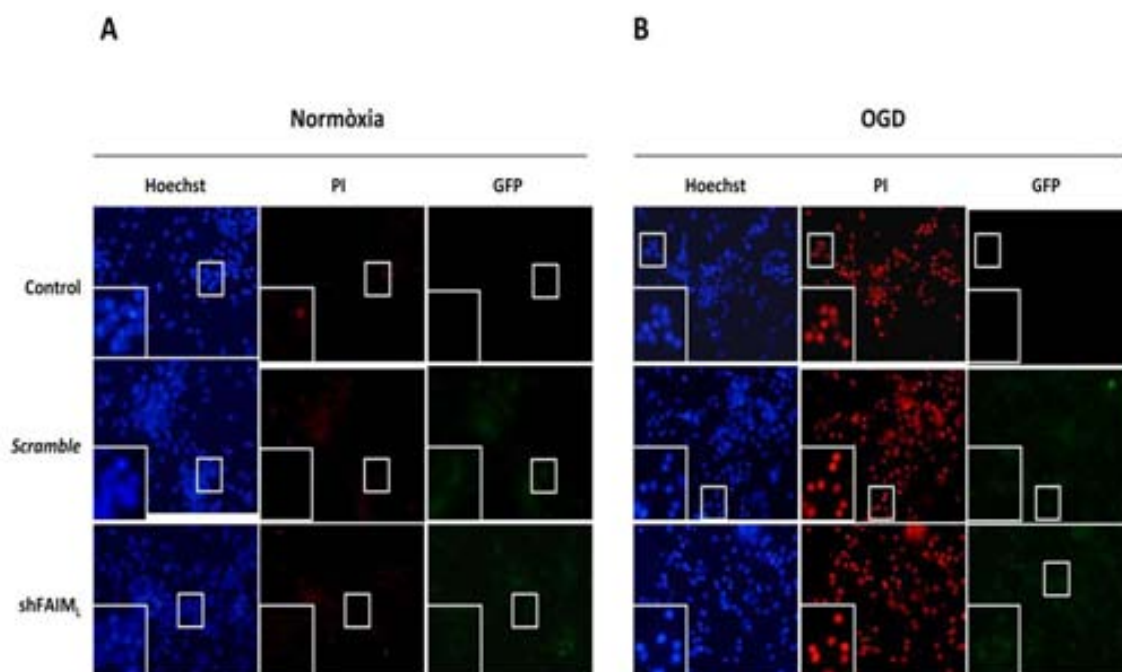


Figura 4.17. Tinció fluorescent amb Hoechst 33258 i PI amb el silenciament de FAIM_L. Cèl·lules control sense infectar, infectades amb el lentivirus *scramble* i shFAIM_L i marcades amb PI i Hoechst 33258 a les 24h de l'OGD (B) i la normòxia (A).

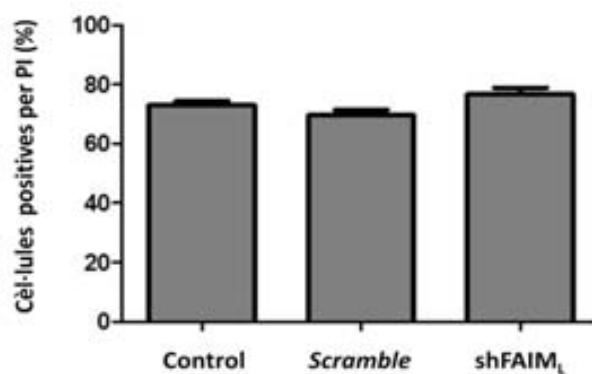


Figura 4.18. Quantificació de cèl·lules PI positives amb l'shFAIM_L en l'OGD. Quantificació de les cèl·lules PI positives respecte el total marcades amb Hoechst 33258. Control: cèl·lules no infectades; Scramble: cèl·lules infectades amb el lentivirus *scramble*; shFAIM_L: cèl·lules infectades amb el lentivirus amb l'shRNA de FAIM_L. Resultats expressats com % ± SEM; n=3.

4.5. SOBREPRESSIÓ DE FAIM_L EN L'OGD

Un cop realitzat l'estudi del silenciament de l'expressió de FAIM_L, es va procedir a estudiar la implicació d'aquesta proteïna en la mort induïda per l'OGD mitjançant la seva sobreexpressió. En la mateixa línia que els experiments de silenciament, es van generar vectors lentivirals amb la seqüència de FAIM_L i de GFP per sobreexpressar la proteïna. En aquest cas, pel control d'infecció es van generar lentivirus amb el vector buit, és a dir, sense FAIM_L però amb la proteïna GFP. D'entrada, es va comprovar la sobreexpressió de FAIM_L realitzant la infecció en la línia cel·lular PC12. Els nivells de FAIM_L s'analitzaren en extractes obtinguts 48 hores després de l'infecció a través de la tècnica de Western Blot.

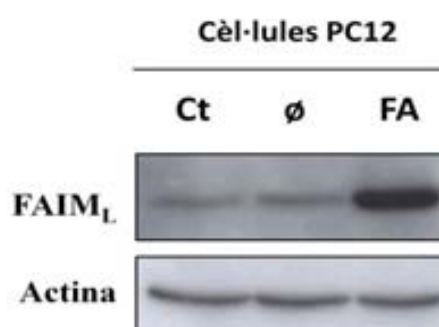


Figura 4.19. Sobreexpressió de FAIM_L en cèl·lules PC12. Western-blot de FAIM_L en cèl·lules PC12. Llissats realitzats a les 48 hores post-infecció amb lentivirus amb el plàsmid buit pWPI-GFP (∅) i amb el plàsmid de sobreexpressió pWPI-FAIM_L-GFP (FA) i el control sense infectar (ct).

Tal i com es pot observar en la figura 19, els nivells de FAIM_L eren superiors en les cèl·lules infectades amb el lentivirus de FAIM_L (FA) respecte a les infectades amb el lentivirus buit (\emptyset) i a les cèl·lules control sense infectar (ct).

Un cop comprovada l'eficàcia dels lentivirus en la sobreexpressió de FAIM_L, es va procedir a realitzar l'infecció en els cultius corticals mixtes. De forma similar als experiments de silenciament, l'infecció es va realitzar als 4 DIV i la sobreexpressió de la proteïna es va analitzar als 12 DIV. De la mateixa manera que en les cèl·lules PC12, els nivells d'expressió de FAIM_L eren superiors en les cèl·lules dels cultius infectats amb FA que en les infectades amb el vector buit i en les cèl·lules control sense infectar (Fig. 20A). En paral·lel, també es va analitzar als 12 DIV l'estat de les cèl·lules mitjançant un assaig de viabilitat cel·lular a través de la tècnica de reducció del MTT en les diferents condicions infectives (Fig. 20B). D'aquesta manera, es pretenia descartar possibles efectes de citotoxicitat derivats del procés d'infecció abans de procedir a l'estudi de mort induït per l'OGD. Tal i com es pot observar a la figura 20B, els percentatges de viabilitat cel·lular obtinguts en les diferents condicions d'infecció amb els lentivirus no disminuïen significativament respecte al control de les cèl·lules no infectades (Fig. 20B).

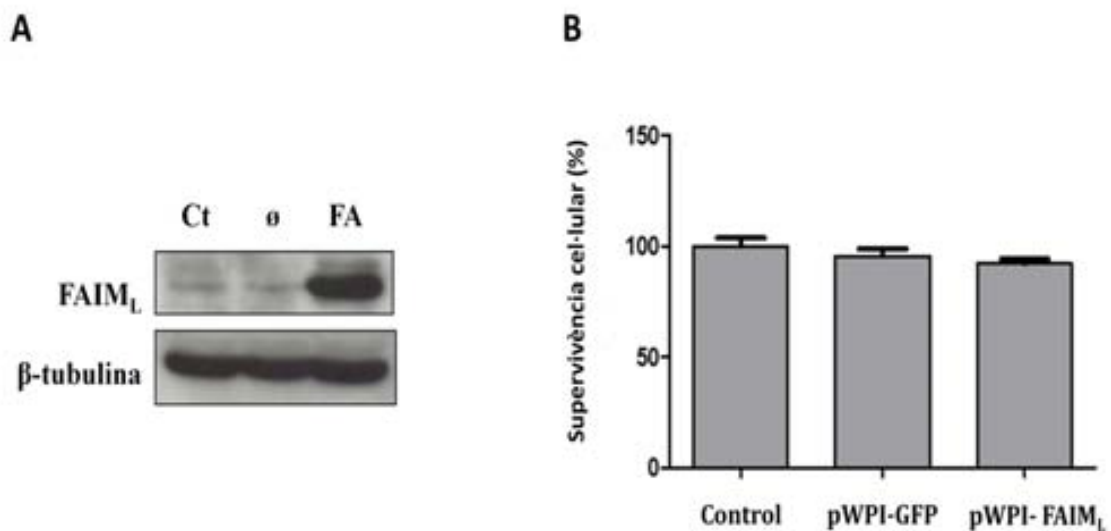


Figura 4.20. Sobreexpressió de FAIM_L en cultius corticals mixtes. A) Western-blot de FAIM_L en cultius corticals mixtes infectats amb el lentivirus amb el plàsmid buit pWPI-GFP (\emptyset) i amb la seqüència de FAIM_L pWPI-FAIM_L-GFP (FA) i el control sense infectar (ct). B) Assaig de viabilitat per MTT de cèl·lules

sense tractar de 12 DIV control, i infectades amb el lentivirus pWPI-GFP i pWPI-FAIM_L-GFP. Resultats normalitzats respecte el control i expressats com la mitjana \pm SEM; n=3.

Posteriorment, es va analitzar el percentatge d'infecció a partir del comptatge de les cèl·lules positives per GFP respecte les totals tenyides amb Hoechst 33258 (Fig. 21). El percentatge d'infecció obtingut en les cèl·lules infectades amb el lentivirus de FAIM_L va ser aproximadament del 60 % i similar als obtinguts amb els experiments de silenciament de la proteïna (Figs. 21 i 15B). Un cop vist el percentatge d'infecció vam voler determinar en quina població cel·lular dels nostres cultius mixtes estàvem sobreexpressant FAIM_L. Degut al percentatge i a les imatges de GFP i Hoechst 33258 semblava clar que les neurones estaven infectades per tant vam voler esbrinar si passava el mateix amb els astròcits. Per fer-ho vam realitzar diferents immunocitoquímiques utilitzant la proteïna GFAP com a marcador glial (Fig. 22B i 22D). Tal i com es pot observar a la figura 22B i 22D, els vectors lentivirals tant amb el vector buit (Fig. 22B) com amb la seqüència de FAIM_L (Fig. 22D) no eren capaços d'infectar la glia, ja que no s'observava solapament en el marcatge amb GFAP i GFP. En paral·lel, i per tal de veure si les cèl·lules infectades sobreexpressaven FAIM_L, es va analitzar els nivells de FAIM i GFP en les cèl·lules infectades amb el vector buit i amb FAIM_L per immunocitoquímica (Fig. 22A i 22C). Tal i com s'observa a la figura 22A i 22C, les cèl·lules infectades amb el lentivirus de FAIM_L sobreexpressaven la proteïna respecte el control d'infecció amb el vector buit, en un mateix temps d'exposició, i la senyal coincidia amb la de la GFP.

