

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA

Departamento de Bioquímica



**PAPEL DE LA CONVERTASA DE TNF-[alfa] EN
MODELOS DE ISQUEMIA CEREBRAL**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR**

Olivia Hurtado Moreno

Bajo la dirección de los Doctores:

**María Ángeles Moro Sánchez
Ignacio Lizasoain Hernández**

Madrid, 2002

ISBN: 84-669-2034-X

aa: Aminoácido
AAE: Aminoácido excitador
AAI: Aminoácido inhibidor
ADAM: A disintegrin and metalloproteinase (metalo proteasa y desintegrina)
ADP: Adenosín difosfato
Akt: Activador de tirosina quinasa
AMPA: Ácido γ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico
Apo2L: Ligando Apo2
Apo3L: Ligando Apo3
APRIL: A proliferation-inducing ligand (ligando inductor de la proliferación)
ATP: Adenosin-trifosfato

BACE: Enzima convertidora de β -amiloide
BDNF: Factor neurotrófico derivado del cerebro
BH₄: Tetrahidrobiopterina
BIM: Bisindolilmaleimida
BSA: Suero de albúmina bovina

CAR: Arabinósido de citosina
CD-27L: Ligando CD-27
CD-30L: Ligando CD-30
CD-40L: Ligando CD-40
cDNA: ADN complementario
CG: Cetoglutarato
COX-2: Ciclooxygenasa tipo 2
CHX: Cicloheximida

DR 3: Receptor de muerte 3
DTT: Dithiotreitol

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético
EGF: Factor de crecimiento epidérmico
EGTA: Ácido etilenglicol bis (β -aminoetiléter) -N, N'-tetraacético
ELAM-1: Molécula de adhesión endotelial-1
ERO: Especies reactivas de oxígeno

FAD: Flavin adenin dinucleótido
FADD: Factor associated death domain (factor asociado al receptor de muerte)
FasL: Ligando Fas
FMN: Flavin mononucleótido

GABA: Ácido γ -aminobutírico
GDC: Glutámico descarboxilasa
GET: Genes de expresión temprana
GFAP: Proteína acídica fibrilar glial
Glu: Glutámico
GOT: Glutámico-oxalacético transaminasa
GPT: Glutámico-pirúvico transaminasa

HIF-1: Factor-1 inducible por hipoxia
HSP: Heat shock proteins (proteínas de choque térmico)
HSP-27: Heat shock protein 27 (proteína de choque térmico 27)
HSP-70: Heat shock protein 70 (proteína de choque térmico 70)

ICAM-1: Molécula de adhesión intercelular-1
ICE: Enzima convertidora de interleuquina 1 β
IFN- α : Interferón α
I κ B: Inhibidor κ B
IKK: I κ B quinasa
IL-1 β : Interleuquina 1 β
iNOS: Sintasa inducible de óxido nítrico
IRF1: Factor regulador del interferón-1

JNK: C-Jun N-terminal kinase (quinasa C-jun N-terminal)

LARD: Lymphocyte-associated receptor of death (receptor de muerte asociado a linfotoxina)
LDH: Lactato deshidrogenasa
LIGHT: Homólogo de linfotoxina
L-NMMA: N^G-monometil-L-arginina

MAP2: Proteína asociada a microtúbulos
MAPK: Mitogen-activated protein kinase (proteína quinasa activada por mitógeno)
MCAO: Middle cerebral artery occlusion (oclusión de la arteria cerebral media)
MEC: Matriz extracelular
MEM: Medio mínimo esencial Eagle
MHC-I: Complejo de histocompatibilidad mayor
MMPs: Metaloproteasas de matriz
mRNA: ARN mensajero

NADH: Nicotín adenín dinucleótido
NADPH: Nicotinamida adenin dinucleótido fosfato
NF- κ B: Factor nuclear- κ B
NGF: Factor de crecimiento nervioso
NIK: Quinasa inductora de NF- κ B
NMDA: N-metil-D-aspartato
nNOS: Sintasa neuronal de óxido nítrico
NO: Óxido nítrico
PBS: Tampón fosfato salino

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa
Phen: Fenantrolina
PI3 quinasa: Fosfatidilinositol 3 quinasa
PKC: Proteína quinasa C
POG: Privación de oxígeno y glucosa
Ppe: potencial postsináptico excitatorio
PVDF: Fluoruro de polivinidilo
Pyr: Acido Pirúvico

RANK: Receptor activator of NF-kappa B (receptor activado de NF-κB)
RIP 1: Receptor-interacting protein 1 (proteína 1 que interactúa con el receptor)
rtPA: Activador tisular del plasminógeno recombinante

SOD: Superóxido dismutasa

TACE: Enzima convertidora de TNF-α

TGF-β: Factor de crecimiento transformante-β

TGF-α: Factor de crecimiento transformante-α

THANK: TNF Homologue that activates Apoptosis, Nuclear factor-κB, and c-jun NH₂-terminal Kinase (homólogo de TNF que activa apoptosis, NF-κB y quinasa C-Jun N-terminal)

TIMPs: Inhibidores tisulares de metaloproteasas

TNF-α: Factor de necrosis tumoral α

TNFR1: Receptor de TNF-α tipo I

TNFR2: Receptor de TNF-α tipo II

TRADD: TNF receptor associated death domain (dominio de muerte asociado al TNF)

TRAF 1: TNF receptor associated factor 1 (factor 1 asociado al receptor TNF)

TRAF2: TNF receptor associated factor 2 (factor 2 asociado al receptor TNF)

TRAIL: TNF-related apoptosis-inducing ligand (ligando inductor de la apoptosis relacionado con TNF)

TRAMP: TNF-receptor-related apoptosis-mediated protein (proteína mediadora de la apoptosis relacionada con el receptor TNF)

TRANCE: Tumor necrosis factor-related activation-induced cytokine (citoquina inductora de la activación relacionada con TNF)

TWEAK: TNF-like weak inducer of apoptosis (débil inductor de la apoptosis)

UA: Unidad de absorbancia

VEGF: Factor vascular de crecimiento endotelial

VEGI: Vascular endothelial growth inhibitor (inhibidor del crecimiento endotelial vascular)

I. INTRODUCCIÓN	1
1. ENFERMEDAD CEREBROVASCULAR	1
1.1 Definición y origen del término	1
1.2 Epidemiología y factores de riesgo	2
1.3 Clasificación	3
1.4 Síntomas clínicos	5
1.5 Diagnóstico	6
1.6 Tratamiento	9
2. FISIOPATOGENIA DE LA ENFERMEDAD CEREBROVASCULAR	12
2.1 Eventos celulares	12
2.2 Cambios moleculares	15
2.3 Apoptosis	19
3. GLUTÁMICO	21
3.1 Funciones metabólicas	21
3.2 Función de neurotransmisor	23
4. METALOPROTEASAS	27
4.1 Metaloproteasas de matriz	27
4.2 ADAMs	30
4.3 TACE (Convertasa de TNF- α)/ADAM 17	32
4.3.1 Estructura de TACE	32
4.3.2 “Shedding”: Liberación de TNF- α	33
4.3.3 TACE en SNC	34
4.3.4 Inhibidores de TACE	35
5. TNF-α	36
5.1 Estructura y características	37
5.2 La superfamilia de receptores de TNF	37
5.3 Transmisión de señales al citosol	38
5.4 Actividad biológica	39
5.5 TNF- α en SNC/isquemia cerebral	41

II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	42
III. MATERIAL Y MÉTODOS	45
1.MODELOS EXPERIMENTALES DE ISQUEMIA CEREBRAL	45
1.1 Rebanadas de cerebro anterior de rata sometidas a privación de glucosa y oxígeno (POG)	45
1.2 Cultivos primarios de neuronas corticales de rata	46
2.DETERMINACIONES	48
2.1 Determinaciones bioquímicas	48
2.2 Determinaciones moleculares	51
2.3 Determinaciones histoquímicas	53
2.4 Citometría de flujo	55
3. PROTOCOLOS EXPERIMENTALES	56
3.1 Experimentos en rebanadas de cerebro anterior de rata	56
3.2 Experimentos en cultivos primarios de neuronas corticales de rata	59
4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	61
IV. RESULTADOS	63
1. RESULTADOS OBTENIDOS EN REBANADAS DE CEREBRO ANTERIOR DE RATA	63
1.1 Estudio de la liberación de TNF- α tras POG	63
1.2 Estudios de la expresión de TACE y de su regulación por POG	64
1.3 Estudio de la participación de TACE en la inducción de iNOS tras POG	66
2. RESULTADOS OBTENIDOS EN CULTIVOS PRIMARIOS DE NEURONAS CORTICALES DE RATA	67
2.1 Estudios de liberación de TNF- α tras POG y tras exposición a glutámico	67
2.2 Estudios de la expresión de TACE tras la exposición aPOG y a glutámico	68
2.3 Estudios de expresión de ADAM10 tras POG y tras exposición a glutámico	69
2.4 Estudio de la colocalización de TACE tras exposición a glutámico	70
2.5 Estudio de parámetros apoptóticos tras exposición a glutámico	71

V. DISCUSIÓN	75
VI. CONCLUSIONES	84
VII. BIBLIOGRAFÍA	86

I.INTRODUCCIÓN

II.HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

III.MATERIAL Y MÉTODOS

IV.RESULTADOS

V.DISCUSIÓN

VI.CONCLUSIONES

VII.BIBLIOGRAFÍA

1.ENFERMEDAD CEREBROVASCULAR

1.1 Definición y origen del término

En el tejido cerebral, la isquemia se produce como consecuencia de una obstrucción de un vaso (infarto isquémico), o cuando éste se rompe (infarto hemorrágico). En cualquier caso se va a producir la interrupción del flujo sanguíneo en una región del cerebro. Cuando esto sucede, las células de esa zona mueren en poco tiempo. Otro término que se emplea en esta Tesis es el de “ictus”, que representa de forma genérica un grupo de trastornos que incluyen el infarto isquémico y el infarto hemorrágico. Ictus proviene del latín *ictus-us* y significa golpe. Su equivalente en inglés es *stroke*.

La muerte celular induce la liberación de unos mediadores químicos que disparan lo que se llama cascada isquémica. Esta cascada puede afectar células que estén más allá del núcleo isquémico, en la penumbra, donde el flujo sanguíneo está comprometido pero no interrumpido. Sin tratamiento alguno, estas células de la región anexa al núcleo mueren también.

Cuando se produce un infarto isquémico cerebral, con la consecuente muerte celular, se pierde el control de las habilidades que corresponden a esa región. Esto puede producir problemas en el habla, la memoria o el movimiento. La gravedad de las consecuencias dependerá de la zona afectada y del tamaño del infarto. Un pequeño infarto isquémico puede ocasionar consecuencias menores como debilidad en una extremidad, mientras que un infarto isquémico grave puede dejar a una persona con una ausencia total de movimientos o con pérdidas en el habla.

El término de *infarto isquémico* fue acuñado por primera vez por los neurólogos canadienses Vladimir C. Hachinski y John Norris. A principio de la década de los noventa, la NSA (Asociación Nacional de Ictus de Estados Unidos; National Stroke Association) empieza a utilizar este término, ya que es más descriptivo y realista que la palabra *stroke*. Con esto se trata de dar una verdadera dimensión a esta situación y así intentar concienciar a los especialistas y a los pacientes de que el tratamiento inmediato de la enfermedad cerebrovascular es crucial. Cada minuto perdido hace que la ventana de actuación sea menor y que el daño sea cada vez mayor.

1.2 Epidemiología y factores de riesgo

Es la segunda causa de muerte en hombres en países desarrollados tras el cáncer, la primera en el caso de las mujeres. Además es la segunda causa de incapacidad neurológica y la primera causa de ingreso de adultos en hospitales por pérdida de su independencia.

En el último estudio realizado, el número de fallecimientos en España a mediados de la década de los 90 era de 71,5 por cada 1000 habitantes. La desinformación sigue siendo el mayor problema. Un estudio realizado por la Universidad de Cincinnati determina que más de la mitad de los pacientes, en concreto el 52%, que sufrieron un ataque cerebral no fueron advertidos de ello. Según un estudio de la NSA en 1.996, un 17% de los adultos con más de 50 años no podían decir un solo síntoma de un ataque cerebral. Pero el factor más importante es el tiempo desde que ocurre el infarto hasta que se presenta el paciente en urgencias. En algunos estudios realizados (Alberts y cols., 1990), se determinó que el 58% de los pacientes que sufrían un ataque cerebral no acudían al médico hasta después de 24 horas o más desde el comienzo del ictus. En concreto, parece que el tiempo medio de asistencia a un paciente está en unas 13 horas desde el comienzo del ataque.