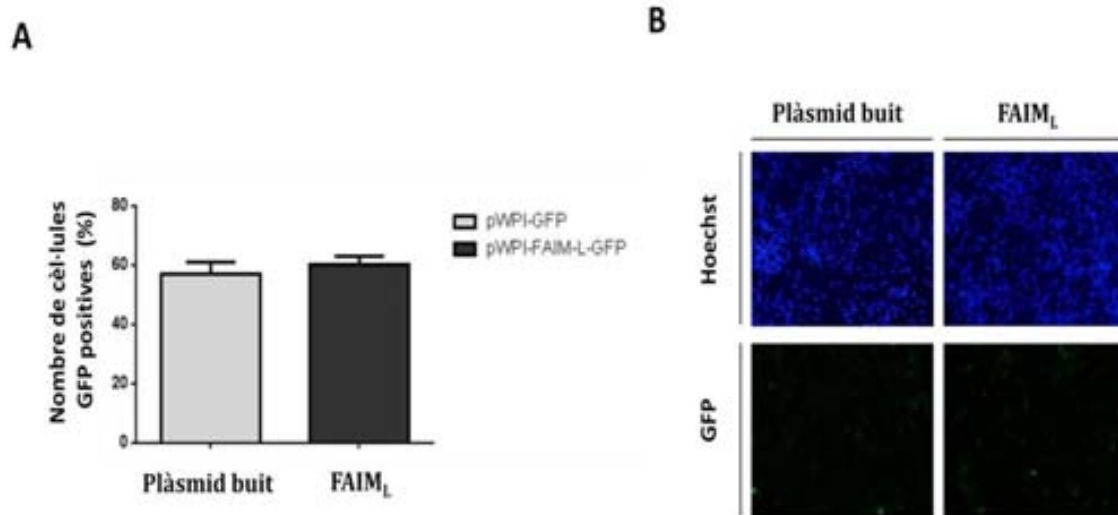


Figura 4.21. Quantificació de l'infeció amb els lentivirus de sobreexpressió de FAIM_L. A) Quantificació del percentatge d'infeció amb el lentivirus buit pWPI-GFP (plàsmid buit) i el de sobreexpressió de FAIM_L pWPI-FAIM_L-GFP representat com a cèl·lules GFP positives respecte les totals tenyides amb Hoechst 33258. Resultats expressats com a % ± SEM; n=3. B) Tinció fluorescent amb Hoechst en cultius corticals infectats amb el lentivirus pWPI-GFP i pWPI-FAIM_L-GFP.

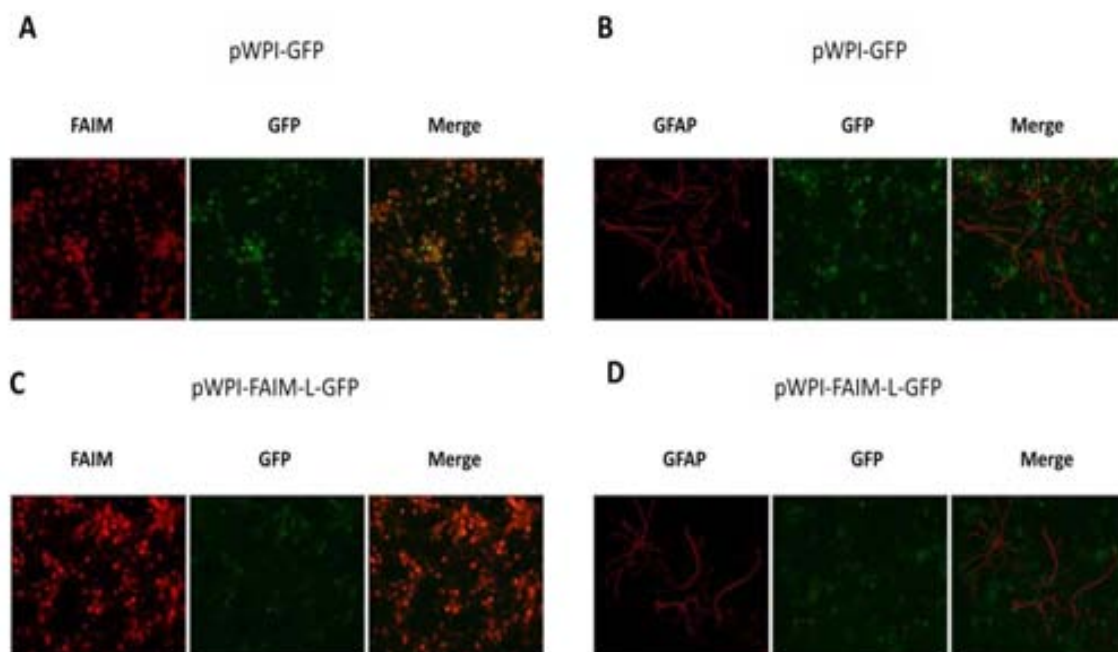


Figura 4.22. Immunocitoquímica de cultius infectats amb el lentivirus de FAIM_L. A) Immunocitoquímica de FAIM (vermell) en cultius corticals mixtes infectats amb el lentivirus buit pWPI-GFP. B) Immunocitoquímica de GFAP (vermell) en cultius corticals mixtes infectats amb el lentivirus buit pWPI-GFP. C) Immunocitoquímica de FAIM en cultius infectats amb el lentivirus de sobreexpressió pWPI-FAIM_L-GFP. D) Immunocitoquímica de GFAP (vermell) en cultius corticals infectats amb el lentivirus de sobreexpressió pWPI-FAIM_L-GFP.

Un cop comprovada la sobreexpressió de FAIM_L i descartats els possibles efectes de citotoxicitat derivats del procés d'infecció, vam realitzar les OGD's en les cèl·lules control i en les infectades amb el lentivirus buit i amb el de FAIM_L. Posteriorment, es va examinar la viabilitat cel·lular d'aquestes cèl·lules a les 24 hores de la OGD mitjançant la tècnica de reducció del compost MTT i la quantificació de mort cel·lular a través del comptatge dels nuclis positius per la tinció amb PI respecte als totals tenyits amb Hoechst 33258 (Figs. 21 i 23). Tal i com es pot observar a la figura 21, no vam detectar diferències significatives en els percentatges de supervivència cel·lular obtinguts en les condicions d'OGD de les cèl·lules control i de les infectades amb el lentivirus buit o amb el de FAIM_L (Fig. 21). En concordança amb l'assaig de viabilitat, tampoc es van veure diferències considerables entre els percentatges de mort obtinguts en les cèl·lules control i les infectades amb el lentivirus buit i FAIM_L, 24 hores després de sotmetre les cèl·lules a l'OGD (Fig.23). Per altre banda, la tinció amb PI i Hoechst 33258 també ens va permetre dur a terme un anàlisi morfològic en les diferents condicions de normòxia i d'OGD estudiades (Fig. 22). Tal i com es pot observar a la figura 22, les cèl·lules que sobreexpressaven FAIM_L van mostrar una morfologia nuclear caracteritzada per una alta condensació de la cromatina similar a la de les cèl·lules control i a la de les cèl·lules infectades amb el lentivirus buit, 24 hores després de ser sotmeses a l'OGD (Fig. 22).

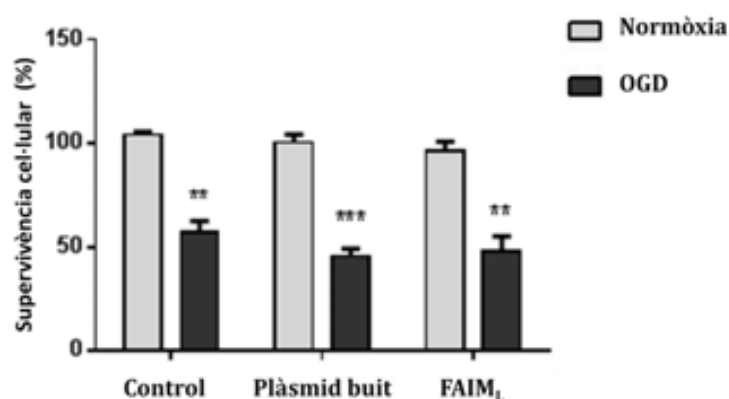


Figura 4.23. Assaig de viabilitat en l'OGD amb la sobreexpressió de FAIM_L. Assaig de supervivència cel·lular MTT a les 24 hores de l'OGD en cèl·lules control i infectades amb el lentivirus buit pWPI-GFP i el lentivirus de sobreexpressió pWPI-FAIM_L-GFP. Resultats normalitzats respecte la normòxia control i

expressats com % \pm SEM; n=3. *p<0,05 denota significància respecte la normòxia en cada condició (two-way ANOVA seguida de Bonferroni i t-test per cada condició).

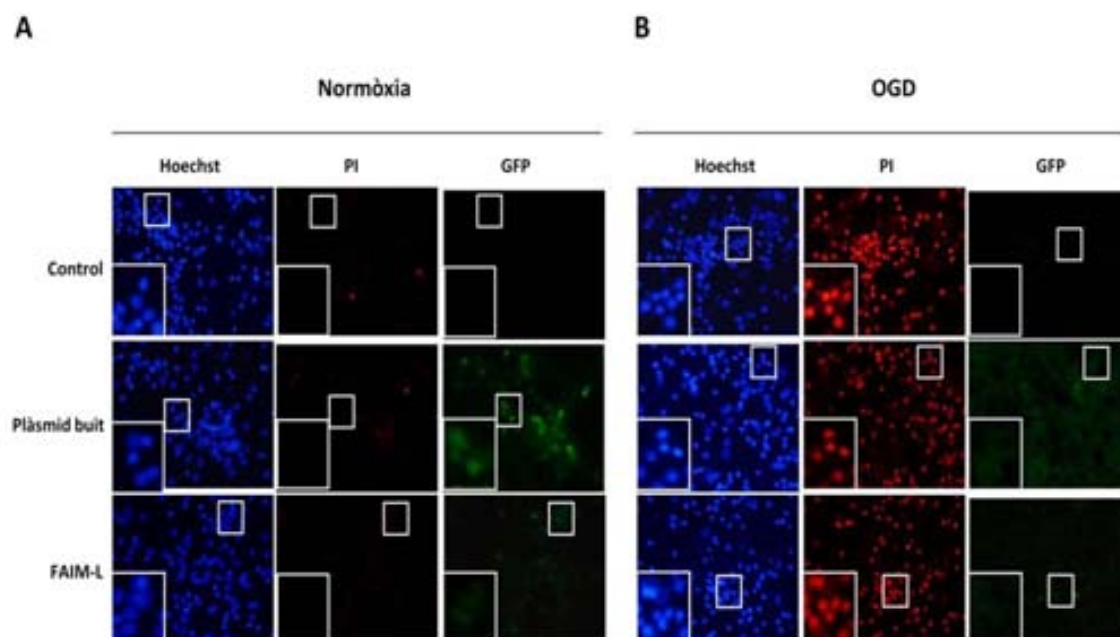


Figura 4.24. Tinció fluorescent amb Hoechst 33258 i PI en l'OGD amb la sobreexpressió de FAIM_L. Tinció de hoechst i PI en cèl·lules control i infectades amb el lentivirus buit i amb la seqüència de FAIM_L i fixades a les 24 h de 75 minuts de normòxia (A) o OGD (B).

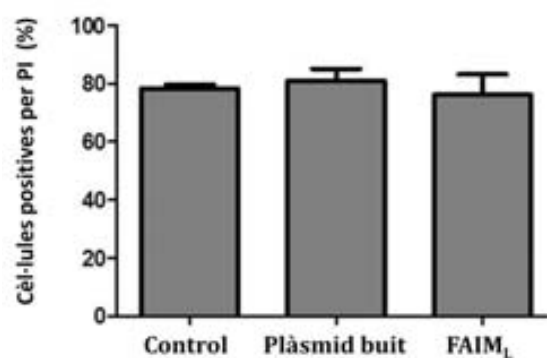


Figura 4.25. Quantificació de cèl·lules PI positives en l'OGD amb la sobreexpressió de FAIM_L. Cèl·lules PI positives respecte el total marcades amb Hoechst 33258. Control: cèl·lules sense infectar; Plàsmid buit: cèl·lules infectades amb el lentivirus pWPI-GFP; FAIM_L: cèl·lules infectades amb el lentivirus de sobreexpressió pWPI-FAIM_L-GFP. Resultats expressats com % \pm SEM; n=3.