Los factores de riesgo se pueden clasificar en controlables o incontrolables. Tener un factor de riesgo incontrolable no implica que se vaya a sufrir un ictus irremediamente. Con una buena prevención sobre los controlables se reduce más que notablemente el impacto de los incontrolables. Dentro de los factores incontrolables podemos encontrar:

- *Edad*. La probabilidad de padecerlo aumenta con la edad. Dos terceras partes de los ictus ocurren a partir de los 65 años. Cada década de años desde los 55 aumenta al doble la probabilidad.
- *Sexo*. Los hombres tienen un riesgo mayor que las mujeres.
- *Raza*. Los afroamericanos son la etnia con más riesgo de padecerlo.
- *Antecedentes familiares*. El riesgo es algo mayor en los familiares.
- *Diabetes*. Las personas diabéticas tienen mayor riesgo que las no diabéticas. Además el daño cerebral puede ser mayor si los niveles de glucosa están elevados.

Como se ha dicho antes, hay también una serie de factores controlables que pueden hacer que la posibilidad de sufrir esta enfermedad disminuya mucho. Algunos de estos

factores tienen que ver con el estilo de vida (dieta, tabaco, alcohol,...). Los más importantes son:

- *Presión sanguínea elevada.* La hipertensión incrementa de cuatro a seis veces el riesgo. Es el factor de riesgo controlable más importante y el problema es que es una condición relativamente común, que afecta a cerca de un tercio de la población adulta. Entre un 40 y un 90% de los pacientes tienen la presión sanguínea elevada (> 140/90).

- *Enfermedades cardíacas.* Dentro de ellas hay que destacar la fibrilación auricular. Puede aumentar el riesgo entre cuatro y seis veces. El latido arrítmico de la aurícula izquierda permite que se almacene sangre en el corazón que podrá formar coágulos que luego serán arrastrados hasta el cerebro. La prevalencia de fibrilación auricular se incrementa con la edad y así, el 36% de las personas mayores de 80 años que padecieron un ictus, éste fue provocado por fibrilación auricular.

- *Colesterol elevado.* El colesterol puede incrementar el riesgo de ictus, ya que las placas de ateroma se pueden liberar del vaso y obstruirlo.

- *Alteraciones respiratorias en el sueño.* Se ha observado que la apnea del sueño produce unos niveles de oxígeno muy bajos en la sangre, así como unos niveles de dióxido de carbono muy elevados.

- *Antecedentes personales.* Personas que han sufrido un ictus tienen un riesgo más elevado de padecer otro. Un 42% de los hombres y un 24% de las mujeres que tuvieron un ictus volverán a sufrirlo en los siguientes cinco años.

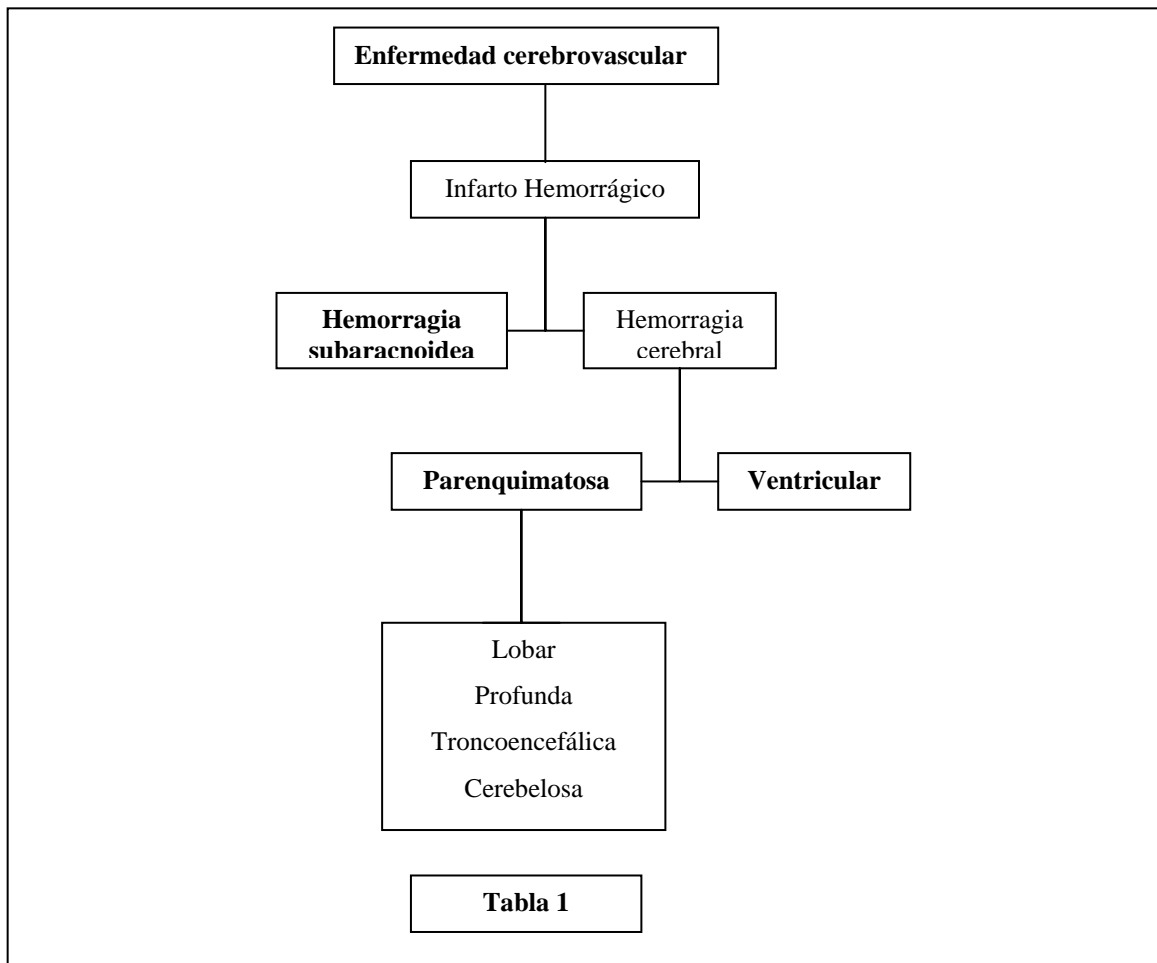
- *Tabaco, alcohol y sobrepeso.* Estos tres factores hacen que el corazón y el sistema circulatorio estén más dañados, por lo que el riesgo es mayor. Sólo el tabaco puede hacer que el riesgo se duplique.

1.3 Clasificación

La enfermedad cerebrovascular se puede clasificar en dos grandes grupos: de origen isquémico y de origen hemorrágico (En la Tabla 1 se muestran sólo los hemorrágicos). La mayor parte de los infartos cerebrales se pueden considerar como isquémicos, en torno a un 85%, y sólo un 15% pertenecerían a los hemorrágicos.

Dentro de los isquémicos podemos hacer una subdivisión según la disminución del aporte sanguíneo cerebral sea total (isquemia global) o parcial (isquemia focal). Según la

duración del proceso podrá ser ataque isquémico transitorio o infarto cerebral si no remite a las 24 horas.



El infarto **aterotrombótico (25-30%)** es un infarto de tamaño grande o mediano, con localización cortical o subcortical. Se produce por una oclusión o estenosis de una arteria de mediano o gran calibre. El infarto **cardioembólico (20%)** se produce por la oclusión de una arteria por un émbolo de origen cardiaco. Tienen una localización cortical. El infarto **lacunar (15-20%)** es un infarto de pequeño tamaño, localizado en el territorio de distribución de las arterias perforantes cerebrales. Ocasiona un síndrome lacunar, hemiparesia motora pura, síndrome sensitivo puro, hemiparesia-ataxia o un síndrome sensitivo-motor. El infarto de **causa inhabitual (5-15%)** es aquel en el que, tras el diagnóstico, no se puede asignar a ningún grupo de los anteriores. El infarto de **causa indeterminada (15-35%)** se clasifica de esta forma tras descartarse el que se pueda incluir en otro grupo. Afectan al territorio carotídeo o vertebrobasilar.

1.4 Síntomas clínicos

La enfermedad cerebrovascular siempre va a producir alteraciones en el intelecto, en la forma de percepción y en el movimiento del individuo que lo sufra. En definitiva, cambia la forma de interaccionar del paciente con su entorno. Las habilidades específicas que se pierdan o se afecten van a depender de la extensión del daño y, sobre todo, de la región cerebral donde se produzca. El cerebro es un órgano excepcionalmente complejo y cada área es responsable de unas funciones específicas. Así, podemos dividirlo en cuatro zonas primarias (hemisferio derecho, hemisferio izquierdo, cerebelo y tronco). Dependiendo de la zona afectada, los síntomas y consecuencias serán unos u otros.

- Afectación del hemisferio derecho: este hemisferio es responsable del control del movimiento del lado izquierdo del cuerpo. También controla las habilidades analíticas y perceptuales, como la distancia, el tamaño, la velocidad o la posición. Un infarto isquémico en este hemisferio puede producir parálisis del lado izquierdo (hemiplejía izquierda) o dificultades para habilidades espaciales. Puede ocasionar caídas por un mal cálculo de las distancias o que el paciente sea incapaz de guiar las manos para coger un objeto, abrocharse un botón o atarse los cordones de los zapatos. Además se pueden presentar problemas con la memoria a corto plazo (como recordar el desayuno de la mañana). A menudo, estos pacientes desarrollan un estilo de vida similar al que llevaban antes de padecer el infarto, sin tener en cuenta las secuelas, lo que hace que en algunas situaciones sea extremadamente peligroso.

- Afectación del hemisferio izquierdo: el hemisferio izquierdo rige el movimiento del lado derecho del organismo. También controla la capacidad del habla y del lenguaje. Un infarto isquémico en el hemisferio izquierdo puede producir una hemiplejía derecha. También puede aparecer afasia (dificultad para hablar o problemas con el lenguaje).

A veces, esta afasia puede implicar la habilidad para mover los músculos relacionados con el habla, mientras que en otras ocasiones el paciente puede tener dificultad para escribir, leer o entender una conversación. Pueden también desarrollar problemas para asimilar nueva información y nuevos conceptos. A diferencia de los supervivientes de enfermedad cerebrovascular en el hemisferio derecho, aquéllos que lo sufren en el hemisferio izquierdo desarrollan un estilo de vida mucho más cauto y tranquilo. Muchas veces necesitan de otros para completar funciones elementales en su vida cotidiana.

- Afectación del cerebelo: el cerebelo controla muchas de nuestras funciones relacionadas con los reflejos, equilibrio y coordinación. Un infarto isquémico en esta zona del cerebro puede causar reflejos anormales en la cabeza y el torso, problemas de coordinación y equilibrio, mareos, náuseas y vómitos.
- Afectación del tronco cerebral: la enfermedad cerebrovascular en esta zona es especialmente devastadora para el que la padece. Este área controla funciones involuntarias de nuestro organismo, como la respiración, presión sanguínea o ritmo cardíaco.

También otras funciones como el movimiento ocular, el oído, el habla o la deglución son reguladas en el tronco del cerebro. Otro agravante a destacar es que los impulsos generados por los hemisferios viajan a través del tronco cerebral, por lo que se pueden presentar hemiplejías en uno o en ambos lados del cuerpo.

Los síntomas clínicos más importantes de la enfermedad cerebrovascular se pueden resumir en:

- Debilidad, entumecimiento o insensibilidad de la cara, de un brazo o de una pierna, especialmente de un lado del cuerpo.
- Confusión, problemas en el habla o en el entendimiento.
- Problemas de visión en uno o en los dos ojos.
- Problemas de coordinación, al andar, mareos o pérdida de equilibrio.
- Fuertes dolores de cabeza sin causa conocida.
- Náuseas, fiebre y vómitos, que se distinguen de infecciones virales por la velocidad de comienzo.
- Pérdidas de conciencia o períodos de menor conciencia (desmayos, confusión, convulsiones o coma).

1.5 Diagnóstico

Como norma general, cualquier paciente con sospecha de padecer un ictus debe ser remitido a un centro hospitalario urgentemente. La asistencia primaria debe ir encaminada a una actuación médica rápida. Hay que tener muy claro que la atención neurológica en las primeras horas está directamente relacionada con una mejoría en la evolución funcional del paciente. Hay una serie de exploraciones que deben llevarse a cabo con todo paciente que

ingresa en un centro hospitalario con un ictus. El objetivo es establecer la etiología y la terapia más adecuada. El orden de las pruebas diagnósticas dependerá del historial médico del paciente. Estas pruebas de urgencia son las siguientes:

1. Tomografía computerizada sin contraste.
2. Estudios de laboratorio. Sangre:
 - Velocidad de sedimentación.
 - Hemograma.
 - Pruebas de coagulación (tiempo de protrombrina y tiempo parcial de tromboplastina).
 - Ionograma.
 - Urea.
 - Creatinina.
 - Glucemia.
 - Transaminasas.
 - Gases en sangre arterial (si hay sospecha de hipoxia).
3. Estudios de laboratorio. Líquido cefalorraquídeo: (si hay sospecha de hemorragia subaracnoidea o infección y la tomografía es negativa).
4. Estudios cardiológicos.
 - Electrocardiograma.
 - Ecocardiograma (si hay sospecha de endocarditis).
 - Monitorización cardiaca.
5. Radiografía de tórax.
6. Ecografía-Doppler.
7. Electroencefalograma.