Els resultats obtinguts fins ara indicaven que la sobreexpressió de FAIM_L no era capaç de restablir la viabilitat cel·lular a les 24 hores de l'OGD. No obstant, ens vam plantejar si l'increment d'expressió de FAIM_L estava modulant l'activació de les caspases en les primeres hores després de l'OGD, tot i no veure diferències a les 24 hores. Es per això

que es va procedir a estudiar l'activació de la caspasa efectora caspasa-3 en les cèl·lules sobreexpressores de FAIM_L en diferents temps posteriors a l'OGD. En concret, es van examinar els nivells de fragment actiu de la caspasa-3, p17, a les 3 i 6 hores després de l'OGD en les cèl·lules control i en les infectades amb el lentivirus buit i amb el lentivirus de FAIM_L (Fig.24). Tal i com es pot observar en la figura 24, vam detectar el fragment actiu de caspasa-3 mitjançant la tècnica de Western-Blot a les 3 i 6 hores posteriors a l'OGD en les cèl·lules que sobreexpressaven FAIM_L, així com en les cèl·lules infectades amb el lentivirus control i les no infectades. Posteriorment, es va realitzar la normalització dels nivells del fragment actiu de caspasa-3 respecte el control de càrrega avaluat amb la proteïna tubulina en les diferents condicions. Els resultats es mostren normalitzats respecte la normòxia en cada condició (Fig. 24). Aquesta normalització va indicar uns nivells de caspasa-3 superiors en les cèl·lules control respecte els obtinguts en les cèl·lules infectades amb lentivirus buit o el de FAIM_L, tant a les 3h com a les 6h posteriors a l'OGD (Fig. 24). Per tant, no podem parlar d'un efecte específic pel lentivirus de sobreexpressió de FAIM_L. Tenint en compte aquestes dades, la sobreexpressió de FAIM_L no disminueix el processament de la caspasa-3 en les mostres d'OGD respecte la normòxia.

En conjunt, els resultats determinen que la sobreexpressió de FAIM_L no evita la mort provocada l'OGD i que, per tant, FAIM_L no sembla tenir un efecte neuroprotector en la citotoxicitat induïda en aquest model d'isquèmia. A més, l'increment en l'expressió de FAIM_L no altera el tipus de mort analitzada en aquest model, almenys a nivell de morfologia nuclear i activació de caspasa-3, ja que l'increment d'expressió de FAIM_L no és capaç d'inhibir la morfologia nuclear apoptòtica ni el processament de la caspasa-3 al seu fragment actiu en la mort induïda per l'OGD.

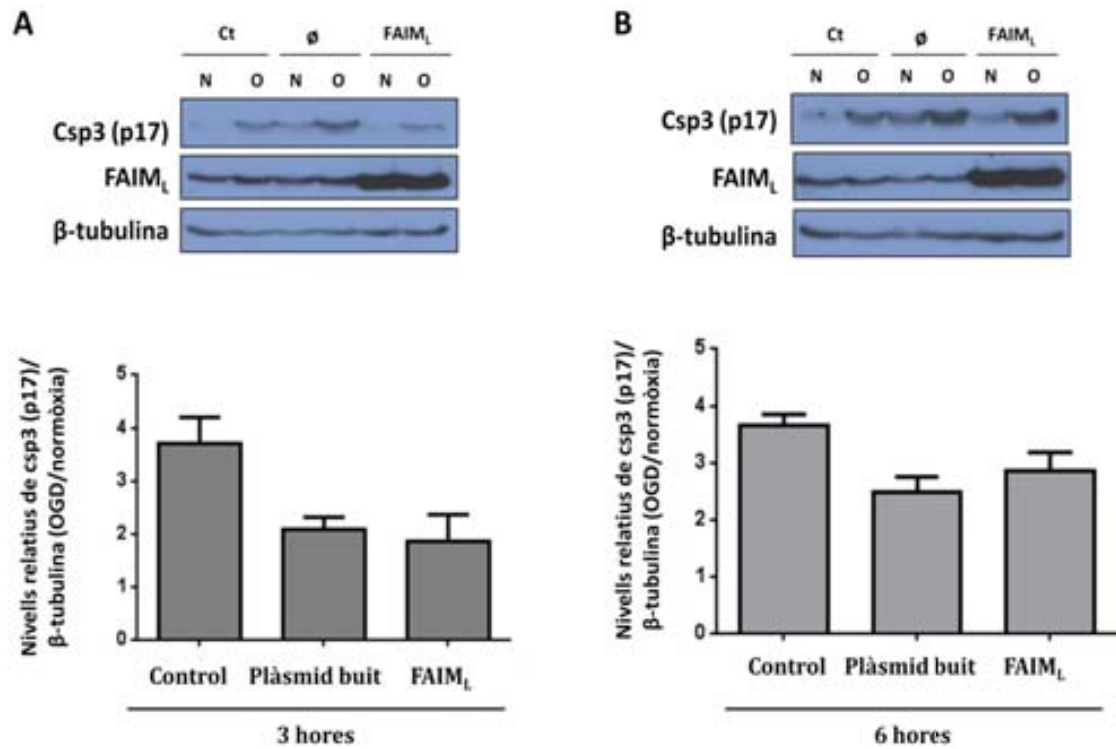


Figura 4.26. Nivells de caspasa-3 activa (p17) en l'OGD amb la sobreexpressió de FAIM_L. Western-blot del fragment actiu de la caspasa-3 (p17) i FAIM_L a les 3h (A) i 6h (B) de l'OGD en cèl·lules control i infectades amb el lentivirus buit (ϕ) i el lentivirus de sobreexpressió de FAIM_L. Resultats normalitzats respecte el control de càrrega i expressats com la mitjana respecte la normòxia en cada condició ± SEM; n=3.

5. DISCUSSIÓ

DISCUSSIÓ

L'ictus es defineix com una interrupció o disminució del flux sanguini al cervell. La falta de reg sanguini al cervell provoca un desequilibri dels gradients iònics, la Producció de radicals lliures i una resposta inflamatòria que duen a la mort de les neurones (Dirnagl, Iadecola et al. 1999; Lo, Dalkara et al. 2003). Actualment l'únic medicament aprovat és el trombolític tPA, el qual només es pot aplicar durant les primeres 4.5 hores després de l'ictus (Hacke, Kaste et al. 2008) sota un elevat risc de hemorràgia intracerebral si s'aplica amb posterioritat (Lees, Bluhmki et al. 2010). Al principi es creia que la mort isquèmica era únicament de tipus necròtic (Brown and Brierley 1972) mentre que ara se sap que l'apoptosis també hi juga un paper (Goldberg and Choi 1990; Linnik, Zobrist et al. 1993; MacManus, Buchan et al. 1993). Es creu que la mort necròtica esdevé en la zona del core de la lesió en qüestió de minuts, mentre en la zona de penombra, on la irrigació és major, les cèl·lules moren per apoptosis en un procés que pot durar dies. El gran impacte socioeconòmic dels accidents cerebrovasculars, l'estreta finestra terapèutica del tPA i d'implicació d'una mort programada dil·latada en el temps, han fet que es posin molts esforços en la búsqueda d'una teràpia neuroprotectora per salvar la zona de penombra.

Per fer aquest estudi hem utilitzat un model de privació d'oxigen i glucosa (OGD) en cultius corticals mixtes de rata. Prèviament en el nostre laboratori s'havia observat que en aquest model un 50% de la mort és deguda a l'apoptosis i que implica l'activació de les caspases 3, 7 i 9 en neurones i microglia (Malagelada, Xifro et al. 2005). A més, es va veure que l'inhibició de la caspasa-8 reduïa la mort induïda per l'OGD i que la citoquina TNF α era alliberada durant l'OGD i participava de la mort apoptòtica a través del receptor TNFR1 i l'activació de les caspases 8 i 3 (Badiola, Malagelada et al. 2009). Altres treballs previs també han demostrat que l'OGD indueix altres tipus d'esdeveniments cel·lulars, tals com l'estrès del RE (reticle endoplasmàtic) a través de l'activació de PERK (*RNA-activated protein kinase-like ER resident kinase*), IRE1 (*inositol-requiring kinase*) i caspasa-12 (Badiola, Penas et al. 2011).

En un primer moment es van realitzar una sèrie d'experiments per tal de confirmar el model establert en el laboratori. Es van realitzar OGD's de diferents durades i es va

analitzar la viabilitat cel·lular per MTT a les 24 hores. Es va observar que en OGD's de 75 i 90 min la supervivència cel·lular era del 50%. En canvi, exposicions de 30 minuts d'OGD no eren suficients per induir mort en els cultius. Esta descrit en la literatura exposicions subletals de 30 minuts d'OGD en cultius corticals (Sheng, Liu et al. 2012). En aquests experiments preliminars també es va analitzar la morfologia apoptòtica mitjançant la tinció amb Hoechst 33258 i PI. Es va veure que a les 24 hores de l'OGD la gran majoria de neurones presentaven condensació de la cromatina i eren PI positives. I ja a les 3 hores de l'OGD es podia observar un augment de caspasa-3 activa. Per altre banda, aquesta condensació de la cromatina no s'observava en els astròcits, el nuclis dels quals permaneixien laxos. Aquest fet està en concordança amb la literatura, ja que s'ha descrit que es necessiten períodes d'almenys 4 hores d'OGD per provocar mort glial (Goldberg and Choi 1993). També es va realitzar experiments pretractant amb MK-801, un inhibidor no competitiu dels receptors d'NMDA. El tractament amb aquest inhibidor redueix notablement la mort induïda per l'OGD. Tot i que clàssicament l'MK-801 s'ha utilitzat per desenmascarar l'apoptosis de la necrosis, està descrit que segons el grau d'activació del receptor NMDA és pot produir una o l'altre (Ankarcrona, Dypbukt et al. 1995). A més, el bloqueig dels receptors NMDA s'ha vist que inhibeix l'expressió de TNF α en un model d'isquèmia focal (Jander, Schroeter et al. 2000).

Tenint en compte els resultats previs obtinguts en el grup sobre l'implicació del lligant de mort TNF α , vam decidir aprofundir més sobre els mecanismes implicats en la mort induïda per l'OGD analitzant el paper dels antagonistes dels receptors de mort en aquest model. Per aquesta raó, es va examinar l'expressió de quatre antagonistes (XIAP, IAP2, FLIP_L i FAIM_L), els quals se sap que inhibeixen en algun nivell la via de senyalització activada pels receptors de mort.

L'XIAP és una proteïna que s'expressa en neurones, forma part de la família de la IAP's i es capaç d'inhibir de manera directe les caspases 3, 7 i 9 (Chai, Shiozaki et al. 2001; Riedl, Renatus et al. 2001; Shiozaki, Chai et al. 2003). La traducció del mRNA d'XIAP està mediada per una seqüència IRES (del anglès, *Internal ribosome entry site*). Això permet la traducció del missatger en condicions d'estrès cel·lular, quan la majoria del síntesis proteica s'inhibeix (Holcik 2003). L'expressió d'XIAP, així com també la de IAP2 i FLIP, és dependent del factor de transcripció NF- κ B (Dubrez-Daloz, Dupoux et al.

2008). Esta descrit, en un model d'isquèmia global transitòria per oclusió de 2 vasos, un augment dels nivells d'XIAP amb un pic a les 24 hores a la zona CA1 de l'hipocamp. En aquest estudi, l'augment d'XIAP es correlaciona en el temps amb una disminució de caspasa-3 activa (Siegelin, Kossatz et al. 2005). En un altre estudi amb mostres humanes d'infants es detecta un augment dels nivells d'XIAP respecte el control no isquèmic. I en el mateix estudi, en un model d'isquèmia focal en rates, detecten un augment dels nivells d'XIAP en la zona de penombra a partir de les 24 hores fins als 7 dies post-infart (Askalan, Salweski et al. 2009). Per altre banda i en direcció contrària, també esta descrit, en un model d'isquèmia focal en ratolins, una disminució dels nivells de la proteïna a les 6 hores respecte el control no isquèmic (Siegel, Li et al. 2010). En el nostre model no vam observar canvis significatius en l'expressió d'XIAP al llarg de les primeres 24 hores després de l'OGD, ni entre la normòxia i l'OGD en cada temps. De forma similar, tampoc vam observar canvis significatius en els nivells de missatger. Així doncs, en el nostre model no observem una correlació directe entre els nivells d'XIAP i els de la caspasa-3 activa, ja que aquesta última augmenta de manera semblant en les mostres d'OGD respecte la normòxia mentre l'XIAP no varia.

L'IAP2 també és una proteïna de la família de les IAP's capaç d'unir-se a les caspases i causar-ne la seva inhibició. La seva expressió és dependent de NF- κ B i esta implicada en l'activació d'aquest factor de transcripció a través dels receptors TNFR1 i 2 (Eckelman and Salvesen 2006; Mahoney, Cheung et al. 2008). NF- κ B és un factor de transcripció que actua com a regulador central de la resposta inflamatòria. És necessari per l'inducció de diferents mediadors proinflamatoris implicats en l'immunitat innata com mol·lècules d'adhesió (p.ex.: ICAM, VCAM) i citoquines (p.ex.: IL-2, TNF- α , etc..)(Harari and Liao 2010). El seu paper en l'isquèmia cerebral, però, no està clar. Mentre, en models d'isquèmia *in vivo*, molts dels compostos amb efecte neuroprotector actuen disminuint l'activitat NF- κ B (Dong, Qiao et al. 2013; Egashira, Suzuki et al. 2013; Castri, Lee et al. 2014), també s'ha observat el cas contrari (Valerio, Dossena et al. 2009). Per altre banda, l'ús de ratolins *knock-out* per les subunitats de NF- κ B p50 (Duckworth, Butler et al. 2006; Li, Lu et al. 2008) o cRel (Valerio, Dossena et al. 2009) tenen una major neurodegeneració i volum d'infart respecte els control. També esta descrit que el silenciament de cIAP2 fa sensibles diferents línies cel·lulars canceroses a

l'administració de diferents compostos quimioteràpics a través de TNF α i caspasa-8 (Bavykin, Korotaeva et al. 2013; Ramakrishnan, Painuly et al. 2014; Wu, Shi et al. 2014). I el mateix s'observa amb l'ús d'inhibidors de les IAP's (Varfolomeev, Blankenship et al. 2007). La literatura també recull un augment de l'activitat d'NF- κ B i de l'expressió d'IAP2 a les quatre hores després de l'OGD en cèl·lules endotelials de cervell (Yin, Chen et al. 2002). En el nostre model d'isquèmia vam observar una reducció dels nivells de cIAP2 a partir de les 6 hores després de l'OGD respecte als controls de normòxia. El fet que els nivells de missatger no variïn implica que el missatger no es tradueix o que hi ha una degradació de la proteïna. Està descrit, en cèl·lules de glioblastoma, que la presència d'XIAP estabilitza cIAP2 i n'evita la degradació. Aquesta unió es realitza a través del domini BIR2 de cIAP2 el qual s'uneix al domini RING de XIAP (Yang, Cooke et al. 2014). El trencament de l'unió entre XIAP i cIAP2 degut a la presència de la caspasa-3 activa, la qual s'uneix també al domini BIR2, podria explicar la desestabilització i posterior degradació de cIAP2 en l'OGD. El fet és que la degradació tardana de cIAP2 pot ser un dels mecanismes que contribueixen a la mort apoptòtica en l'OGD. I, degut a que la poca literatura que relaciona cIAP2 amb l'isquèmia esta enfocada al preconditionament isquèmic, seria interessant veure l'efecte de la seva sobreexpressió en l'OGD. En aquest sentit, resultats preliminars del laboratori indiquen resultats positius en aquesta direcció.

FLIP és capaç d'inhibir l'activació de la caspasa-8 a través dels receptors de mort TNFR1, FasR i TRAIL mitjançant la unió a FADD (Safa, Day et al. 2008) (apartat 6.1 de l'introducció). FLIP_L, a més, pot formar heterodimers amb la caspasa-8 en el DISC (complex d'inducció de mort) i ser proteolitzat a la forma p43, la qual s'ha observat que és capaç d'activar NF- κ B i ERK (Kataoka and Tschopp 2004). Per altre banda, està descrit que la seva degradació és dependent de la proteïna quinasa JNK (*Jun kinase*), la qual pot induir la degradació de FLIP_L per via proteosomal a través de la ubiquitina lligasa Itch (Chang, Kamata et al. 2006). Hi ha pocs treballs en la literatura que vinculin FLIP i la mort neuronal induïda en isquèmia. En el més representatiu, s'observa que la sobreexpressió de FLIP_L disminueix el volum d'infart en un model *in vivo* i protegeix contra la mort induïda per la privació de glucosa però no contra la privació conjunta d'oxigen i glucosa de l'OGD (Taoufik, Valable et al. 2007). En el nostre model,

observem una degradació de FLIP_L i de la seva forma processada p43 en les cèl·lules sotmeses a OGD només retornar el medi condicionat. En normòxia també detectem el processament de FLIP_L però no hi ha degradació de la proteïna ni del fragment p43 dintre de les 24 hores posteriors a l'OGD. El fet que els nivells de missatger es mantinguin constants suggereix un procés de degradació proteica, probablement pel mecanisme prèviament esmentat. Tenint en compte el conjunt de dades analitzades respecte a FLIP_L, la degradació de la forma processada p43 pot ser important en la mort induïda per l'OGD ja que podria causar una disminució o inhibició de l'activitat de vies de senyalització implicades en la supervivència cel·lular com NF-κB o ERK. En aquest sentit, està descrit que en cèl·lules amb baixa o nul·la activitat NF-κB, l'activació dels receptors TNFR1 duen a l'inducció del complex II i la mort apoptòtica (Papa, Zazzeroni et al. 2004) (Apartat 5.2 de l'introducció). Mentre que, si durant la formació del complex I, s'ha activat de forma robusta NF-κB, l'expressió de proteïnes com FLIP o IAP2, entre d'altres, prevenen el processament complet de la caspasa-8 i l'inhibició de l'apoptosis (Thome and Tschopp 2001). Per altre banda, la degradació de FLIP_L que detectem en les cèl·lules sotmeses a OGD també ens podria suggerir un increment de l'activitat de JNK durant aquest procés de mort neuronal. De fet, el paper de JNK està àmpliament descrit en isquèmia, i la seva inhibició ha demostrat neuroprotecció en diferents models *in vivo* (Kuan and Burke 2005; Borsello and Forloni 2007). En qualsevol cas, la degradació de FLIP_L immediatament després de l'OGD i de cIAP2 de manera més tardana pot estar afavorint l'activació de la caspasa-8 i el desencadenament de la mort apoptòtica.

FAIM_L s'expressa en neurones i es capaç d'inhibir la mort causada per TNFα i FasL. Els nivells de FAIM_L durant la diferenciació neuronal estan regulats per NGF (*Nerve Growth Factor*) a través de la via d'ERK (Segura, Sole et al. 2007). I a diferència de la forma curta, FAIM_L no és capaç d'activar NF-κB (Segura, Sole et al. 2007). Malgrat l'existència de literatura sobre l'implicació de FAIM_L en la mort apoptòtica induïda pels receptors de mort, no hi ha treballs previs que relacionin FAIM_L amb la mort isquèmica. En el nostre model observem un augment de FAIM_L a les tres hores respecte la normòxia, i posteriorment una recuperació dels nivells inicials. Per altre banda, trobem que aquest increment és depenent de la via d'ERK1/2 ja que el

tractament amb PD098059, un inhibidor d'aquesta via, n'aboleix la pujada. De fet, s'ha descrit un augment dels nivells d'ERK1/2 fosforilada en cèl·lules PC12 sotmeses a OGD i no en normòxia que s'acaba perdent durant la reperfusió o retorn del medi condicionat (Tabakman, Jiang et al. 2005). Tenint en compte aquestes dades i la regulació descrita dels nivells de FAIM_L per la via d'ERK durant la diferenciació neuronal, podríem suggerir que una activació transitòria d'aquesta cinasa durant el període de privació podria explicar l'augment de FAIM_L que observem a les 3 hores de l'OGD. Per altre banda, s'ha descrit recentment que FAIM_L necessita la presència de XIAP per realitzar la seva funció antiapoptòtica (Moubarak, Planells-Ferrer et al. 2013). En concret, s'ha vist FAIM_L requereix de XIAP per protegir les neurones corticals i les cèl·lules PC12 de la mort induïda per FasL (Moubarak, Planells-Ferrer et al. 2013). En el mateix treball, es descriu que FAIM_L s'uneix al domini BIR2 de XIAP a través d'un domini IBM (*IAP binding motif*) i l'estabilitza evitant la seva autoubiquitinació (Moubarak, Planells-Ferrer et al. 2013). Aquesta estabilització de FAIM_L sobre XIAP podria també estar succeint en el nostre model, ja que detectem els nivells d'XIAP pràcticament constants al llarg dels diferents temps posteriors a l'OGD. Tot i així, el manteniment dels nivells endògens de FAIM_L i XIAP no són suficients per protegir els cultius de la mort induïda per l'OGD. Tenint en compte aquest anàlisi i la manca d'estudis de FAIM_L en el context isquèmic, a continuació discutirem els resultats obtinguts en l'estudi de l'implicació de FAIM_L en la mort provocada per l'OGD a través dels experiments fets de silenciament i sobreexpressió d'aquest antagonista.

Està descrit que el silenciament de FAIM_L fa sensible la línia cel·lular PC12 a l'apoptosis induïda per FasL (Moubarak, Planells-Ferrer et al. 2013). En el cas d'un altre antagonista com FLIP_L, el seu silenciament no augmenta la mort en un model de privació de glucosa en neurones (Taoufik, Valable et al. 2007). En el nostre cas, no hem observat diferències significatives en la mort induïda per l'OGD amb el silenciament de FAIM_L respecte als controls. Tan sols s'arriba a detectar un increment molt subtil dels percentatges de mort assolits en l'OGD en les cèl·lules on s'ha silenciat l'expressió FAIM_L respecte als controls d'infecció i de cèl·lules sense infectar, segons el comptatge de cèl·lules positives per iodur de propidi. Aquestes mínimes diferències podrien ser degudes a que s'ha arribat a un màxim de mort apoptòtica en les neurones, on la

viabilitat cel·lular observada pot ser en part deguda a la glia. Així ho indica també els alts percentatges de mort observats en les cèl·lules control en el comptatge de cèl·lules positives per iodur de propidi.

El fet que, en el nostre model d'OGD, es demostrés l'implicació de les caspases i de la via TNF α -TNFR1-Caspasa-8 en la mort apoptòtica (Badiola, Malagelada et al. 2009) i que FAIM_L fos capaç d'inhibir aquesta via en cultius corticals tractats amb TNF α així com d'unir-se i inhibir també la via de FasR (Segura, Sole et al. 2007) ens va fer pensar que la seva sobreexpressió podria tenir un efecte neuroprotector. Tot i això, alhora de realitzar els experiments, no vam observar diferències en la viabilitat cel·lular ni en la quantificació de la mort cel·lular a través del comptatge de nuclis positius per la tinció amb iodur de propidi. nombre de nuclis condensats, així com tampoc una disminució en els nivells de caspasa-3 activa. Com s'ha comentat, s'ha descrit recentment que FAIM_L estableix XIAP i que per tant la seva sobreexpressió podria ser útil en les patologies on XIAP es veïés degradada (Moubarak, Planells-Ferrer et al. 2013). Aquest no és el nostre cas, ja que XIAP es manté constant després de l'OGD. Els nostres resultats però indiquen que FAIM_L no és capaç d'inhibir TNFR1 en l'OGD, ni potser tampoc FasR, tot i que aquest últim no ha estat implicat directament en el nostre model. Si així fos, es veuria un increment de viabilitat semblant a l'observada amb l'inhibidor de la caspasa-8 (Badiola, Malagelada et al. 2009). A més, si FAIM_L i XIAP també exerceixen la seva funció antiapoptòtica per sota Bax i per tant després de l'alliberament dels factors proapoptòtics mitocondrials i les neurones corticals es comporten com cèl·lules tipus II (Moubarak, Planells-Ferrer et al. 2013), on l'activació dels receptors de mort no és suficient per causar apoptosi si no que necessiten també de l'activació de la via intrínseca, llavors FAIM_L i XIAP conjuntament tampoc són capaços d'inhibir la mort induïda per l'OGD en aquest nivell. Aquest fet es podria explicar per l'unió de proteïnes proapoptòtiques mitocondrials a XIAP de manera que impedisin el seu efecte antiapoptòtic però d'alguna manera no la degradessin, potser per l'unió amb FAIM_L. Diverses proteïnes d'origen mitocondrial com HtrA2/Omi s'uneixen al domini BIR2 d'XIAP a través d'un domini IBM (*IAP binding motif*), de la mateixa manera que FAIM_L, però tenen una funció contrària, antagonitzant el seu efecte antiapoptòtic (Verhagen, Kratina et al. 2007; Moubarak, Planells-Ferrer et al.