Las técnicas más comunes de diagnóstico son las pruebas carótídeas no invasoras, la angiografía cerebral y las técnicas de imagen cerebral. Los estudios Doppler transcraneales permiten determinar la gravedad y localización de la aterosclerosis carotídea.

También son útiles para conocer los flujos de las arterias cerebrales anterior, media, posterior y vertebrobasilares. La angiografía cerebral es el método más fiable para la evaluación del sistema cerebrovascular, ya que permite detectar estenosis intensas, procesos aterotrombóticos, mostrar la circulación colateral en el polígono de Willis y en la región cortical, aunque se producen complicaciones en un 10-12% de los casos. Dados los riesgos de

esta técnica, cada vez se impone más el desarrollo de técnicas de imagen. Son las pruebas más importantes en fase aguda. La tomografía computerizada permite descartar hemorragia como fuente del ictus, aunque no permite detectar infartos cerebrales en las primeras horas. La resonancia magnética permite localizar la magnitud y posición de los infartos aunque puede no ser útil en algunas estructuras. Por eso, además de combinar estas técnicas, se emplean cada vez más los estudios con flujo de xenón o la tomografía de emisión de positrones.

Todas estas pruebas van encaminadas a conocer una serie de datos que son cruciales en el inicio del tratamiento, como: establecer que la causa del déficit neurológico es un ictus, definir que el ictus es de naturaleza isquémica o hemorrágica, determinar la posible reversibilidad del cuadro, concretar la etiología más probable y valorar el riesgo de posibles complicaciones. Cuando se ha establecido la etiología del ictus hay una serie de exploraciones obligadas en el seguimiento del paciente según el origen de la enfermedad (Tabla 2):

<u>Causa del ictus</u>	<u>Tipo de exploración</u>
Embolia de origen cardiaco	Estudios cardiológicos Hematología
Ateromatosis de troncos supraópticos	Ecografía-Doppler Angio-RM Hematología
Ateromatosis intracraneal	Doppler transcraneal Hematología
Infartos lacunares	Doppler transcraneal Hematología
Infartos indeterminados	Hematología
Ictus con enfermedad no ateromatosa	Hematología Inmunología Angio-RM Ecografía-Doppler
	Angio-RM Doppler transcraneal Hematología. Biopsias.
	Angio-RM Inmunología

Tabla 2

1.6 Tratamiento

El tratamiento más eficaz es la prevención. La mejor estrategia para reducir la prevalencia de la enfermedad cerebrovascular es el cuidado de los factores de riesgo cardiovasculares (hábitos de vida, alimentación, reducción de peso y ejercicio moderado). Una vez se ha producido, hay algunos tratamientos que podemos considerar específicos según el tipo de infarto:

A) Tratamiento de la enfermedad cerebrovascular de origen aterotrombótico.

Ácido acetilsalicílico. El uso de este fármaco es todavía polémico, aunque se considera el fármaco patrón. La mayor polémica surge de la dosis empleada. En Europa hay la tendencia a recomendar dosis medias o bajas (<325mg/día), mientras que en EE.UU. se recomiendan dosis medias o altas (>325mg/día). Las dosis pequeñas estarían justificadas según una menor incidencia de hemorragias, mientras que las dosis altas estarían de acuerdo con los datos que sugieren un comportamiento dosis-respuesta. Este debate seguirá manteniéndose hasta que no se haga un estudio directo comparando dosis muy bajas, bajas y altas.

Tienopiridinas. Aunque en un principio parecía que existía un efecto beneficioso a favor de la ticlopidina, en recientes estudios (Hankey y cols., 2000) no se ve una diferencia muy clara a favor de este último. Por el contrario, presenta una mayor incidencia de efectos secundarios (neutropenia, diarrea y erupción).

Tratamiento hipolipemiante. Hasta hace poco no era muy recomendado el uso de hipolipomiantes, pero las estatinas han cambiado esta tendencia. A falta de un estudio directo, parece que hay una reducción en la incidencia de ictus.

Anticoagulantes. Se emplean más en embolias cerebrales; en prevención secundaria de infarto cerebral de origen aterotrombótico no están recomendados.

B) Infarto lacunar.

No existen estudios específicos y diferenciados para este tipo de infartos. Por eso, se recomienda un tratamiento igual que en el apartado de infarto cerebral de origen aterotrombótico.

C) Embolias cerebrales.

Se emplean los anticoagulantes orales (heparinas no fraccionadas, heparinoides y heparinas de bajo peso molecular, asociándolas con ácido acetilsalicílico).

D) Infarto cerebral de causa inusual o de etiología no determinada.

Por la poca incidencia de estos infartos, su estudio se hace complicado. Está recomendado el uso de heparina intravenosa y posteriormente anticoagulantes hasta la recanalización, aunque en el caso de los estados protrombóticos, la función de los anticoagulantes es discutida. Dependerá de cada caso particular.

En los infartos sin causa identificada, se recomienda la terapia antiagregante como primera medida y la anticoagulación oral si aparecen recurrencias.

E) Estrategias generales.

Actualmente se emplean muchos tipos de estrategias (en principio no excluyentes) y muchos otros fármacos están en fase clínica. Casi todos ellos van orientados a la mejora del flujo sanguíneo cerebral, con lo que se evita el daño que produce su interrupción. En este grupo estarían los antitrombóticos y los trombolíticos. Otros fármacos tienen como objeto la inhibición de la acción que ocasionan los mediadores liberados en la isquemia y en la reperusión: es el caso de los neuroprotectores y citoprotectores.

Neuroprotectores. La restauración del flujo cerebral sanguíneo no lo es todo en el tratamiento del ictus cerebral. Dependiendo del tiempo de acción, habrá una región más o menos grande del cerebro con un flujo sanguíneo menor de 20 ml/minuto, con lo que ya habrá algún trastorno funcional. Además, en la reperusión se producen muchos fenómenos nocivos que conviene ser reducidos al máximo. Entre los neuroprotectores hay distintos grupos según su mecanismo de acción, muchos de estos están en fase clínica, aunque ninguno ha mostrado totalmente su eficacia en clínica. Van encaminados a las distintas etapas de la enfermedad cerebrovascular, como antagonizar las acciones del glutamato liberado, la acumulación de ácido láctico, la entrada de calcio...

Antagonistas del glutamato: se han estudiado varios fármacos antagonistas del subtipo de receptor de glutamato NMDA. Del dextrorfan y del eliprodil no se pueden sacar conclusiones claras, mientras que el estudio con selfotel tuvo que abandonarse por un aumento de la mortalidad. Un fármaco que si ha funcionado, administrado dentro de las seis primeras horas, es el lubeluzol, un bloqueante de canales de sodio que inhibe la liberación de glutamato.

Antagonistas de los canales de calcio: se han probado las dihidropiridinas (nimodipino) y se ha encontrado un efecto positivo sólo en el grupo que recibió el tratamiento en las doce primeras horas.

Citicolina: es un intermediario de la síntesis de fosfolípidos de membrana, estimula la síntesis de acetilcolina, reduce la acumulación de ácidos grasos y es antioxidante. Por todo esto, la citicolina ha demostrado un efecto neuroprotector, neuroreparador y neurocognitivo experimental y clínicamente. Además, hay que destacar su perfil de seguridad.

Trombolíticos. El fármaco más importante de este grupo es el rt-PA (activador tisular de plasminógeno recombinante). Se obtienen resultados buenos en la administración de rt-PA intravenoso en las tres primeras horas o intraarterial, administrada con un microcatéter situado cerca de la oclusión, en las seis horas iniciales (Brott y Bogousslavsky, 2000). A pesar de esta mejoría, es eficaz sólo en un estrecho margen de tiempo, y la mayoría de los pacientes llegan al hospital tarde para poderlo utilizar.

La situación actual refleja cierta incertidumbre sobre el tratamiento más adecuado. Afortunadamente se ha avanzado mucho, ya que hace unos años no existía un tratamiento específico. Cada vez se sabe más sobre el desarrollo de esta enfermedad y como consecuencia se va avanzando más en su tratamiento. Además cada día se cuentan con más Unidades de Ictus en los hospitales, por lo que se lleva a cabo una vigilancia más estrecha del paciente. El problema mayor ahora es decidir entre todos los tratamientos el más adecuado, eficaz y seguro. Para responder esa pregunta hay muchos ensayos clínicos en marcha. Muchos de ellos se abandonan por no suponer ninguna mejora significativa respecto al grupo no tratado, pero muchos otros parece que apuntan una mejora en el desarrollo del tratamiento de la enfermedad cerebrovascular.

2. FISIOPATOGENIA DE LA ENFERMEDAD CEREBROVASCULAR

La primera consecuencia que se observa es la reducción del flujo sanguíneo de una zona cerebral determinada. La interrupción del flujo sanguíneo va a ser grave en lo que se denomina núcleo de la lesión (core). A medida que se separa del núcleo isquémico (penumbra isquémica), la lesión es menor ya que el flujo colateral que llega del territorio no isquémico es mayor. Por lo que se verá mas adelante, es en esta región donde es prioritario actuar para evitar un desarrollo posterior de la lesión (Hakim, 1987). La técnica experimental que más información ha dado sobre este proceso es la oclusión de la arteria cerebral media (MCAO) en ratas (Tamura y cols., 1981).

El impacto que la isquemia cerebral tiene en el cerebro va a depender, además de la región donde ocurra, de la duración y de la gravedad con que se produzca. Se ha observado que una disminución del 20% del flujo normal tiene como consecuencia la reducción de la síntesis de proteínas (Jacewicz y cols., 1986), quizá por la disgregación que sufre el ribosoma en la isquemia (Hossmann, 1994). Cuando la reducción del flujo alcanza el 80%, se altera la producción de ATP, se pierde el gradiente iónico y se despolariza la célula. A partir de aquí se producen unos hechos ya incompatibles con la viabilidad celular (Hossmann, 1994). A continuación expondremos los distintos procesos que ocurren en el curso de un infarto isquémico cerebral (Iadecola, 1999).

2. 1 Eventos celulares

A) Fallo energético

La interrupción del flujo sanguíneo va a producir un fallo energético (Figura 1), con una caída de los niveles de ATP, que traerá como consecuencia que las bombas iónicas ATP-dependientes y los transportadores de membrana no funcionen (Astrup y cols., 1977). Como consecuencia de esto, se empieza a acumular sodio en el interior de la célula y potasio en el exterior (despolarización anóxica), lo que ocasiona la pérdida de los gradientes iónicos de membrana. Dependiendo de la intensidad y la duración de este proceso, la célula puede tener distintas respuestas. En el caso del core de la lesión, la depleción total de ATP es la principal responsable de la muerte celular (Astrup y cols., 1977). En la penumbra, donde el fallo energético no es total, son otras las causas del daño celular (liberación masiva de aminoácidos excitadores, excitotoxicidad por glutámico, sobrecarga de calcio, radicales libres...).

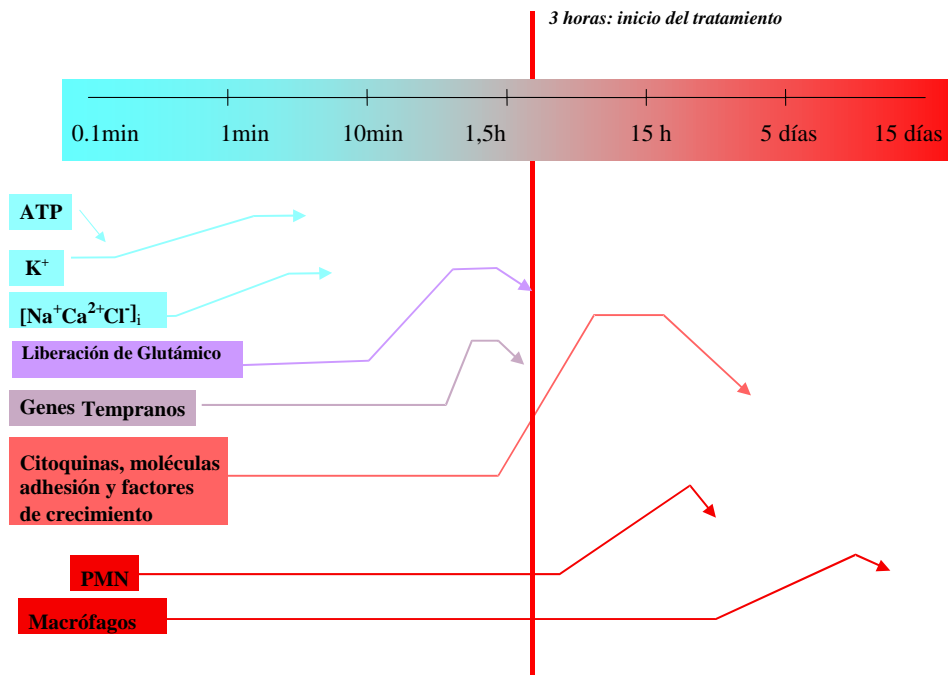


Figura 1. Curso temporal de los fenómenos bioquímicos y celulares en la enfermedad cerebrovascular.