2013). Una d'aquestes proteïnes d'origen mitocondrial és HtrA2/Omi, sobre la qual s'ha descrit un augment en un model d'OGD en cèl·lules endotelials (Han, Tao et al. 2011). A més, el fet que XIAP no sigui capaç d'estabilitzar IAP2 i per tant segurament d'unir-s'hi ens pot estar indicant que XIAP pot estar segregada per altres proteïnes, i no pot realitzar de manera correcta la seva funció antiapoptòtica.

6. CONCLUSIONS

CONCLUSIONS

L'exposició dels cultius corticals mixtes a 75 o 90 minuts d'OGD redueix la viabilitat cel·lular en un 50% al cap de 24 hores.

1. L'OGD provoca la condensació de la cromatina i l'activació de la caspasa-3.
2. El pretractament amb l'inhibidor dels receptors NMDA, MK-801, protegeix en un % la viabilitat dels cultius 24 hores després de sotmetre'ls a l'OGD.
3. XIAP s'expressa en neurones i els seus nivells de mRNA i proteïna no varien després de l'OGD respecte la normòxia.
4. IAP2 es degrada a partir de les 6 hores de l'OGD mentre els nivells de mRNA es mantenen.
5. FLIP_L (p55) i la seva forma unida al DISC (p43) es degraden en l'OGD a partir del retorn del medi condicionat mentre el mRNA es manté constant.
6. L'OGD modula els nivells de FAIM_L augmentant els nivells de proteïna a les 3 hores de l'OGD respecte la normòxia.
7. La modulació dels nivells de FAIM_L després de l'OGD depenen de la via de les MAP quinases.
8. L'infecció amb els vectors lentivirals als 4 DIV no afecta a la població glial.
9. El silenciament de l'expressió de FAIM_L no afecta a la viabilitat cel·lular ni a la condensació de la cromatina ni al nombre de cèl·lules PI positives dels cultius corticals mixtes sotmesos a OGD.
10. La sobreexpressió de FAIM_L no afecta la viabilitat dels cultius als 12 DIV
11. La sobreexpressió de FAIM_L no afecta a la viabilitat cel·lular ni a la morfologia apoptòtica dels cultius sotmesos a OGD respecte el control sense infectar.
12. La sobreexpressió de FAIM_L no redueix els nivells del fragment p17 de la caspasa-3 activa respecte el control d'infecció.

7. BIBLIOGRAFIA

- Aarts, M. M. and M. Tymianski (2005). "TRPMs and neuronal cell death." *Pflugers Arch* **451**(1): 243-9.
- Abe, T., A. Kunz, et al. (2009). "The neuroprotective effect of prostaglandin E2 EP1 receptor inhibition has a wide therapeutic window, is sustained in time and is not sexually dimorphic." *J Cereb Blood Flow Metab* **29**(1): 66-72.
- Adibhatla, R. M. and J. F. Hatcher (2010). "Lipid oxidation and peroxidation in CNS health and disease: from molecular mechanisms to therapeutic opportunities." *Antioxid Redox Signal* **12**(1): 125-69.
- Aiello, L., R. Guilfoyle, et al. (1979). "Adenovirus 5 DNA sequences present and RNA sequences transcribed in transformed human embryo kidney cells (HEK-Ad-5 or 293)." *Virology* **94**(2): 460-9.
- Albers, G. W., L. R. Caplan, et al. (2002). "Transient ischemic attack--proposal for a new definition." *N Engl J Med* **347**(21): 1713-6.
- Allen, C. L. and U. Bayraktutan (2008). "Risk factors for ischaemic stroke." *Int J Stroke* **3**(2): 105-16.
- Allen, C. L. and U. Bayraktutan (2009). "Oxidative stress and its role in the pathogenesis of ischaemic stroke." *Int J Stroke* **4**(6): 461-70.
- Althaus, J., M. D. Siegelin, et al. (2007). "The serine protease Omi/HtrA2 is involved in XIAP cleavage and in neuronal cell death following focal cerebral ischemia/reperfusion." *Neurochem Int* **50**(1): 172-80.
- Ankarcrona, M., J. M. Dypbukt, et al. (1995). "Glutamate-induced neuronal death: a succession of necrosis or apoptosis depending on mitochondrial function." *Neuron* **15**(4): 961-73.
- Arrick, D. M., G. M. Sharpe, et al. (2007). "nNOS-dependent reactivity of cerebral arterioles in Type 1 diabetes." *Brain Res* **1184**: 365-71.
- Ashkenazi, A. and V. M. Dixit (1998). "Death receptors: signaling and modulation." *Science* **281**(5381): 1305-8.
- Askalan, R., R. Salweski, et al. (2009). "X-linked inhibitor of apoptosis protein expression after ischemic injury in the human and rat developing brain." *Pediatr Res* **65**(1): 21-6.
- Astrup, J., B. K. Siesjo, et al. (1981). "Thresholds in cerebral ischemia - the ischemic penumbra." *Stroke* **12**(6): 723-5.
- Badiola, N., C. Malagelada, et al. (2009). "Activation of caspase-8 by tumour necrosis factor receptor 1 is necessary for caspase-3 activation and apoptosis in oxygen-glucose deprived cultured cortical cells." *Neurobiol Dis* **35**(3): 438-47.
- Badiola, N., C. Penas, et al. (2011). "Induction of ER stress in response to oxygen-glucose deprivation of cortical cultures involves the activation of the PERK and IRE-1 pathways and of caspase-12." *Cell Death Dis* **2**: e149.
- Bano, D., E. Munarriz, et al. (2007). "The plasma membrane Na⁺/Ca²⁺ exchanger is cleaved by distinct protease families in neuronal cell death." *Ann N Y Acad Sci* **1099**: 451-5.
- Barone, F. C., B. Arvin, et al. (1997). "Tumor necrosis factor- α . A mediator of focal ischemic brain injury." *Stroke* **28**(6): 1233-44.
- Bavykin, A. S., A. A. Korotaeva, et al. (2013). "Double siRNA-targeting of cIAP2 and LIVIN results in synergetic sensitization of HCT-116 cells to oxaliplatin treatment." *Onco Targets Ther* **6**: 1333-40.
- Bergendi, L., L. Benes, et al. (1999). "Chemistry, physiology and pathology of free radicals." *Life Sci* **65**(18-19): 1865-74.
- Bertrand, M. J., K. Doiron, et al. (2009). "Cellular inhibitors of apoptosis cIAP1 and cIAP2 are required for innate immunity signaling by the pattern recognition receptors NOD1 and NOD2." *Immunity* **30**(6): 789-801.
- Bertrand, M. J., S. Milutinovic, et al. (2008). "cIAP1 and cIAP2 facilitate cancer cell survival by functioning as E3 ligases that promote RIP1 ubiquitination." *Mol Cell* **30**(6): 689-700.
- Black, S. and C. Iadecola (2009). "Vascular cognitive impairment: small vessels, big toll: introduction." *Stroke* **40**(3 Suppl): S38-9.

- Blomer, U., L. Naldini, et al. (1997). "Highly efficient and sustained gene transfer in adult neurons with a lentivirus vector." *J Virol* **71**(9): 6641-9.
- Bonfoco, E., D. Krainc, et al. (1995). "Apoptosis and necrosis: two distinct events induced, respectively, by mild and intense insults with N-methyl-D-aspartate or nitric oxide/superoxide in cortical cell cultures." *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(16): 7162-6.
- Borsello, T. and G. Forloni (2007). "JNK signalling: a possible target to prevent neurodegeneration." *Curr Pharm Des* **13**(18): 1875-86.
- Bottiger, B. W., J. J. Krumnikl, et al. (1997). "The cerebral 'no-reflow' phenomenon after cardiac arrest in rats--influence of low-flow reperfusion." *Resuscitation* **34**(1): 79-87.
- Brinker, G., C. Franke, et al. (1999). "Thrombolysis of cerebral clot embolism in rat: effect of treatment delay." *Neuroreport* **10**(16): 3269-72.
- Broughton, B. R., D. C. Reutens, et al. (2009). "Apoptotic mechanisms after cerebral ischemia." *Stroke* **40**(5): e331-9.
- Brown, A. W. and J. B. Brierley (1972). "Anoxic-ischaemic cell change in rat brain light microscopic and fine-structural observations." *J Neurol Sci* **16**(1): 59-84.
- Bruce, A. J., W. Boling, et al. (1996). "Altered neuronal and microglial responses to excitotoxic and ischemic brain injury in mice lacking TNF receptors." *Nat Med* **2**(7): 788-94.
- Busch, E., K. Kruger, et al. (1997). "Improved model of thromboembolic stroke and rt-PA induced reperfusion in the rat." *Brain Res* **778**(1): 16-24.
- Carrington, P. E., C. Sandu, et al. (2006). "The structure of FADD and its mode of interaction with procaspase-8." *Mol Cell* **22**(5): 599-610.
- Castri, P., Y. J. Lee, et al. (2014). "Poly(ADP-ribose) polymerase-1 and its cleavage products differentially modulate cellular protection through NF-kappaB-dependent signaling." *Biochim Biophys Acta* **1843**(3): 640-51.
- Chai, J., E. Shiozaki, et al. (2001). "Structural basis of caspase-7 inhibition by XIAP." *Cell* **104**(5): 769-80.
- Chang, L., H. Kamata, et al. (2006). "The E3 ubiquitin ligase itch couples JNK activation to TNFalpha-induced cell death by inducing c-FLIP(L) turnover." *Cell* **124**(3): 601-13.
- Cho, Y. S., S. Challa, et al. (2009). "Phosphorylation-driven assembly of the RIP1-RIP3 complex regulates programmed necrosis and virus-induced inflammation." *Cell* **137**(6): 1112-23.
- Choi, D. W. (1988). "Calcium-mediated neurotoxicity: relationship to specific channel types and role in ischemic damage." *Trends Neurosci* **11**(10): 465-9.
- Choi, D. W. (1992). "Excitotoxic cell death." *J Neurobiol* **23**(9): 1261-76.
- Choi, D. W. and S. M. Rothman (1990). "The role of glutamate neurotoxicity in hypoxic-ischemic neuronal death." *Annu Rev Neurosci* **13**: 171-82.
- Contreras, J. E., H. A. Sanchez, et al. (2004). "Role of connexin-based gap junction channels and hemichannels in ischemia-induced cell death in nervous tissue." *Brain Res Brain Res Rev* **47**(1-3): 290-303.
- Crack, P. J. and J. M. Taylor (2005). "Reactive oxygen species and the modulation of stroke." *Free Radic Biol Med* **38**(11): 1433-44.
- Culmsee, C., C. Zhu, et al. (2005). "Apoptosis-inducing factor triggered by poly(ADP-ribose) polymerase and Bid mediates neuronal cell death after oxygen-glucose deprivation and focal cerebral ischemia." *J Neurosci* **25**(44): 10262-72.
- Dawson, D. A., D. Martin, et al. (1996). "Inhibition of tumor necrosis factor-alpha reduces focal cerebral ischemic injury in the spontaneously hypertensive rat." *Neurosci Lett* **218**(1): 41-4.
- Dawson, V. L. and T. M. Dawson (2004). "Deadly conversations: nuclear-mitochondrial cross-talk." *J Bioenerg Biomembr* **36**(4): 287-94.
- De Smaele, E., F. Zazzeroni, et al. (2001). "Induction of gadd45beta by NF-kappaB downregulates pro-apoptotic JNK signalling." *Nature* **414**(6861): 308-13.
- Dietrich, W. D., B. D. Watson, et al. (1987). "Photochemically induced cerebral infarction. I. Early microvascular alterations." *Acta Neuropathol* **72**(4): 315-25.