B) Liberación de aminoácidos excitadores

Se sabe desde hace años que el glutamato liberado en la isquemia alcanza niveles neurotóxicos en el cerebro (Olney y Sharpe, 1969; Benveniste y cols., 1984) (Figura 1). Los efectos derivados de esta liberación, se deben a la sobreactivación de los receptores de membrana de glutamato (Choi, 1988; Lee y cols., 2000) bien metabotrópicos con diferentes subtipos o ionotrópicos. Estos últimos nombrados según sus agonistas farmacológicos: NMDA(N-metil-D-aspartato), AMPA (ácido γ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico) y kainato. Estos tres tipos de receptores están asociados a canales iónicos y permiten al estimularse la entrada de sodio y la salida de potasio. Las células afectadas morirán, liberarán su contenido y provocarán que el tejido tenga que reequilibrar el gradiente iónico a costa de gastar ATP (Nedergaard y Astrup, 1986). Este proceso es el responsable de que se vaya extendiendo una *ola despolarizante* o *despolarizaciones peri-infarto* desde el core hasta la penumbra. Esta *ola* aumenta la demanda metabólica y el fallo energético, con lo que se potencia de nuevo la liberación de glutamato (Lee y cols., 2000). Se ha visto en modelos *in vitro* que antagonistas del receptor NMDA, como el MK-801 (dizocilpina), reducen el daño neuronal.

C) Sobrecarga de calcio

La concentración fisiológica de calcio intracelular es del orden de milimolar si bien, en su forma libre, no sobrepasa 10^{-7} - 10^{-6} M. Se mantiene en estos márgenes tan estrechos gracias a un eficaz control llevado a cabo por la célula (Miller, 1991) gracias a las Ca^{2+} -ATPasas, el intercambiador Na^{+} - Ca^{2+} , los depósitos de calcio intracelulares (el retículo endoplasmático y la mitocondria) y las proteínas que unen calcio (calmodulina,...). La entrada de calcio se debe no sólo a la activación del receptor NMDA, también a los canales de calcio voltaje-dependiente activados por la despolarización y a la reversión del intercambiador sodio-calcio (Lee, y cols., 2000). Durante la isquemia hay una serie de cambios que conducen a la célula a un aumento en la concentración intracelular de calcio de varios órdenes de magnitud y este aumento produce un efecto letal (Orrenius y cols., 1989). Por una parte se pueden activar proteasas como la calpaína-I, que puede degradar proteínas estructurales como la tubulina, proteínas asociadas a microtúbulos o la espectrina o aumentar la producción de radicales libres (Hossmann y Kleihues, 1973). El calcio induce la activación de fosfolipasa A2 y fosfolipasa C que liberan ácido araquidónico (Bazan, 1989). El metabolismo de los ácidos grasos incluye enzimas como la ciclooxigenasa y la lipoxigenasa, que contribuyen al daño producido por radicales libres (Chan, 1996). Otra enzima activada por el aumento de la concentración de calcio es la isoenzima neuronal de la sintasa de óxido nítrico (nNOS). El óxido nítrico es altamente tóxico cuando se combina con el radical superóxido para producir peroxinitrito (Beckman y cols., 1990). El aumento de la concentración intracelular de calcio también va a provocar la liberación de zinc, metal de transición involucrado en la muerte neuronal (Choi y Koh, 1998; Weiss y cols., 2000). Normalmente, está unido a proteínas (metaloenzimas y factores de transcripción), y en el cerebro hay depósitos de este metal en las neuronas glutamatérgicas (Frederickson, 1989; Palmiter y cols., 1996), de las que se libera después de procesos isquémicos (Tonder y cols., 1990). El zinc puede ejercer su neurotoxicidad por radicales libres o por activación de caspasas (Kim y cols., 1999; Lobner y cols., 2000).

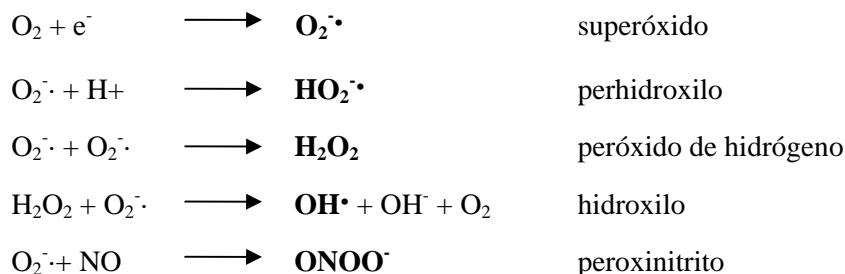
D) Acidosis

Después de un proceso isquémico se produce una reducción en el pH intracelular a 6,4-6,7 (Hakim y Shoubridge, 1989; Kagansky y cols., 2001). La acidosis se debe principalmente a la

producción de ácido láctico por la glucólisis anaeróbica y se ha visto que esta acidosis incrementa el daño isquémico *in vivo* (Lascola y Kraig, 1997).

E) Daño oxidativo

Las especies reactivas de oxígeno están presentes en el desarrollo de muchos procesos neurodegenerativos (Kontos, 1985). La principal implicación está en la reperfusión tras la isquemia, donde hay un aporte de oxígeno que puede ser sustrato de numerosas reacciones de oxidación y fuente de especies reactivas de oxígeno. Además, en esta etapa, las defensas antioxidantes (superóxido dismutasa (SOD), glutatión, catalasa, ácido ascórbico o tocoferol) están desequilibrados por la gran cantidad de radicales producidos durante la isquemia.



La mayoría de las especies reactivas de oxígeno y nitrógeno responden a la definición de radical, aunque hay excepciones (el peroxinitrito no es un radical, aunque es muy oxidante). Un radical se define como una especie capaz de existir independientemente teniendo 1 ó 2 electrones desapareados, paramagnética y muy activa. Algunos de ellos se producen en procesos fisiológicos (metabolismo de la xantina oxidasa, metabolismo de aminoácidos aromáticos, respiración mitocondrial,...), pero durante un proceso isquémico, como se ha explicado antes, se producen en mucha mayor medida.

2. 2 Cambios moleculares

Algunos de los eventos celulares, descritos previamente, como son el aumento de Ca^{2+} intracelular, de las especies reactivas de oxígeno (ERO), así como la propia hipoxia, son capaces de desencadenar la expresión de genes. Así, tras una isquemia focal realizada en ratas mediante la oclusión de la arteria cerebral media (-MCAO- método experimental más utilizado y que más se asemeja a lo ocurrido en un infarto isquémico humano), pueden detectarse cinco ondas temporales de expresión génica (ver figura 2). En realidad, ahora

sabemos que las diferentes ondas se entremezclan y podemos encontrar expresión de genes en diferentes momentos. Es interesante destacar el hecho de que muchos de los mediadores que a continuación vamos a exponer pueden participar con propiedades neuroprotectoras o neurotóxicas en los procesos secundarios al daño isquémico.

1ª “onda”: genes de expresión temprana, (GET).

Entre ellos se encuentran c-fos, c-jun, zif 268, jun-B, NF-κB (Factor nuclear-κB), HIF-1 (Factor-1 inducible por hipoxia) y IRF1 (Factor-1 regulador del interferón) (Hsu y cols., 1993; Nowak y col., 1990; Uemura y cols., 1991). Su expresión es temporal y transitoria y participan en muchos procesos que iremos describiendo.

Por ejemplo, NF-κB posee un doble papel, bien neuroprotector favoreciendo la supervivencia neuronal, bien neurotóxico como mediador de la muerte a través de mecanismos directos o indirectos. Las manipulaciones farmacológicas o genéticas de NF-κB pueden ser útiles en el tratamiento de muchas enfermedades del SNC en donde existe un aumento de la expresión de este gen (para revisión ver Mattson y cols., 2000).

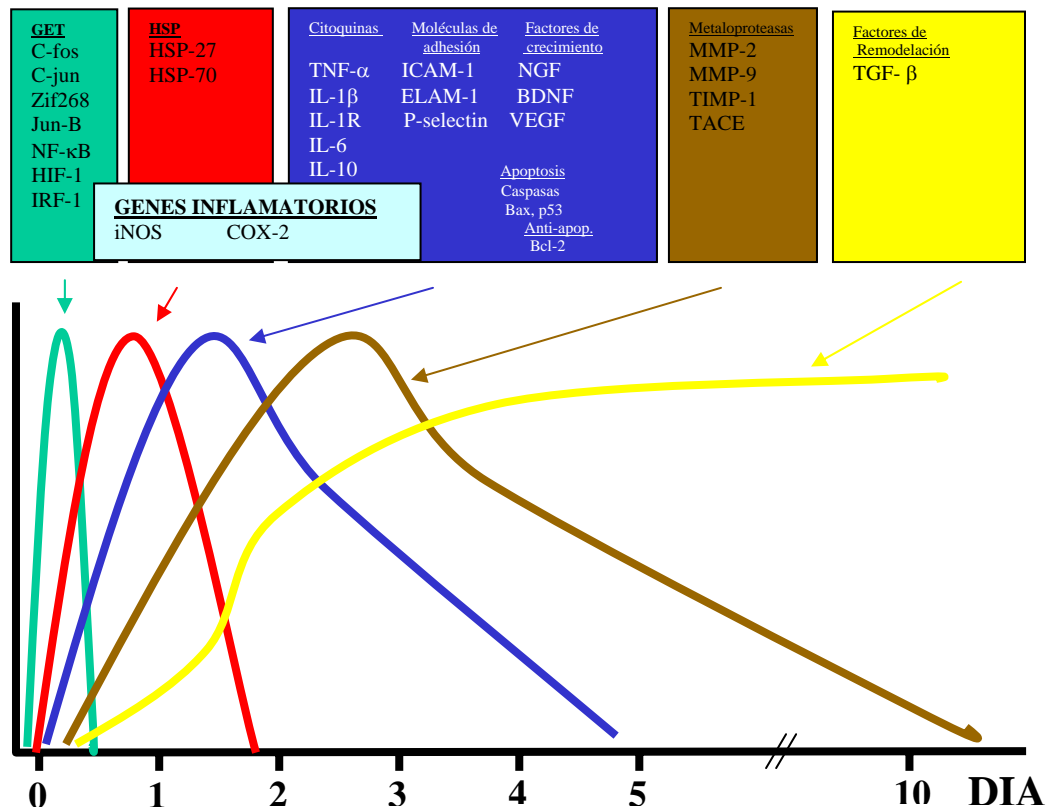


Figura 2. Representación de las cinco ondas temporales de expresión génica.

Es interesante señalar que algunos factores de transcripción que se expresan como NF- κ B son necesarios para la posterior expresión de enzimas inflamatorios, como la iNOS (sintasa del óxido nítrico inducible) y la COX-2 (ciclooxigenasa tipo 2), cuya expresión está aumentada tras la isquemia cerebral y que participan en el daño neuronal asociado a esta condición. Existen numerosos trabajos en donde se demuestra que la inhibición farmacológica de la actividad de iNOS/COX-2 confiere protección frente al daño isquémico. Además, la utilización de animales deficientes genéticamente en estos genes han demostrado este papel neurotóxico (para revisión ver Iadecola 1997; Lipton 1999).

2ª “onda”: Proteínas de choque térmico (-heat shock proteins- HSP).

Su mRNA se expresa entre 1 ó 2 horas tras la isquemia y desaparece en 1 ó 2 días (Welsh y cols., 1992). Las proteínas de choque térmico han sido implicadas en procesos de remodelación de proteínas desnaturalizadas y la expresión de sus genes parece que está limitada a zonas cuyo flujo sanguíneo está disminuido en más de un 50%. Se ha descrito aumento de expresión de HSP-27 y HSP-70 tras isquemia focal (Bates y cols., 2001). Y de nuevo pueden tener un papel protector (para revisión ver Sharp y cols., 1999).

3ª “onda”: Mediadores pro-inflamatorios.