- Dirnagl, U., C. Iadecola, et al. (1999). "Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view." *Trends Neurosci* **22**(9): 391-7.
- Ditzel, M., M. Broemer, et al. (2008). "Inactivation of effector caspases through nondegradative polyubiquitylation." *Mol Cell* **32**(4): 540-53.
- Dohmen, C., O. W. Sakowitz, et al. (2008). "Spreading depolarizations occur in human ischemic stroke with high incidence." *Ann Neurol* **63**(6): 720-8.
- Dong, L., H. Qiao, et al. (2013). "Parthenolide is neuroprotective in rat experimental stroke model: downregulating NF-kappaB, phospho-p38MAPK, and caspase-1 and ameliorating BBB permeability." *Mediators Inflamm* **2013**: 370804.
- Douglas, H. A., J. K. Callaway, et al. (2011). "Potent inhibition of anoxic depolarization by the sodium channel blocker dibucaine." *J Neurophysiol* **105**(4): 1482-94.
- Dubreux-Daloz, L., A. Dupoux, et al. (2008). "IAPs: more than just inhibitors of apoptosis proteins." *Cell Cycle* **7**(8): 1036-46.
- Duckworth, E. A., T. Butler, et al. (2006). "NF-kappaB protects neurons from ischemic injury after middle cerebral artery occlusion in mice." *Brain Res* **1088**(1): 167-75.
- Dynek, J. N., T. Goncharov, et al. (2010). "c-IAP1 and UbCH5 promote K11-linked polyubiquitination of RIP1 in TNF signalling." *EMBO J* **29**(24): 4198-209.
- Ea, C. K., L. Deng, et al. (2006). "Activation of IKK by TNFalpha requires site-specific ubiquitination of RIP1 and polyubiquitin binding by NEMO." *Mol Cell* **22**(2): 245-57.
- Ebinger, M., D. A. De Silva, et al. (2009). "Imaging the penumbra - strategies to detect tissue at risk after ischemic stroke." *J Clin Neurosci* **16**(2): 178-87.
- Eckelman, B. P. and G. S. Salvesen (2006). "The human anti-apoptotic proteins cIAP1 and cIAP2 bind but do not inhibit caspases." *J Biol Chem* **281**(6): 3254-60.
- Egashira, Y., Y. Suzuki, et al. (2013). "The growth factor progranulin attenuates neuronal injury induced by cerebral ischemia-reperfusion through the suppression of neutrophil recruitment." *J Neuroinflammation* **10**: 105.
- Endres, M., S. Namura, et al. (1998). "Attenuation of delayed neuronal death after mild focal ischemia in mice by inhibition of the caspase family." *J Cereb Blood Flow Metab* **18**(3): 238-47.
- Endres, M., Z. Q. Wang, et al. (1997). "Ischemic brain injury is mediated by the activation of poly(ADP-ribose)polymerase." *J Cereb Blood Flow Metab* **17**(11): 1143-51.
- Fan, Q., Z. M. Huang, et al. (2013). "Inhibition of Fas-associated death domain-containing protein (FADD) protects against myocardial ischemia/reperfusion injury in a heart failure mouse model." *PLoS One* **8**(9): e73537.
- Faris, M., N. Kokot, et al. (1998). "The c-Jun N-terminal kinase cascade plays a role in stress-induced apoptosis in Jurkat cells by up-regulating Fas ligand expression." *J Immunol* **160**(1): 134-44.
- Feoktistova, M., P. Geserick, et al. (2011). "cIAPs block Ripoptosome formation, a RIP1/caspase-8 containing intracellular cell death complex differentially regulated by cFLIP isoforms." *Mol Cell* **43**(3): 449-63.
- Festjens, N., T. Vanden Berghe, et al. (2006). "Necrosis, a well-orchestrated form of cell demise: signalling cascades, important mediators and concomitant immune response." *Biochim Biophys Acta* **1757**(9-10): 1371-87.
- Fire, A., S. Xu, et al. (1998). "Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*." *Nature* **391**(6669): 806-11.
- Foote, L. C., T. J. Schneider, et al. (1996). "Intracellular signaling for inducible antigen receptor-mediated Fas resistance in B cells." *J Immunol* **157**(5): 1878-85.
- Fujimura, M., Y. Morita-Fujimura, et al. (1998). "Cytosolic redistribution of cytochrome c after transient focal cerebral ischemia in rats." *J Cereb Blood Flow Metab* **18**(11): 1239-47.
- Fuxe, K., B. Bjelke, et al. (1997). "Endothelin-1 induced lesions of the frontoparietal cortex of the rat. A possible model of focal cortical ischemia." *Neuroreport* **8**(11): 2623-9.

- Galluzzi, L., K. Blomgren, et al. (2009). "Mitochondrial membrane permeabilization in neuronal injury." *Nat Rev Neurosci* **10**(7): 481-94.
- Gary, D. S., A. J. Bruce-Keller, et al. (1998). "Ischemic and excitotoxic brain injury is enhanced in mice lacking the p53 tumor necrosis factor receptor." *J Cereb Blood Flow Metab* **18**(12): 1283-7.
- Ginsberg, M. D. (2009). "Current status of neuroprotection for cerebral ischemia: synaptic overview." *Stroke* **40**(3 Suppl): S111-4.
- Goldberg, M. P. and D. W. Choi (1990). "Intracellular free calcium increases in cultured cortical neurons deprived of oxygen and glucose." *Stroke* **21**(11 Suppl): III75-7.
- Goldberg, M. P. and D. W. Choi (1993). "Combined oxygen and glucose deprivation in cortical cell culture: calcium-dependent and calcium-independent mechanisms of neuronal injury." *J Neurosci* **13**(8): 3510-24.
- Goto, S., R. Xue, et al. (2002). "Poly(ADP-ribose) polymerase impairs early and long-term experimental stroke recovery." *Stroke* **33**(4): 1101-6.
- Gotoh, O., T. Asano, et al. (1985). "Ischemic brain edema following occlusion of the middle cerebral artery in the rat. I: The time courses of the brain water, sodium and potassium contents and blood-brain barrier permeability to 125I-albumin." *Stroke* **16**(1): 101-9.
- Greene, L. A. and A. S. Tischler (1976). "Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor." *Proc Natl Acad Sci U S A* **73**(7): 2424-8.
- Gu, Z., M. Kaul, et al. (2002). "S-nitrosylation of matrix metalloproteinases: signaling pathway to neuronal cell death." *Science* **297**(5584): 1186-90.
- Guegan, C., J. Braudeau, et al. (2006). "PTD-XIAP protects against cerebral ischemia by anti-apoptotic and transcriptional regulatory mechanisms." *Neurobiol Dis* **22**(1): 177-86.
- Guix, F. X., I. Urbesalgo, et al. (2005). "The physiology and pathophysiology of nitric oxide in the brain." *Prog Neurobiol* **76**(2): 126-52.
- Hacke, W., M. Kaste, et al. (2008). "Thrombolysis with alteplase 3 to 4.5 hours after acute ischemic stroke." *N Engl J Med* **359**(13): 1317-29.
- Halestrap, A. P. (2006). "Calcium, mitochondria and reperfusion injury: a pore way to die." *Biochem Soc Trans* **34**(Pt 2): 232-7.
- Han, F., R. R. Tao, et al. (2011). "Melatonin ameliorates ischemic-like injury-evoked nitrosative stress: Involvement of HtrA2/PED pathways in endothelial cells." *J Pineal Res* **50**(3): 281-91.
- Hankey, G. J. (2006). "Potential new risk factors for ischemic stroke: what is their potential?" *Stroke* **37**(8): 2181-8.
- Hara, H., R. M. Friedlander, et al. (1997). "Inhibition of interleukin 1beta converting enzyme family proteases reduces ischemic and excitotoxic neuronal damage." *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(5): 2007-12.
- Harari, O. A. and J. K. Liao (2010). "NF-kappaB and innate immunity in ischemic stroke." *Ann N Y Acad Sci* **1207**: 32-40.
- Hasbani, M. J., K. L. Hyrc, et al. (1998). "Distinct roles for sodium, chloride, and calcium in excitotoxic dendritic injury and recovery." *Exp Neurol* **154**(1): 241-58.
- Hasbani, M. J., M. L. Schlieff, et al. (2001). "Dendritic spines lost during glutamate receptor activation reemerge at original sites of synaptic contact." *J Neurosci* **21**(7): 2393-403.
- Hemond, M., T. L. Rothstein, et al. (2009). "Fas apoptosis inhibitory molecule contains a novel beta-sandwich in contact with a partially ordered domain." *J Mol Biol* **386**(4): 1024-37.
- Hengartner, M. O. (2000). "The biochemistry of apoptosis." *Nature* **407**(6805): 770-6.
- Hibi, M., A. Lin, et al. (1993). "Identification of an oncoprotein- and UV-responsive protein kinase that binds and potentiates the c-Jun activation domain." *Genes Dev* **7**(11): 2135-48.
- Holcik, M. (2003). "Translational upregulation of the X-linked inhibitor of apoptosis." *Ann N Y Acad Sci* **1010**: 249-58.

- Holler, N., R. Zaru, et al. (2000). "Fas triggers an alternative, caspase-8-independent cell death pathway using the kinase RIP as effector molecule." *Nat Immunol* **1**(6): 489-95.
- Hunter, A. M., E. C. LaCasse, et al. (2007). "The inhibitors of apoptosis (IAPs) as cancer targets." *Apoptosis* **12**(9): 1543-68.
- Huo, J., S. Xu, et al. (2009). "Genetic deletion of faim reveals its role in modulating c-FLIP expression during CD95-mediated apoptosis of lymphocytes and hepatocytes." *Cell Death Differ* **16**(7): 1062-70.
- Huo, J., S. Xu, et al. (2010). "Fas apoptosis inhibitory molecule regulates T cell receptor-mediated apoptosis of thymocytes by modulating Akt activation and Nur77 expression." *J Biol Chem* **285**(16): 11827-35.
- Iadecola, C. and R. L. Davisson (2008). "Hypertension and cerebrovascular dysfunction." *Cell Metab* **7**(6): 476-84.
- Irmeler, M., M. Thome, et al. (1997). "Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP." *Nature* **388**(6638): 190-5.
- Ito, U., K. Ohno, et al. (1979). "Brain edema during ischemia and after restoration of blood flow. Measurement of water, sodium, potassium content and plasma protein permeability." *Stroke* **10**(5): 542-7.
- Jander, S., M. Schroeter, et al. (2000). "Role of NMDA receptor signaling in the regulation of inflammatory gene expression after focal brain ischemia." *J Neuroimmunol* **109**(2): 181-7.
- Kaku, H. and T. L. Rothstein (2009). "Fas apoptosis inhibitory molecule enhances CD40 signaling in B cells and augments the plasma cell compartment." *J Immunol* **183**(3): 1667-74.
- Kamalian, S., A. A. Konstas, et al. (2012). "CT perfusion mean transit time maps optimally distinguish benign oligemia from true "at-risk" ischemic penumbra, but thresholds vary by postprocessing technique." *AJNR Am J Neuroradiol* **33**(3): 545-9.
- Kamat, C. D., S. Gadal, et al. (2008). "Antioxidants in central nervous system diseases: preclinical promise and translational challenges." *J Alzheimers Dis* **15**(3): 473-93.
- Kapadia, R., K. Tureyen, et al. (2006). "Decreased brain damage and curtailed inflammation in transcription factor CCAAT/enhancer binding protein beta knockout mice following transient focal cerebral ischemia." *J Neurochem* **98**(6): 1718-31.
- Kapadia, R., J. H. Yi, et al. (2008). "Mechanisms of anti-inflammatory and neuroprotective actions of PPAR-gamma agonists." *Front Biosci* **13**: 1813-26.
- Karin, M. and A. Lin (2002). "NF-kappaB at the crossroads of life and death." *Nat Immunol* **3**(3): 221-7.
- Kataoka, T. and J. Tschopp (2004). "N-terminal fragment of c-FLIP(L) processed by caspase 8 specifically interacts with TRAF2 and induces activation of the NF-kappaB signaling pathway." *Mol Cell Biol* **24**(7): 2627-36.
- Katsura, K., T. Kristian, et al. (1994). "Energy metabolism, ion homeostasis, and cell damage in the brain." *Biochem Soc Trans* **22**(4): 991-6.
- Kawano, T., J. Anrather, et al. (2006). "Prostaglandin E2 EP1 receptors: downstream effectors of COX-2 neurotoxicity." *Nat Med* **12**(2): 225-9.
- Kim, H. E., F. Du, et al. (2005). "Formation of apoptosome is initiated by cytochrome c-induced dATP hydrolysis and subsequent nucleotide exchange on Apaf-1." *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(49): 17545-50.
- Kischkel, F. C., S. Hellbardt, et al. (1995). "Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor." *EMBO J* **14**(22): 5579-88.
- Kleinig, T. J. and R. Vink (2009). "Suppression of inflammation in ischemic and hemorrhagic stroke: therapeutic options." *Curr Opin Neurol* **22**(3): 294-301.

- Knight, R. J. and D. B. Buxton (1996). "Stimulation of c-Jun kinase and mitogen-activated protein kinase by ischemia and reperfusion in the perfused rat heart." Biochem Biophys Res Commun **218**(1): 83-8.
- Kramer, B., K. Wiegmann, et al. (1995). "Regulation of the human TNF promoter by the transcription factor Ets." J Biol Chem **270**(12): 6577-83.
- Krantic, S., N. Mechawar, et al. (2007). "Apoptosis-inducing factor: a matter of neuron life and death." Prog Neurobiol **81**(3): 179-96.
- Kroemer, G., L. Galluzzi, et al. (2007). "Mitochondrial membrane permeabilization in cell death." Physiol Rev **87**(1): 99-163.
- Krueger, A., I. Schmitz, et al. (2001). "Cellular FLICE-inhibitory protein splice variants inhibit different steps of caspase-8 activation at the CD95 death-inducing signaling complex." J Biol Chem **276**(23): 20633-40.
- Kuan, C. Y. and R. E. Burke (2005). "Targeting the JNK signaling pathway for stroke and Parkinson's diseases therapy." Curr Drug Targets CNS Neurol Disord **4**(1): 63-7.
- Labbe, K., C. R. McIntire, et al. (2011). "Cellular inhibitors of apoptosis proteins cIAP1 and cIAP2 are required for efficient caspase-1 activation by the inflammasome." Immunity **35**(6): 897-907.
- Lavine, S. D., F. M. Hofman, et al. (1998). "Circulating antibody against tumor necrosis factor-alpha protects rat brain from reperfusion injury." J Cereb Blood Flow Metab **18**(1): 52-8.
- Lees, K. R., E. Bluhmki, et al. (2010). "Time to treatment with intravenous alteplase and outcome in stroke: an updated pooled analysis of ECASS, ATLANTIS, NINDS, and EPITHET trials." Lancet **375**(9727): 1695-703.
- Leung, A. W. and A. P. Halestrap (2008). "Recent progress in elucidating the molecular mechanism of the mitochondrial permeability transition pore." Biochim Biophys Acta **1777**(7-8): 946-52.
- Li, J., Z. Lu, et al. (2008). "Cell death and proliferation in NF-kappaB p50 knockout mouse after cerebral ischemia." Brain Res **1230**: 281-9.
- Li, J., Q. Yin, et al. (2013). "Structural basis of signal transduction in the TNF receptor superfamily." Adv Immunol **119**: 135-53.
- Li, X., M. Nemoto, et al. (2007). "Influence of duration of focal cerebral ischemia and neuronal nitric oxide synthase on translocation of apoptosis-inducing factor to the nucleus." Neuroscience **144**(1): 56-65.
- Liesz, A., E. Suri-Payer, et al. (2009). "Regulatory T cells are key cerebroprotective immunomodulators in acute experimental stroke." Nat Med **15**(2): 192-9.
- Linnik, M. D., R. H. Zobrist, et al. (1993). "Evidence supporting a role for programmed cell death in focal cerebral ischemia in rats." Stroke **24**(12): 2002-8; discussion 2008-9.
- Lo, E. H. (2008). "Experimental models, neurovascular mechanisms and translational issues in stroke research." Br J Pharmacol **153 Suppl 1**: S396-405.
- Lo, E. H. (2008). "A new penumbra: transitioning from injury into repair after stroke." Nat Med **14**(5): 497-500.
- Lo, E. H., T. Dalkara, et al. (2003). "Mechanisms, challenges and opportunities in stroke." Nat Rev Neurosci **4**(5): 399-415.
- Longa, E. Z., P. R. Weinstein, et al. (1989). "Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats." Stroke **20**(1): 84-91.
- Lukacs, C., C. Belunis, et al. (2013). "The structure of XIAP BIR2: understanding the selectivity of the BIR domains." Acta Crystallogr D Biol Crystallogr **69**(Pt 9): 1717-25.
- MacManus, J. P., A. M. Buchan, et al. (1993). "Global ischemia can cause DNA fragmentation indicative of apoptosis in rat brain." Neurosci Lett **164**(1-2): 89-92.
- Macrae, I. M., M. J. Robinson, et al. (1993). "Endothelin-1-induced reductions in cerebral blood flow: dose dependency, time course, and neuropathological consequences." J Cereb Blood Flow Metab **13**(2): 276-84.

- Mahoney, D. J., H. H. Cheung, et al. (2008). "Both cIAP1 and cIAP2 regulate TNF α -mediated NF- κ B activation." *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**(33): 11778-83.
- Malagelada, C., X. Xifro, et al. (2005). "Contribution of caspase-mediated apoptosis to the cell death caused by oxygen-glucose deprivation in cortical cell cultures." *Neurobiol Dis* **20**(1): 27-37.
- Martin-Villalba, A., I. Herr, et al. (1999). "CD95 ligand (Fas-L/APO-1L) and tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand mediate ischemia-induced apoptosis in neurons." *J Neurosci* **19**(10): 3809-17.
- Medrano Alberto, M. J., R. Boix Martinez, et al. (2006). "[Incidence and prevalence of ischaemic heart disease and cerebrovascular disease in Spain: a systematic review of the literature]." *Rev Esp Salud Publica* **80**(1): 5-15.
- Metzger, M. B., J. N. Pruneda, et al. (2014). "RING-type E3 ligases: master manipulators of E2 ubiquitin-conjugating enzymes and ubiquitination." *Biochim Biophys Acta* **1843**(1): 47-60.
- Meyer, F. B. (1989). "Calcium, neuronal hyperexcitability and ischemic injury." *Brain Res Brain Res Rev* **14**(3): 227-43.
- Micheau, O. and J. Tschopp (2003). "Induction of TNF receptor I-mediated apoptosis via two sequential signaling complexes." *Cell* **114**(2): 181-90.
- Moskowitz, M. A., E. H. Lo, et al. (2010). "The science of stroke: mechanisms in search of treatments." *Neuron* **67**(2): 181-98.
- Mosmann, T. (1983). "Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays." *J Immunol Methods* **65**(1-2): 55-63.
- Moubarak, R. S., L. Planells-Ferrer, et al. (2013). "FAIM-L is an IAP-binding protein that inhibits XIAP ubiquitinylation and protects from Fas-induced apoptosis." *J Neurosci* **33**(49): 19262-75.
- Moubarak, R. S., C. Sole, et al. (2010). "The death receptor antagonist FLIP-L interacts with Trk and is necessary for neurite outgrowth induced by neurotrophins." *J Neurosci* **30**(17): 6094-105.
- Nakagawa, T., S. Shimizu, et al. (2005). "Cyclophilin D-dependent mitochondrial permeability transition regulates some necrotic but not apoptotic cell death." *Nature* **434**(7033): 652-8.
- Nakamura, T. and S. A. Lipton (2009). "According to GOSPEL: filling in the GAP(DH) of NO-mediated neurotoxicity." *Neuron* **63**(1): 3-6.
- Namura, S., J. Zhu, et al. (1998). "Activation and cleavage of caspase-3 in apoptosis induced by experimental cerebral ischemia." *J Neurosci* **18**(10): 3659-68.
- Nawashiro, H., D. Martin, et al. (1997). "Inhibition of tumor necrosis factor and amelioration of brain infarction in mice." *J Cereb Blood Flow Metab* **17**(2): 229-32.
- Nogueira-Ferreira, R., R. Vitorino, et al. (2013). "Exploring the role of post-translational modifications on protein-protein interactions with survivin." *Arch Biochem Biophys* **538**(2): 64-70.
- Oppenheim, J. J. and D. Yang (2005). "Alarmins: chemotactic activators of immune responses." *Curr Opin Immunol* **17**(4): 359-65.
- Overgaard, K. (1994). "Thrombolytic therapy in experimental embolic stroke." *Cerebrovasc Brain Metab Rev* **6**(3): 257-86.
- Pacher, P., J. S. Beckman, et al. (2007). "Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease." *Physiol Rev* **87**(1): 315-424.
- Pamenter, M. E., G. A. Perkins, et al. (2012). "Autophagy and apoptosis are differentially induced in neurons and astrocytes treated with an in vitro mimic of the ischemic penumbra." *PLoS One* **7**(12): e51469.
- Papa, S., F. Zazzeroni, et al. (2004). "Linking JNK signaling to NF- κ B: a key to survival." *J Cell Sci* **117**(Pt 22): 5197-208.

- Park, Y. C., H. Ye, et al. (2000). "A novel mechanism of TRAF signaling revealed by structural and functional analyses of the TRADD-TRAF2 interaction." *Cell* **101**(7): 777-87.
- Pulsinelli, W. A. and J. B. Brierley (1979). "A new model of bilateral hemispheric ischemia in the unanesthetized rat." *Stroke* **10**(3): 267-72.
- Ramakrishnan, V., U. Painuly, et al. (2014). "Inhibitor of apoptosis proteins as therapeutic targets in multiple myeloma." *Leukemia*.
- Rao, D. D., N. Senzer, et al. (2009). "Comparative assessment of siRNA and shRNA off target effects: what is slowing clinical development." *Cancer Gene Ther* **16**(11): 807-9.
- Rao, D. D., J. S. Vorhies, et al. (2009). "siRNA vs. shRNA: similarities and differences." *Adv Drug Deliv Rev* **61**(9): 746-59.
- Raoul, C., C. E. Henderson, et al. (1999). "Programmed cell death of embryonic motoneurons triggered through the Fas death receptor." *J Cell Biol* **147**(5): 1049-62.
- Riedl, S. J., M. Renatus, et al. (2001). "Structural basis for the inhibition of caspase-3 by XIAP." *Cell* **104**(5): 791-800.
- Robinson, M. J., I. M. Macrae, et al. (1990). "Reduction of local cerebral blood flow to pathological levels by endothelin-1 applied to the middle cerebral artery in the rat." *Neurosci Lett* **118**(2): 269-72.
- Rosenbaum, D. M., G. Gupta, et al. (2000). "Fas (CD95/APO-1) plays a role in the pathophysiology of focal cerebral ischemia." *J Neurosci Res* **61**(6): 686-92.
- Rothstein, T. L., J. K. Wang, et al. (1995). "Protection against Fas-dependent Th1-mediated apoptosis by antigen receptor engagement in B cells." *Nature* **374**(6518): 163-5.
- Safa, A. R., T. W. Day, et al. (2008). "Cellular FLICE-like inhibitory protein (C-FLIP): a novel target for cancer therapy." *Curr Cancer Drug Targets* **8**(1): 37-46.
- Scarabelli, T. M., R. Knight, et al. (2006). "Clinical implications of apoptosis in ischemic myocardium." *Curr Probl Cardiol* **31**(3): 181-264.
- Schilling, M., M. Besselmann, et al. (2003). "Microglial activation precedes and predominates over macrophage infiltration in transient focal cerebral ischemia: a study in green fluorescent protein transgenic bone marrow chimeric mice." *Exp Neurol* **183**(1): 25-33.
- Schinzel, A. C., O. Takeuchi, et al. (2005). "Cyclophilin D is a component of mitochondrial permeability transition and mediates neuronal cell death after focal cerebral ischemia." *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(34): 12005-10.
- Schneider, T. J., G. M. Fischer, et al. (1999). "A novel gene coding for a Fas apoptosis inhibitory molecule (FAIM) isolated from inducibly Fas-resistant B lymphocytes." *J Exp Med* **189**(6): 949-56.
- Segura, M. F., C. Sole, et al. (2007). "The long form of Fas apoptotic inhibitory molecule is expressed specifically in neurons and protects them against death receptor-triggered apoptosis." *J Neurosci* **27**(42): 11228-41.
- Sharkey, J., I. M. Ritchie, et al. (1993). "Perivascular microapplication of endothelin-1: a new model of focal cerebral ischaemia in the rat." *J Cereb Blood Flow Metab* **13**(5): 865-71.
- Shen, Y., R. Li, et al. (1997). "Inhibition of p75 tumor necrosis factor receptor by antisense oligonucleotides increases hypoxic injury and beta-amyloid toxicity in human neuronal cell line." *J Biol Chem* **272**(6): 3550-3.
- Sheng, R., X. Q. Liu, et al. (2012). "Autophagy regulates endoplasmic reticulum stress in ischemic preconditioning." *Autophagy* **8**(3): 310-25.
- Shichita, T., Y. Sugiyama, et al. (2009). "Pivotal role of cerebral interleukin-17-producing gammadeltaT cells in the delayed phase of ischemic brain injury." *Nat Med* **15**(8): 946-50.
- Shiga, Y., H. Onodera, et al. (1992). "Cyclosporin A protects against ischemia-reperfusion injury in the brain." *Brain Res* **595**(1): 145-8.
- Shiozaki, E. N., J. Chai, et al. (2003). "Mechanism of XIAP-mediated inhibition of caspase-9." *Mol Cell* **11**(2): 519-27.