Esta tercera onda aparece entre 1-3 horas tras la isquemia con un pico máximo a las 12-24 horas, para desaparecer a los 2-3 días. Entre estos mediadores, encontramos:

Citoquinas, como TNF- α (Factor de necrosis tumoral- α) e IL-1 β (Interleuquina-1) que, a su vez, inducen la expresión de moléculas de adhesión, inician la reacción inflamatoria y activan la expresión de genes relacionados con la inflamación como los de iNOS y COX-2. Las citoquinas pro-inflamatorias (TNF- α , IL-1 β) han sido implicadas fundamentalmente en el daño isquémico y existen trabajos en donde la administración de anticuerpos anticitoquinas confiere protección. Sin embargo, también se han detallado para algunas de estas citoquinas acciones protectoras (que en el caso de TNF- α se detallarán posteriormente).

Moléculas de adhesión, como ICAM-1 (Molécula de adhesión intercelular-1), ELAM-1 (Molécula de adhesión endotelial-1) y P-selectina, que establecen la adhesión endotelial de leucocitos previa a su infiltración (Wang y cols., 1994, 1995a; Okada y cols., 1994). En este

sentido, el uso de moléculas anti-adhesión produce una disminución del tamaño de los infartos.

Factores de crecimiento, como NGF (Factor de crecimiento nervioso), BDNF (Factor neurotrófico derivado del cerebro) y VEGF (Factor vascular de crecimiento endotelial), y *genes* pro-apoptóticos (Bax, caspasas y p53) o anti-apoptóticos (Bcl-2).

Existe abundante bibliografía acerca del papel neuroprotector de la administración de factores de crecimiento en los modelos de isquemia (ver Lipton 1999) y, de hecho, actualmente se está trabajando intensamente en manipulaciones farmacocinéticas para aumentar la eficacia de estos factores ya que, al ser de naturaleza peptídica, por una parte no atraviesan la barrera hematoencefálica y por otra son metabolizados rápidamente por el hígado.

4ª “onda”: enzimas proteolíticas de matriz.

Dentro de la familia de las metaloproteasas, las metaloproteasas de matriz (MMP) han sido implicadas en la remodelación de la matriz extracelular en situaciones normales, pero en condiciones patológicas atacan sustratos como parte de una respuesta neuroinflamatoria (Rosenberg y cols., 1998). Se sintetizan en forma de proenzimas que requieren activación por otras proteasas para ser activas. En su control participan otros componentes, los inhibidores tisulares de metaloproteasas (TIMPs), que también se sintetizan por los tejidos para la regulación del proceso proteolítico y que veremos ampliamente. Se ha descrito aumento de expresión de MMP-9 y MMP-2 y TIMP-1 (Rosenberg y cols., 1996) tras una isquemia. Existen algunos trabajos sobre el papel neuroprotector de inhibidores selectivos de MMPs (Rosenberg y cols., 1998) y recientemente se han desarrollado animales genéticamente deficientes en MMP-9 en los que se ha evidenciado que presentan infartos cerebrales de menor tamaño que los animales nativos (Asahi y cols, 2000).

Otras metaloproteasas cuya expresión parece variar tras la isquemia son las ADAMs (*a disintegrin and metalloproteinase*) en concreto la TACE/ADAM17 (TNF- α converting enzyme) que contribuye al aumento de la liberación de TNF- α y que se comentará ampliamente.

5ª “onda”: factores de remodelación.

Uno de ellos es el TGF- β (Factor de crecimiento transformante- β) (Wang y cols, 1995b) que está implicado en procesos de remodelación.

Por lo tanto, podemos resumir que en el proceso inflamatorio cerebral asociado a la isquemia, se produce adhesión e infiltración de neutrófilos, seguidos por monocitos y macrófagos (Clark y cols., 1993). Por otro lado se produce la activación, proliferación e hipertrofia de la microglía residente, dando todo ello lugar al fenómeno conocido como “gliosis”. La gliosis es inducida por citoquinas como TNF- α , IL-1 β y IFN- α (Balasingam y cols., 1994) y moléculas de adhesión como CD11/CD18 integrinas, ICAM-1, ELAM-1 y P-selectina (Pober y Cotran, 1990). Las citoquinas pueden ser sintetizadas por células de la microglía, astrocitos y neuronas, pero además por células periféricas como fagocitos mononucleares y polimorfonucleares que pueden atravesar la barrera hematoencefálica, ya que ésta se encuentra alterada en la isquemia cerebral (García y Kamijo, 1974).

La activación de los astrocitos tiene la función de reparar el tejido dañado, mediante la restauración del aporte sanguíneo y el restablecimiento de la integridad de la barrera hematoencefálica (Norton y cols., 1992). Pero también produce daño tisular, porque contribuye a la peroxidación lipídica y existe liberación de enzimas citolíticas (Kochanek y Hallenbeck, 1992).

2.3 Apoptosis

En 1972, se acuñó el término *apoptosis* (palabra griega usada para describir el proceso de caída de hojas en los árboles) para referirse a un tipo especial de muerte celular que es programada y por tanto distinta de la necrosis (Bursch y cols., 1992). La apoptosis o muerte celular programada tiene un papel fundamental en procesos fisiológicos. Así, en condiciones normales existe un equilibrio entre la reproducción celular y la apoptosis con el fin de mantener una población adecuada en el momento en el que los tejidos han llegado al estado adulto. Este tipo de muerte se diferencia de la necrosis en sus características estructurales y bioquímicas de forma que la apoptosis necesita la activación de proteasas y síntesis de mRNA y proteínas. En sus primeras fases, las células apoptóticas pierden el contacto con las células adyacentes y sufren condensación del citoplasma, pérdidas de las estructuras especializadas de superficie, alteración en la membrana plasmática ya que la fosfatidilserina

se transloca desde el interior al exterior celular, condensación y fragmentación de la cromatina nuclear y formación de protuberancias en la superficie celular. A continuación, las protuberancias de la superficie se separan en múltiples cuerpos apoptóticos que contienen fragmentos nucleares y orgánulos intactos que son fagocitados (Kerr y Harmon, 1991).

En un principio sólo la necrosis había sido relacionada con enfermedades neurodegenerativas, pero en los últimos tiempos hay evidencias que indican que la apoptosis contribuye a la muerte neuronal en enfermedades como la de Alzheimer (Liu, 1999), Parkinson (El-Agnaf y cols., 1998) y la de Huntington (Sawa y cols., 1999). En cuanto a lo que ocurre en los procesos isquémicos, en un principio se pensó que las células morían fundamentalmente por la necrosis asociada a la excitotoxicidad, pero en la actualidad se sabe que en una isquemia focal hay una zona central donde las células mueren por necrosis y una zona periférica donde mueren por apoptosis (para revisión ver Mattson, 2000).

La apoptosis se caracteriza por la activación de proteasas llamadas caspasas, que son las responsables de los cambios morfológicos y bioquímicos que se producen en las células. Las caspasas son un grupo de enzimas proteolíticas que tienen cisteína en su grupo activo, están presentes en las células en forma inactiva (procaspasas) y pueden dividirse en tres grupos:

1. Caspasas implicadas en la producción de citoquinas (ICE o caspasa 1 y 4).
2. Caspasas iniciadoras que transmiten o propagan el programa apoptótico (2, 8, 9 y 10).
3. Caspasas efectoras que rompen sustratos selectivos (3, 5, 6, 7, 11, 12, 13 y 14).

La primera caspasa que se describió fue la caspasa 1 o ICE (Interleukin 1 β converting enzyme), homóloga en mamíferos de la proteína CED 3 de *Caenorhabditis elegans* (Thornberry y cols., 1992).

La activación de las caspasas puede ser iniciada por dos vías. En la primera de ellas (extrínseca) ligandos como TNF- α , FasL o TRAIL (Apo3L), se unen a sus receptores en la superficie celular. Esta cascada apoptótica clásica comienza con la unión al receptor de muerte que tiene un dominio citoplasmático (dominio de muerte) que va a servir para la activación de caspasas iniciadoras o señalizadoras, tales como la caspasa 8. La otra vía (intrínseca) implica a la mitocondria, que libera el citocromo c el cual activa a la proteína

activadora de caspasa o Apaf1 y ésta causa la unión de un complejo activador de caspasas llamado apoptosoma.

Además, se ha comprobado que el receptor de NMDA está implicado en la apoptosis por activación de caspasas (Tenneti, 1998), y recientemente se ha descrito que el NO induce la nitración y liberación del citocromo c (Hortelano y cols., 1999), hecho que se considera iniciador de la apoptosis.

La apoptosis es un proceso finamente regulado cuyos principales reguladores intracelulares son la familia de proteínas relacionadas con Bcl-2. Esta familia está constituida por 15 miembros hasta el momento (Chao y Korsmeyer., 1998). Algunos miembros de esta familia inhiben la muerte celular (como por ejemplo, Bcl-2 y Bcl-X_L) y otros la activan (bax, Bad y Bid).

3. GLUTÁMICO

Varios aminoácidos desempeñan funciones como neurotransmisores. Así, según la modificación del potencial de membrana postsináptico que producen, los aminoácidos han sido separados en dos clases generales:

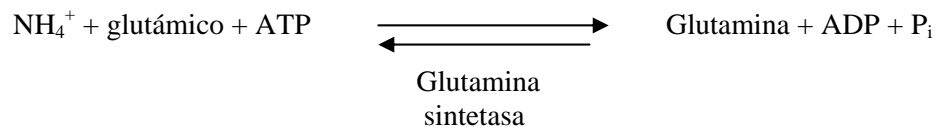
*AAE(*excitadores o despolarizantes*): glutámico, aspártico, cisteínico y homocisteínico.

*AAI (*inhibidores o hiperpolarizantes*): GABA (gammaaminobutírico), glicina, taurina y β-alanina.

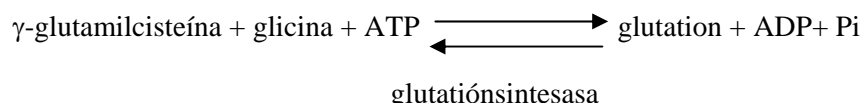
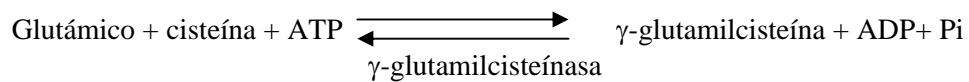
Es muy importante conocer la fisiología del glutámico como neurotransmisor para poder comprender así su implicación en la patología de la isquemia cerebral, por lo que a continuación vamos a estudiar sus funciones más importantes en el SNC.

3.1 Funciones metabólicas

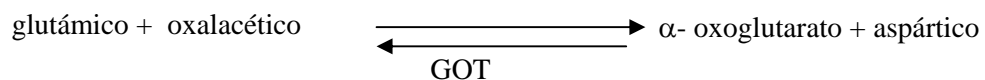
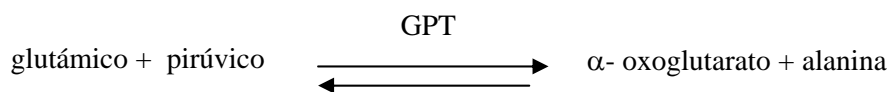
Aunque el glutámico se encuentra circulante en sangre, éste contribuye poco a los niveles extracelulares cerebrales, ya que es mayor la cantidad liberada que la captada a través de la barrera hematoencefálica. El glutámico es un aminoácido que está muy involucrado en el metabolismo neuronal pues, además de su utilidad al cerebro como aminoácido disponible para la síntesis proteica, presenta otras funciones:

1) *Síntesis de glutamina:*

Aunque el origen del NH_4^+ en el cerebro no está muy claro, sí se ha comprobado que la elevación de sus niveles es muy tóxica, estando relacionada con la aparición de convulsiones, por lo que su detoxificación es muy importante. Los niveles de glutamina parecen estar regulados por la difusión de ésta a la circulación general y su detoxificación en el riñón.

2) *síntesis de glutatión:*

El glutatión es un péptido que interviene como coenzima en numerosas reacciones de óxido-reducción. Además, por este motivo, funciona como agente antioxidante.

3) *síntesis de aminoácidos:*

GPT: glutámico-pirúvico transaminasa.

GOT: glutámico-oxalacético transaminasa.

El aspártico, de forma similar al glutámico, tiene actividad excitadora en el cerebro, y también detoxifica el NH_4^+ mediante la formación de asparagina. Además interviene en la síntesis *de novo* de nucleótidos y de ácido arginosuccínico.

4) *Precursor de GABA:*



GDC = glutámico descarboxilasa.

El GABA es uno de los aminoácidos hiperpolarizantes más importantes, que se encuentra en la mayoría de las sinapsis inhibitorias.

Por sus funciones metabólicas, durante algún tiempo se descartó la función neurotransmisora del glutámico; se pensaba que era simplemente un metabolito ampliamente distribuido en el SNC, pero estudios posteriores avalaron su función neurotransmisora como explicaremos a continuación.