- Shohami, E., R. Bass, et al. (1996). "Inhibition of tumor necrosis factor alpha (TNFalpha) activity in rat brain is associated with cerebroprotection after closed head injury." J Cereb Blood Flow Metab **16**(3): 378-84.
- Shu, H. B., D. R. Halpin, et al. (1997). "Casper is a FADD- and caspase-related inducer of apoptosis." Immunity **6**(6): 751-63.
- Shuaib, A., K. R. Lees, et al. (2007). "NXY-059 for the treatment of acute ischemic stroke." N Engl J Med **357**(6): 562-71.
- Siegel, C., J. Li, et al. (2010). "miR-23a regulation of X-linked inhibitor of apoptosis (XIAP) contributes to sex differences in the response to cerebral ischemia." Proc Natl Acad Sci U S A **108**(28): 11662-7.
- Siegelin, M. D., L. S. Kossatz, et al. (2005). "Regulation of XIAP and Smac/DIABLO in the rat hippocampus following transient forebrain ischemia." Neurochem Int **46**(1): 41-51.
- Siesjo, B. K. and F. Bengtsson (1989). "Calcium fluxes, calcium antagonists, and calcium-related pathology in brain ischemia, hypoglycemia, and spreading depression: a unifying hypothesis." J Cereb Blood Flow Metab **9**(2): 127-40.
- Simon, R. P. (2006). "Acidotoxicity trumps excitotoxicity in ischemic brain." Arch Neurol **63**(10): 1368-71.
- Sims, N. R. and H. Muyderman (2010). "Mitochondria, oxidative metabolism and cell death in stroke." Biochim Biophys Acta **1802**(1): 80-91.
- Smith, M. L., G. Bendek, et al. (1984). "Models for studying long-term recovery following forebrain ischemia in the rat. 2. A 2-vessel occlusion model." Acta Neurol Scand **69**(6): 385-401.
- Soane, L., S. Kahraman, et al. (2007). "Mechanisms of impaired mitochondrial energy metabolism in acute and chronic neurodegenerative disorders." J Neurosci Res **85**(15): 3407-15.
- Sole, C., X. Dolcet, et al. (2004). "The death receptor antagonist FAIM promotes neurite outgrowth by a mechanism that depends on ERK and NF-kappa B signaling." J Cell Biol **167**(3): 479-92.
- Soler-Gonzalez, R., J. J. Munoz-Torrero, et al. (1999). "[Analysis of the echocardiographic findings in young patients with cerebral ischemia]." Rev Neurol **29**(10): 972-6.
- Somjen, G. G. (2001). "Mechanisms of spreading depression and hypoxic spreading depression-like depolarization." Physiol Rev **81**(3): 1065-96.
- Stanika, R. I., N. B. Pivovarova, et al. (2009). "Coupling diverse routes of calcium entry to mitochondrial dysfunction and glutamate excitotoxicity." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(24): 9854-9.
- Sughrue, M. E., A. Mehra, et al. (2004). "Anti-adhesion molecule strategies as potential neuroprotective agents in cerebral ischemia: a critical review of the literature." Inflamm Res **53**(10): 497-508.
- Sun, S. C. (2010). "CYLD: a tumor suppressor deubiquitinase regulating NF-kappaB activation and diverse biological processes." Cell Death Differ **17**(1): 25-34.
- Szabo, C. (1996). "Physiological and pathophysiological roles of nitric oxide in the central nervous system." Brain Res Bull **41**(3): 131-41.
- Tabakman, R., H. Jiang, et al. (2005). "Neuroprotection by NGF in the PC12 in vitro OGD model: involvement of mitogen-activated protein kinases and gene expression." Ann N Y Acad Sci **1053**: 84-96.
- Tanaka, H., H. Yokota, et al. (2004). "Ischemic preconditioning: neuronal survival in the face of caspase-3 activation." J Neurosci **24**(11): 2750-9.
- Taoufik, E., S. Valable, et al. (2007). "FLIP(L) protects neurons against in vivo ischemia and in vitro glucose deprivation-induced cell death." J Neurosci **27**(25): 6633-46.
- Thome, M., P. Schneider, et al. (1997). "Viral FLICE-inhibitory proteins (FLIPs) prevent apoptosis induced by death receptors." Nature **386**(6624): 517-21.

- Thome, M. and J. Tschopp (2001). "Regulation of lymphocyte proliferation and death by FLIP." Nat Rev Immunol **1**(1): 50-8.
- Trapp, T., L. Korhonen, et al. (2003). "Transgenic mice overexpressing XIAP in neurons show better outcome after transient cerebral ischemia." Mol Cell Neurosci **23**(2): 302-13.
- Trembovler, V., E. Beit-Yannai, et al. (1999). "Antioxidants attenuate acute toxicity of tumor necrosis factor-alpha induced by brain injury in rat." J Interferon Cytokine Res **19**(7): 791-5.
- Trump, B. F. and I. K. Berezsky (1996). "The role of altered $[Ca^{2+}]_i$ regulation in apoptosis, oncosis, and necrosis." Biochim Biophys Acta **1313**(3): 173-8.
- Tseveleki, V., J. Bauer, et al. (2004). "Cellular FLIP (long isoform) overexpression in T cells drives Th2 effector responses and promotes immunoregulation in experimental autoimmune encephalomyelitis." J Immunol **173**(11): 6619-26.
- Ueda, H., R. Fujita, et al. (2007). "Identification of prothymosin-alpha1, the necrosis-apoptosis switch molecule in cortical neuronal cultures." J Cell Biol **176**(6): 853-62.
- Valerio, A., M. Dossena, et al. (2009). "Leptin is induced in the ischemic cerebral cortex and exerts neuroprotection through NF-kappaB/c-Rel-dependent transcription." Stroke **40**(2): 610-7.
- Vannucci, R. C. and S. J. Vannucci (2005). "Perinatal hypoxic-ischemic brain damage: evolution of an animal model." Dev Neurosci **27**(2-4): 81-6.
- Varfolomeev, E., J. W. Blankenship, et al. (2007). "IAP antagonists induce autoubiquitination of c-IAPs, NF-kappaB activation, and TNFalpha-dependent apoptosis." Cell **131**(4): 669-81.
- Verhagen, A. M., T. K. Kratina, et al. (2007). "Identification of mammalian mitochondrial proteins that interact with IAPs via N-terminal IAP binding motifs." Cell Death Differ **14**(2): 348-57.
- Wang, Q., X. N. Tang, et al. (2007). "The inflammatory response in stroke." J Neuroimmunol **184**(1-2): 53-68.
- Watson, B. D., W. D. Dietrich, et al. (1985). "Induction of reproducible brain infarction by photochemically initiated thrombosis." Ann Neurol **17**(5): 497-504.
- Wu, P., K. J. Shi, et al. (2014). "The LEF1/CYLD axis and cIAPs regulate RIP1 deubiquitination and trigger apoptosis in selenite-treated colorectal cancer cells." Cell Death Dis **5**: e1085.
- Xia, J., C. E. Joyce, et al. (2013). "Noncanonical microRNAs and endogenous siRNAs in normal and psoriatic human skin." Hum Mol Genet **22**(4): 737-48.
- Xiong, Z. G., X. M. Zhu, et al. (2004). "Neuroprotection in ischemia: blocking calcium-permeable acid-sensing ion channels." Cell **118**(6): 687-98.
- Yang, G. Y., C. Gong, et al. (1998). "Inhibition of TNFalpha attenuates infarct volume and ICAM-1 expression in ischemic mouse brain." Neuroreport **9**(9): 2131-4.
- Yang, W., M. Cooke, et al. (2014). "Distinctive effects of the cellular inhibitor of apoptosis protein c-IAP2 through stabilization by XIAP in glioblastoma multiforme cells." Cell Cycle **13**(6): 992-1005.
- Yeh, W. C., A. Itie, et al. (2000). "Requirement for Casper (c-FLIP) in regulation of death receptor-induced apoptosis and embryonic development." Immunity **12**(6): 633-42.
- Yin, K. J., S. D. Chen, et al. (2002). "ATM gene regulates oxygen-glucose deprivation-induced nuclear factor-kappaB DNA-binding activity and downstream apoptotic cascade in mouse cerebrovascular endothelial cells." Stroke **33**(10): 2471-7.
- Yin, X. M. (2000). "Signal transduction mediated by Bid, a pro-death Bcl-2 family proteins, connects the death receptor and mitochondria apoptosis pathways." Cell Res **10**(3): 161-7.
- Yu, J. W., P. D. Jeffrey, et al. (2009). "Mechanism of procaspase-8 activation by c-FLIPL." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(20): 8169-74.

- Yuan, J. (2006). "Divergence from a dedicated cellular suicide mechanism: exploring the evolution of cell death." *Mol Cell* **23**(1): 1-12.
- Yuan, J. (2009). "Neuroprotective strategies targeting apoptotic and necrotic cell death for stroke." *Apoptosis* **14**(4): 469-77.
- Zhang, D. W., J. Shao, et al. (2009). "RIP3, an energy metabolism regulator that switches TNF-induced cell death from apoptosis to necrosis." *Science* **325**(5938): 332-6.
- Zhang, L., Z. G. Zhang, et al. (2004). "Intravenous administration of a GPIIb/IIIa receptor antagonist extends the therapeutic window of intra-arterial tenecteplase-tissue plasminogen activator in a rat stroke model." *Stroke* **35**(12): 2890-5.
- Zhang, R., M. Chopp, et al. (1998). "The expression of P- and E-selectins in three models of middle cerebral artery occlusion." *Brain Res* **785**(2): 207-14.
- Zhong, X., T. J. Schneider, et al. (2001). "An alternatively spliced long form of Fas apoptosis inhibitory molecule (FAIM) with tissue-specific expression in the brain." *Mol Immunol* **38**(1): 65-72.
- Zou, M. H., R. Cohen, et al. (2004). "Peroxynitrite and vascular endothelial dysfunction in diabetes mellitus." *Endothelium* **11**(2): 89-97.