3.2 Función de neurotransmisor

Se ha comprobado que el glutámico cumple los requisitos fundamentales de los neurotransmisores (ver figura 3); es decir, se encuentra almacenado presinápticamente en vesículas que, tras una despolarización, lo liberan en cantidad suficiente para producir una respuesta postsináptica, que dura sólo lo necesario, ya que es aclarado de la hendidura sináptica por **recaptadores específicos** (no se han descrito enzimas hidrolíticas a diferencia de otro tipo de sinapsis).

Se conocen cinco recaptadores de glutámico:

GLAST (Storck y cols., 1992) y GLT-1 (Pines y cols., 1992) que se encuentran en astrocitos y cuyos homólogos en humanos son EAAT1 y EAAT2 respectivamente. Ambos se encuentran en el cerebro y en astrocitos fundamentalmente.

EAAC1 (Kanai y Hediger, 1992) cuyo homólogo humano es EAAT3, que está en neuronas.

EAAT4 que se encuentra en células de Purkinje (Fairman y cols., 1995).

EAAT5 que está en neuronas de la retina (Arriza y cols., 1997).

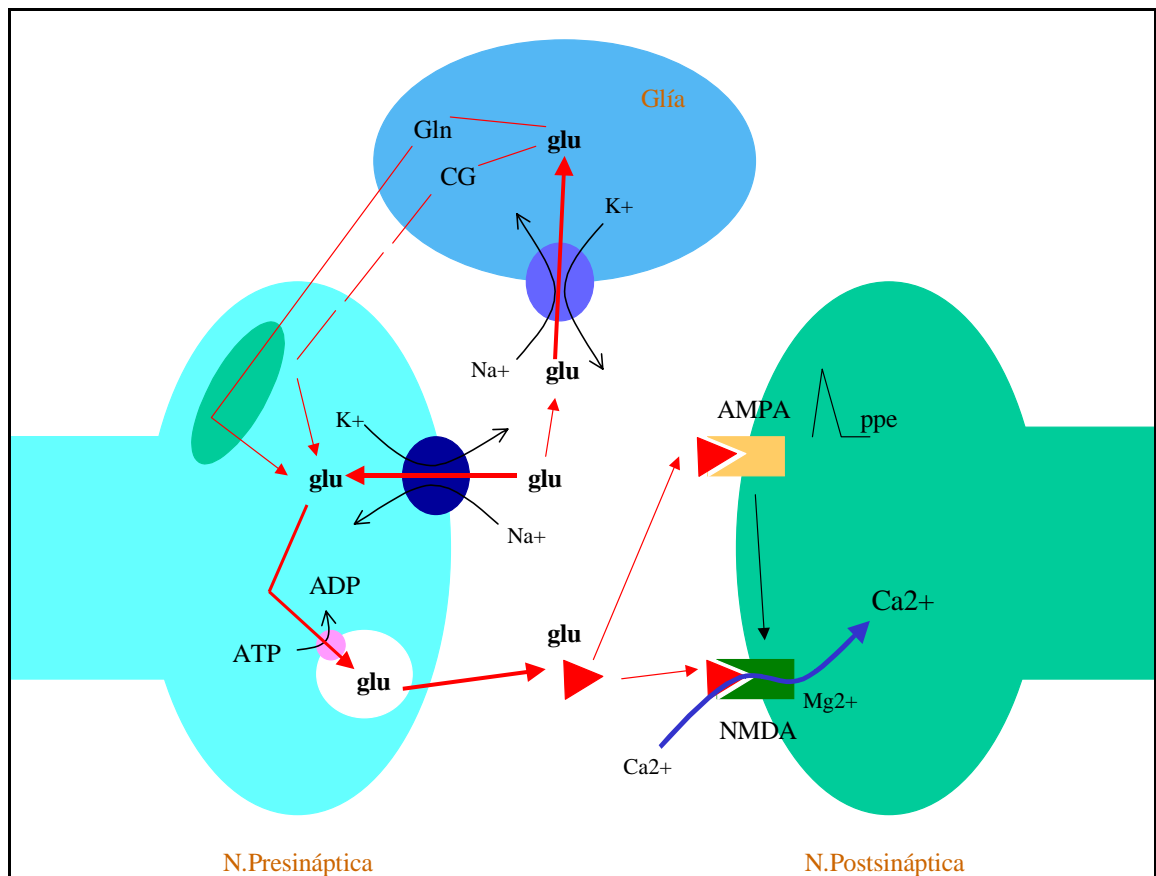


Figura 3. Sinapsis glutamatérgica. Nomenclatura: Gln: glutamina; CG: cetoglutarato; glu: glutámico; ppe: potencial postsináptico excitatorio.

Una vez liberado, el glutámico se une a su **receptor**. Existen receptores específicos de glutámico a nivel postsináptico que, al activarse, producen la apertura de canales iónicos de membrana a los que se encuentran asociados, llamados receptores ionotrópicos y cuyas características están resumidas en la tabla 3, éstos dan lugar a la despolarización postsináptica.

	NMDA Sitio glutámico	NMDA Sitio glicina	AMPA	Kainato
Agonista Selectivo	NMDA Aspártico	Glicina D-serina	AMPA	Kainato Ac. domoico
Antagonista Selectivo	D-AP5 Ly233053	Diclorokinurenico MNQX	NBQX GYKI53655 (no competitivo)	LY294486
Bloqueantes de Canal	Mg ²⁺ Dizocilpina / MK-801		Poliaminas intracelulares	Poliaminas Intracelulares selectivas
Efectores	Canales de alta conductancia Na ⁺ /Ca ²⁺ /K ⁺	Activación del receptor	Canales de baja conductancia Na ⁺ /K ⁺	Canales de baja conductancia Na ⁺ /K ⁺
Información estructural	Heterooligómero formado por combinación de NR1/NR2A-D		Homo o heterooligómero de las subunidades GluR5-7, KA1 o KA2	
Distribución y función	SNC, muy alta densidad en hipocampo y cortex. Plasticidad.		Similar al NMDA Formación del Potencial Postsináptico Excitatorio.	

Tabla 3. Receptores de glutamato ionotrópicos.

Pero además existe otro tipo de receptores denominados metabotrópicos (asociados a proteínas G), de los cuales se han identificado 8 subtipos diferentes y cuyas características se encuentran en la tabla 4. Estos receptores se encuentran situados en la terminación presináptica y en la postsináptica, por lo que se piensa que tienen funciones reguladoras sobre la liberación de glutámico y sobre la actividad de los receptores ionotrópicos postsinápticos.

<u>Nombre</u>	<u>Otro nombre</u>	<u>Agonista selectivo</u>	<u>Antagonista selectivo</u>
mglu ₁	MGluR ₁	DHPG	AIDA
mglu ₂	MGluR ₂	LY354740	LY341495
mglu ₃	MGluR ₃	LY354740	LY341495
mglu ₄	MGluR ₄	L-AP	MAP4
mglu ₅	MGluR ₅	CHPG	4CPG
mglu ₆	MGluR ₆	Homo-AMPA	MPA4
mglu ₇	MGluR ₇	LSOP	
mglu ₈	MGluR ₈	LSOP	MPPG

Tabla 4. Receptores de glutamato metabotrópicos.

Entre los ionotrópicos ha sido ampliamente estudiado el complejo receptor NMDA-canal iónico (para revisión ver Cooper y cols., 1991), el cual tiene los siguientes dominios o sitios de unión: (ver figura 4)

**Dominio para agonistas:* L-glutámico, NMDA; y *antagonistas competitivos:* D-AP5, CPP-2.

**Dominio para modulador alostérico positivo:* glicina; y *antagonistas:* 5,7-diclorokinurenato.

**Dominio para bloqueantes del canal:* fenciclidina (PCP) y compuestos relacionados como MK-801 (dizocilpina).

**Dominio para el bloqueo del canal por Mg²⁺ "voltaje-dependiente"* permanentemente unido en condiciones de reposo.

**Dominio para la unión inhibitoria de Zn²⁺.*

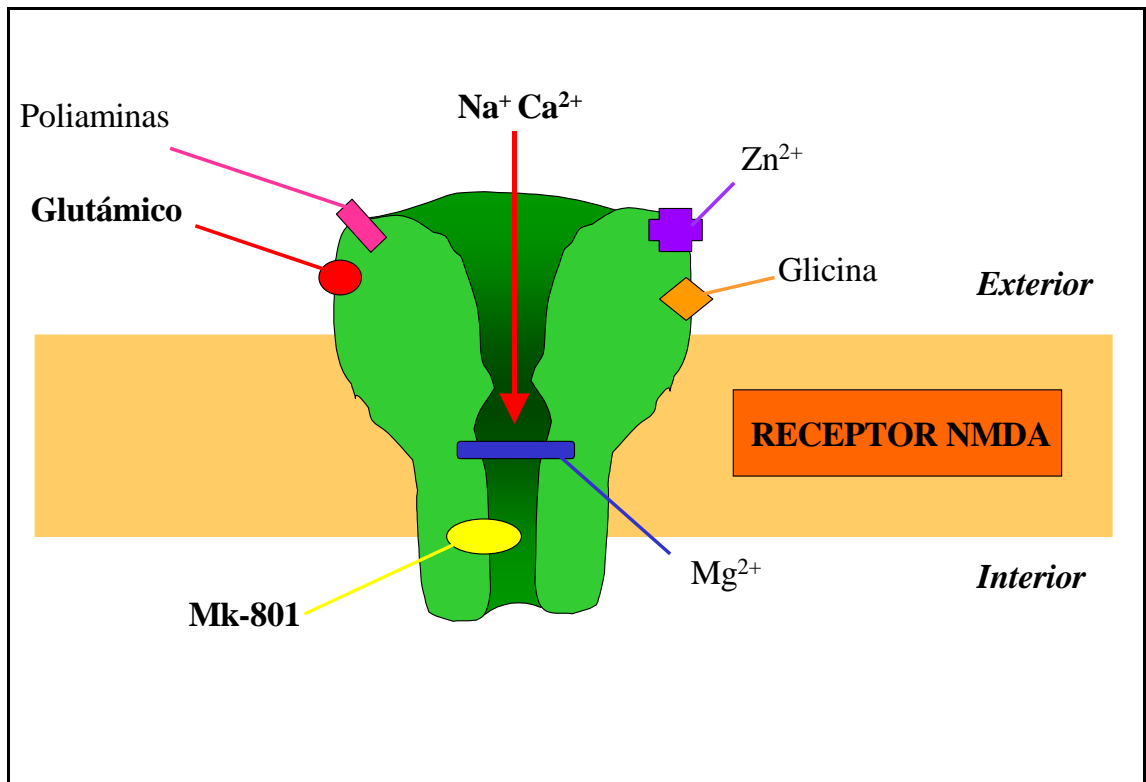


Figura 4. Receptor N-metil-D-aspartato.

Este canal necesita que se den tres condiciones para poder abrirse, cada una de las cuales es necesaria pero no suficiente por sí misma para abrir el canal NMDA. Primero, la célula debe despolarizarse previamente (mediante la unión de glutámico al subtipo de receptor AMPA se produce el Potencial Postsináptico Excitatorio) para liberar al subtipo de receptor NMDA de su bloqueo con Mg^{2+} ; segundo, debe estar presente un ligando que active el receptor NMDA (por ejemplo, glutámico), y tercero, la glicina debe unirse como co-agonista

4. METALOPROTEASAS

4.1 Metaloproteasas de matriz

Las metaloproteasas de matriz (MMPs) son unas enzimas proteolíticas (Zn-dependientes) que se encargan de remodelar los componentes de la matriz extracelular (MEC). Recientemente se las ha implicado en la regulación de una gran cantidad de procesos tanto fisiológicos como patológicos. Así fisiológicamente, son importantes en la ovulación, implantación del blastocito y en la angiogénesis. Patológicamente se sabe que están implicadas en la aparición de metástasis, en la artritis reumatoide, en la aterosclerosis y en enfermedades del SNC como la esclerosis múltiple (Gijbels y cols., 1992), la enfermedad de Alzheimer y la isquemia (Rosenberg y cols., 1996).

La clasificación de esta familia de enzimas se ha ido modificando y aunque se tiende a agruparlas según la estructura en dominios de la proteína, el criterio empleado es el que tiene en cuenta el sustrato sobre el que las MMPs actúan específicamente (tabla 5). Actualmente se conocen seis subfamilias de MMPs: 1) las **colagenasas**, que degradan el colágeno del tejido conectivo, gelatina y proteoglicano; 2) las **gelatinasas**, que actúan sobre los colágenos tipo IV, V, VII, X y XIV, la elastina, la fibronectina, la vitronectina y los colágenos desnaturalizados; 3) las **estromelisin** que degradan colágenos tipo III, IV, X, la elastina, la fibronectina, la vitronectina y la gelatina; 4) las **matrilisin** que degradan el núcleo de proteoglicanos de proteínas, caseína, elastina, fibronectina, gelatina y vitronectina; 5) las **MMPs de membrana** que degradan colágenos tipo I, II, III, elastina, fibronectina, gelatina y laminina; 6) otras MMPs, como por ejemplo **metaloelastasas**, **enamelin**, **epilisin**... Hasta ahora se han identificado 25 miembros de la familia de las MMPs.

Las MMPs pueden definirse por las siguientes características: 1) comparten secuencias de aminoácidos comunes, 2) su acción proteolítica es inhibida por los inhibidores tisulares de las metaloproteasas o TIMPs, 3) son secretados como proenzimas o bien existen como proenzimas transmembrana, pero, en cualquier caso, requieren ser activadas para llevar a término sus acciones, 4) el sitio activo contiene zinc (Zn^{+2}).

Todas las MMPs contienen tres dominios diferentes (ver figura 5): el propeptídico, el dominio catalítico y el extremo C-terminal. Respecto a la forma de actuar, se sabe que son secretadas como proenzimas que requieren ser activadas. Existen dos inhibidores fisiológicos de las MMPs: la α_2 -macroglobulina y la familia de los TIMPs.

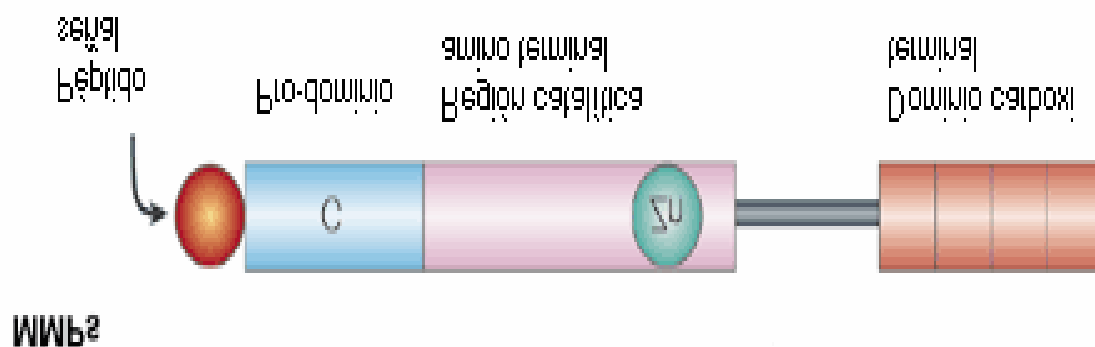


Figura 5. Estructura de las MMPs

<i>MMP</i>	<i>NOMBRE</i>	<i>SUSTRATO</i>
MMP1	Colagenasa 1	Colágeno I, II, II,VII, X, Gel, PG
MMP2	Gelatinasa A	Colágeno I,III,IV,V,VII, X, XI, XIV, EL, FN, Gel, LN, PG, VN
MMP3	Estromelisinina 1	Colágeno III, IV, IX, X, XI, EL, FN, Gel, LN, PG, VN
MMP7	Matrilisina	Colágeno IV,X, Caseína, EL, FN, Gel, LN, PG, VN
MMP8	Colagenasa 2	Colágeno I, II,III,V,VII, X, EL, FN, Gel, LN
MMP9	Gelatinasa B	Colágeno IV,V,VII,X,XIV, EL, FN, Gel, LN
MMP10	Estromelisinina 2	Colágeno III,IV,V,IX,X, EL, FN, Gel, LN, PG
MMP11	Estromelisinina 3	
MMP12	Metaloelastasa	Colágeno IV, caseína, EL, FN, Gel, LN, PG, VN
MMP13	Colagenasa 3	Colágeno I,II,III,IV,VII,IX,X,XIV, FN, Gel
MMP14	MT1-MMP	Colágeno I,II,III, EL, FN, Gel, LN
MMP15	MT2-MMP	FN, Gel, LN
MMP16	MT3-MMP	Colágeno III, Gel, FN
MMP17	MT4-MMP	Fibrinógeno, Fibrina
MMP18	Colagenasa 4	Colágeno I
MMP19	RAS I 1	Colágeno IV, Gel, FN, LN
MMP20	Enamelisina	Amelogenina
MMP21	<i>Xenopus</i> MMP	
MMP22	MMP de embrión de pollo	Caseína, Gel
MMP23		
MMP24	MT5-MMP	Gel
MMP25	MT6-MMP	Colágeno IV, Gel, FN
MMP26	Matrilisina 2	
MMP27	MMP22 humana	
MMP28	Epilisina	Caseína

Gel, gelatina; PG, proteoglicano; EL, elastina; FN, fibronectina; LN, laminina; VN, vitronectina

Tabla 5. Familia de MMPs

4.2 ADAMs

Las ADAMs (*a disintegrin and metalloprotease*) son una familia de proteínas localizadas en la superficie de las células, que contienen un dominio desintegrina y un dominio metaloproteasa lo que hace que tengan características de moléculas de adhesión y de proteasas (Schlöndorff y Blobel, 1999). Se conocen 23 miembros de la familia (ver Tabla 6). Las primeras ADAMs que se describieron estaban implicadas en funciones de reproducción, fundamentalmente espermatogénesis y unión del espermatozoido al óvulo (ADAM1 y ADAM2). Recientemente a las ADAM9, 10 y 17 se las ha implicado en la liberación y/o activación de proteínas de la superficie celular (Schlöndorff y Blobel, 1999).

La mayoría de las ADAMs tienen (ver figura 6): 1) un pro-dominio; 2) una región metaloproteasa; 3) una región desintegrina; 4) una región rica en cisteína; 5) repeticiones del factor de crecimiento epidérmico (EGF); 6) una región transmembrana y 7) una región citoplasmática (Killar y cols., 1999).

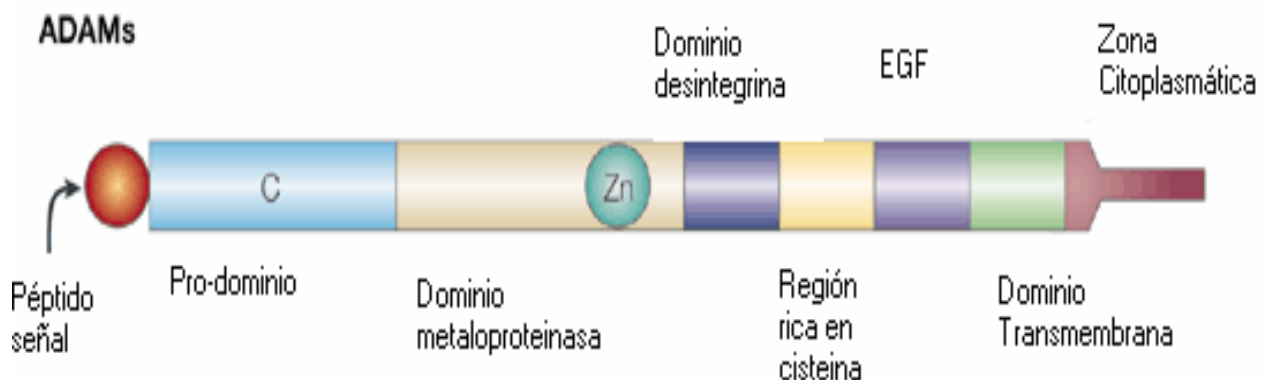


Figura 6. Estructura de las ADAMs

La mayoría de los miembros de la familia tienen una región citoplasmática, pero algunos pueden perderla cuando se transforman en la forma soluble y así entre las ADAMs que la pierden tenemos: ADAM11, 12 y 17.

Algunas de estas ADAMs se encuentran en el SNC, como ADAM10 que fue la que se describió en primer lugar y se encuentra en oligodendrocitos (Chantry y cols., 1992),

ADAM17 (TACE) que durante la realización de la presente tesis doctoral se encontró en células endoteliales y astrocitos de cerebro humano (Goddard y cols., 2001), o ADAM8 que se ha encontrado recientemente en neuronas y en oligodendrocitos (Schlomann y col., 2000). La expresión de TACE en SNC se detallará con profundidad más tarde.

Aquellas ADAMs que tienen actividad proteasa y que son ADAM1, 8-10, 12, 13, 15, 16, 17, 19 y 20 (Wolfsberg y White, 1998) esta actividad puede ser inhibida por quelantes de zinc como o-fenantrolina, EDTA y derivados del ácido hidroxámico

<i>ADAM N°</i>	<i>OTRO NOMBRE</i>
ADAM 1	Fertilina α
ADAM 2	Fertilina β
ADAM 3	Cyritestina, tMDC I
ADAM 4	tMDC V
ADAM 5	tMDC II
ADAM 6	tMDC IV
ADAM 7	EAP I
ADAM 8	MS2
ADAM 9	MDC 9, Metrilina γ
ADAM 10	MADM, Kuzbaniana
ADAM 11	MDC
ADAM 12	Meltrina α
ADAM 13	
ADAM 14	Adm-1
ADAM 15	Metargidina, MDC 15
ADAM 16	MDC 16
ADAM 17	TACE
ADAM 18	tMDC 15
ADAM 19	Meltrina β
ADAM 20	
ADAM 21	
ADAM 22	MDC 2
ADAM 23	MDC 3

Tabla 6. Familia de ADAMs

4.3 TACE (CONVERTASA DE TNF- α) /ADAM 17

4.3.1. Estructura de TACE

En 1997 dos grupos independientes de investigadores aislaron y clonaron la enzima TACE (Tumour necrosis factor- α converting enzyme) (Black y cols., 1997, Moss y cols., 1997). Como se ha explicado anteriormente, TACE es un miembro de la familia ADAM y por eso se llama también ADAM17. Esta enzima es la encargada de liberar el TNF- α que se encuentra unido a la membrana mediante un proceso llamado “shedding” (Black y cols., 1997; Moss y cols., 1997).

La estructura de TACE es, por tanto, la típica estructura de ADAM con los siguientes dominios (ver figura 6 y 7):

- 1) péptido señal del aa 1 al 17
- 2) dominio pro-peptídico, que se perderá para dar lugar a la TACE activa, del aa 18 al 216
- 3) lugar de unión a cisteína, del aa 181 al 188
- 4) región catalítica, del aa 217 al 474
- 5) sitio de unión al zinc dentro de la región catalítica, del aa 405 al 417
- 6) región desintegrina rica en cisteína, del aa 480 al 559. El término región desintegrina se aplicó a una región de 100 aa encontrada en un grupo de proteínas que son venenos de serpientes y que son homólogos a ADAMs. Esta región, en los venenos de serpiente se une a las integrinas de las plaquetas impidiendo la agregación. La función de este dominio en TACE se desconoce.
- 7) dominio EGF del 571 al 602
- 8) dominio transmembrana del 672 al 694
- 9) dominio citoplasmático del 694 al 824. Su función se desconoce, pero parece que es importante en funciones de señalización y de localización subcelular del enzima.

En la estructura de TACE también se encuentran 6 sitios de N-glicosilación en el dominio extracelular.

TACE se sintetiza como precursor en forma inactiva. Este precursor tiene en el prodominio un residuo de cisteína que se coordina con el Zn⁺² del sitio activo; así, para que el enzima sea activo es necesario que el prodominio sea eliminado del enzima dejando el Zn⁺² catalítico libre (Van Wart y Bikedal-Hansen, 1990; Roghani y cols., 1999; Loechel y cols.,

1999). Los radicales libres, incluido el NO, activan TACE porque forma un nitrosotiol con el residuo de cisteína del prodominio de TACE (Zhang y cols., 2000).

```

1   MRQSLFLTS VVPFVLAPRP PDDPGFGPHQ RLEKLDSSL S DYDILSLSNI
51  QQHSVRKRD LQTSTHVETLL TFSALKRHF K LYLTSSSTERF SQNFKVVVVD
101 GKNNESEYTVK WQDFFTGHVV GEPDSRVLAH IRDDDVIIRI NTDGAEYNIE
151 PLWRFVNDTK DKRMLVYKSE DIKNVSRLQS PKVCGYLKVD NEELLPKGLV
201 DREPPEELVH RVKRRADDPD MKNTCKLLV V ADHRFYRYMG RGEESTTTNY
251 LIELIDRVDD IYRNTSWDNA GFKGYGIQIE QIRILKSPQE VKPGEKHYNM
301 AKSYPNEEKD AWDVKMLLEQ FSFDIAEEAS KVCLAHLFTY QDFDMGTLGL
351 AYVGSPRANS HGGVCPKAYY SPVGKKNIYL NSGLTSTKNY GKTILTKEAD
401 LVTTHELGHN FGAEHDPDGL AECAPNEDQ GKYVMYPIAV SGDHENKMF
451 SNCSKQSIYK TIESKAQECF QERSNKVCGN SRVDEGEECD PGIMYLNNDT
501 CCNSDCTLKE GVQCSDRNSP CCKNCQFETA QKKCQEAINA TCKGVSYCTG
551 NSSECPPPGN AEDDTVCLDL GKCKDGKCIP FCEREQQLES CACNETDNSC
601 KVCCRDLSGR CVPYVDAEQK NLFLRKGKPC TVGFCDMNGK CEKRVQDVIE
651 RFWDFIDQLS INTFGKFLAD NIVGSVLVFS LIPWIPFSIL VHCVDKKLDK
701 QYESLSLFHP SNVEMLSSMD SASVRIIKPF PAPQTPGRLQ PAPVIPSAPA
751 APKLDHQRMD TIQEDPSTDS HMDEDGFEKD PFPNSSTAAK SFEDLTDHPV
801 TRSEKAASFK LQRQNRVDSK ETEC

```

Figura 7. Secuencia de TACE

4.3.2. “Shedding”: Liberación de TNF- α

El proceso de “shedding” consiste en la liberación de proteínas de membrana por rotura proteolítica (ver figura 8). El TNF- α va a ser liberado de la superficie celular mediante este proceso, gracias a la actuación del enzima TACE (Black y cols., 1997; Moss y cols, 1997). Las características del TNF- α se verán más tarde con profundidad. TACE es por tanto una “sheddasas” que se va a encargar de liberar el TNF- α unido a la membrana, pero también actúa sobre otros sustratos: TGF- α , L-selectina, receptor p75, receptor p55, el receptor tipo II de interleuquina 1 y el péptido β -amiloides (Buxbaum y cols., 1998; Merlos-Suárez y cols., 1998; Borland y cols., 1999; Peschon y cols., 1998; Reddy y cols., 2000).

Existen otras proteínas que también son “sheddasas” como es la BACE (β -secretasa) que al parecer es la principal encargada de liberar el péptido β -amiloide, principal componente de las placas amiloides en cerebros de pacientes con enfermedad de Alzheimer.

Se conoce poco sobre la regulación de este proceso, pero recientes estudios sugieren un mecanismo común (Merlos-Suárez y Arribas 1999; Müllberg y cols., 1997). Sí es conocido que este proceso puede ser acelerado por ésteres de forbol (PMA) que activan la proteína quinasa C y por el lipopolisacárido bacteriano (Gearing y cols., 1994; McGeehan y cols., 1994; Black y cols., 1997) y puede ser inhibido por inhibidores de metaloproteasas (derivados del ácido hidroxámico).

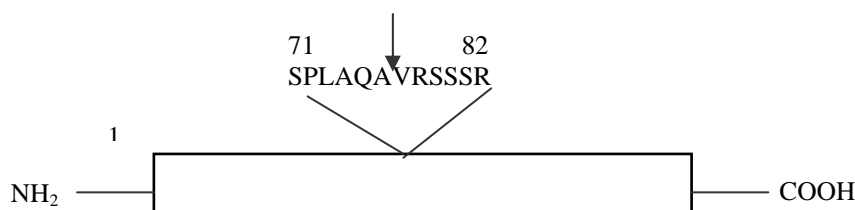


Figura 8. Sitio de corte de TACE en Pro-TNF- α

4.3.3. TACE en SNC

El TNF- α es una citoquina con distintas funciones y que está implicada en una gran variedad de enfermedades neurodegenerativas, incluida la isquemia cerebral (Feuerstein y Cols., 1994). Se han podido medir niveles de mRNA de TNF- α en adulto normal pero, a pesar de esta expresión de proteína, los niveles encontrados son muy bajos y localizados fundamentalmente en hipotálamo, hipocampo, corteza y cerebelo (para revisión ver Vitkovic y cols., 2000). Sin embargo, en un cerebro lesionado los niveles de TNF- α son mucho mayores detectándose en astrocitos, microglia, macrófagos y células endoteliales (Brosnan y cols., 1989). La presencia de mRNA de TACE en cerebro adulto de rata y ratón se ha demostrado recientemente, en concreto, durante la realización de esta tesis doctoral y parece ser que se limita a ciertas regiones como córtex, hipocampo y mesencéfalo (Kärkkäinen y cols., 2000). Además, y también durante la realización de esta tesis, Goddard y cols., 2001

han demostrado que TACE se expresa en astrocitos y células endoteliales de cerebros de humanos adultos.

El papel de TACE en la liberación de proteínas de membrana tanto a nivel fisiológico como patológico es bien conocido en otros sistemas, como se ha contado en el apartado anterior. Queda por resolver, por lo tanto, cuál es la función de TACE en el SNC y si hay alguna relación entre TACE y los procesos isquémicos.

4.3.4. Inhibidores de TACE

a) Inhibidores tisulares de metaloproteasas (TIMPs)

Ya comentamos anteriormente que una forma importante de regular la actividad de las MMPs es mediante los inhibidores tisulares de metaloproteasas (TIMPs). Se conocen cuatro TIMPs: TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3 y TIMP-4. Los TIMPs presentan en su estructura dos regiones diferenciadas: una región N-terminal de 125 aminoácidos y una región C-terminal de 65 aminoácidos; cada una de las regiones está estabilizada por tres puentes disulfuro. La unión de la región N-terminal del TIMP con una MMP inactiva la metaloproteasa de matriz.

De forma general los TIMPs inactivan a las MMPs pero no a las ADAMs, con la excepción de **TIMP-3**, que inhibe a ADAM17/TACE (Amour y cols., 1998). TIMP-3 presenta unas características únicas que le diferencian de los otros TIMPs: está unida a la matriz extracelular (Pavloff y cols., 1992), puede presentar mutaciones en la región N-terminal que se asocian con alteraciones como la distrofia macular (Felbor y cols., 1997) y se ha demostrado que una sobreexpresión de TIMP-3 produce un aumento de la apoptosis (Ahonen y cols., 1998).

b) Inhibidores derivados del ácido hidroxámico

Los inhibidores de MMPs que se sintetizaron en primer lugar fueron el **Marimastato** (BB-2516) y el **Batimastato** (BB-94) (Figura 9). Estos compuestos fueron diseñados con una estructura peptídica semejante a una región de la molécula de colágeno que va a ser cortada por la collagenasa.



Figura 9. Estructura de Marimastato y de Batimastat

El inhibidor se une fuertemente al sitio activo de la MMP de forma que el átomo de Zn^{+2} de este sitio será quelado por el grupo hidroxamato (-CONHOH). El principal problema de los derivados peptídicos es su baja biodisponibilidad por vía oral, por lo que se han sintetizado inhibidores no peptídicos (AG3340, BAY 12-9566). En la tabla 7, tomada de (Brown, 1999) se citan los principales inhibidores y sus principales usos.

Se ha visto que algunos de estos derivados tienen un perfil de inhibición más selectivo sobre las metaloproteasas con actividad “sheddas”, como la TACE. En concreto, el inhibidor de TACE usado en esta tesis doctoral es el BB-3103 (derivado del marimastato) cuya eficacia en la inhibición de TACE ha sido probada en macrófagos (Ancuta y cols. 1997; Middelhoven y cols., 1997; Mitsiade y cols. 1999; Sewter y cols. 1999).

Compuesto	Indicación	Estado
AG3340 (Collier y cols., 1997)	Cáncer	Fase II/III
BAY 12-9566 (Shah y cols., 1998)	Cáncer	Fase II/III
Marimastato BB-2516 (Millar y cols., 1998)	Cáncer	Fase II/III
Batimastato BB-94 (Eccles y cols., 1996)	Cáncer	Fase I
CGS 27023A (De B y cols., 1999)	Cáncer	Fase II
D2163 (Montana y cols., 1998)	Cáncer	Fase I
D1927 (Montana y cols., 1998)	Cáncer	Preclínica
BB-3644 (Zask y cols., 1996)	Esclerosis múltiple	Fase I
D5410 (Montana y cols., 1998)	Enfermedad inflamatoria	Fase II
Ro 32-3555 (Wood y cols., 1998)	Artritis	Fase I
RS 130830 (Zask y cols., 1996)	Osteoartritis	Fase I

Tabla 9. Inhibidores de MMP

5. TNF- α

El TNF- α (factor de necrosis tumoral) (Carswell y cols., 1975) es una citoquina producida por una gran variedad de células como linfocitos, queratinocitos, fibroblastos, monocitos y/o macrófagos (Chung y Benviste, 1990; Liberman y cols., 1989). También los astrocitos activados y la microglía pueden producir TNF- α como consecuencia de una inflamación, infección o lesión. También se ha podido demostrar que las neuronas son capaces de producir TNF- α después de una lesión (Tchelingerian y cols., 1993; Klein y cols.,

1993). Se conoció con el nombre de catequina ya que era la responsable de estados de caquexia asociada a infecciones bacterianas y cáncer.

La familia del TNF está compuesta por un conjunto de citoquinas que incluyen el TNF, Linfotoxina- α , Linfotoxina- β , Fas-L (ligando de Fas), CD-40L, CD30L, CD27L, TRAIL ó Apo2L, TWEAK ó Apo3L, RANK/TRANCE, LIGHT, VEGI, APRIL y THANK, hasta el momento actual (para revisión ver Bodmer y cols., 2000).

5.1. Estructura y características

El TNF- α es una proteína no glicosilada de 17 kDa y una longitud de 157 aa (la proteína de ratón es N-glicosilada).

En realidad es un trímero compuesto por 3 subunidades idénticas de 157 aa. Esta forma es producida a partir del procesamiento de un precursor de 233 aa y 26 kDa de peso (pro TNF- α). Este precursor presenta secuencias hidrofóbicas que le permiten su anclaje a la membrana plasmática. A partir de esta forma, por medio de ADAM17/TACE (Gearing y cols., 1994) se va a producir la liberación de la forma soluble madura. Una vez liberada al medio la forma soluble madura, tiende a formar complejos de diferente número de unidades, aunque la forma activa es el trímero (Jones y cols., 1989).

5.2. La superfamilia de receptores de TNF

Al igual que la familia de TNF, la de receptores está compuesta por un gran número; en total, han sido identificados más de 20 miembros. La mayoría de estos receptores activan una cascada de señales que incluyen a NF- κ B, proteín-quinasa (MAPK/ JNK/ P38) y apoptosis (Liu y cols., 1996).

Entre los miembros de esta familia nos encontramos un amplio número de funciones: algunos intervienen en la respuesta inflamatoria y se encuentran en la membrana de linfocitos T y B, como son los receptores CD27, CD30 y CD40 (Smith y cols., 1994), mientras que otros intervienen en procesos apoptóticos como Fas y TRAIL. Sin embargo, los primeros receptores clonados y conocidos, que se encuentran en una gran variedad de tipos celulares y aparecen más implicados en la respuesta del TNF- α son los TNFRI (p55) y TNFRII (p75) (Vandenabeele y cols., 1995).

Estos dos receptores de membrana a los que se une indistintamente el TNF- α y el TNF- β presentan las siguientes características: El receptor de 55 kDa o Tipo I (**TNFR1**), también se llama **CD120a** ó **p55**. Es un receptor de muerte. En general los receptores de muerte tienen una región extracelular rica en cisteína (Smith y cols., 1994), una región transmembrana y una región citoplasmática llamada región de muerte (Tartaglia y cols., 1993). Existen otros receptores de muerte bien caracterizados como por ejemplo: CD 95 también llamado Fas o Apo 1 (Smith y cols., 1994), CAR 1 (Brojatsch y cols., 1996), DR 3 (receptor de muerte 3) también llamado Apo3, WSL-1, TRAMP ó LARD (Chinnaiyan y cols., 1996)... Las moléculas que se unen a estos receptores están relacionadas estructuralmente y pertenecen a la superfamilia de TNF. El otro receptor al que se une el TNF- α es el receptor de 75 kDa o Tipo II (**TNFR2**), también llamado **CD120b** ó **p75**.

Una vez que el TNF- α se ha unido a su receptor, dependiendo de a cuál se una, se van a iniciar dos vías distintas, una que conduce a la muerte celular y la otra que dará lugar a un efecto antiapoptótico (ver figura 10). Los dos tipos de receptores son expresados en la mayoría de las células, aunque hay ligeras diferencias y así mientras que TNFR1 es expresado ubicuamente, TNFR2 se expresa fundamentalmente en células endoteliales y hematopoyéticas (Vandenabeele y cols., 1995). En cuanto a su localización en el SNC, se sabe que ambos tipos de receptores se expresan en oligodendrocitos (Tchelingerian y cols., 1994) y en neuronas del córtex, hipocampo, tálamo, mesencéfalo y cerebelo.

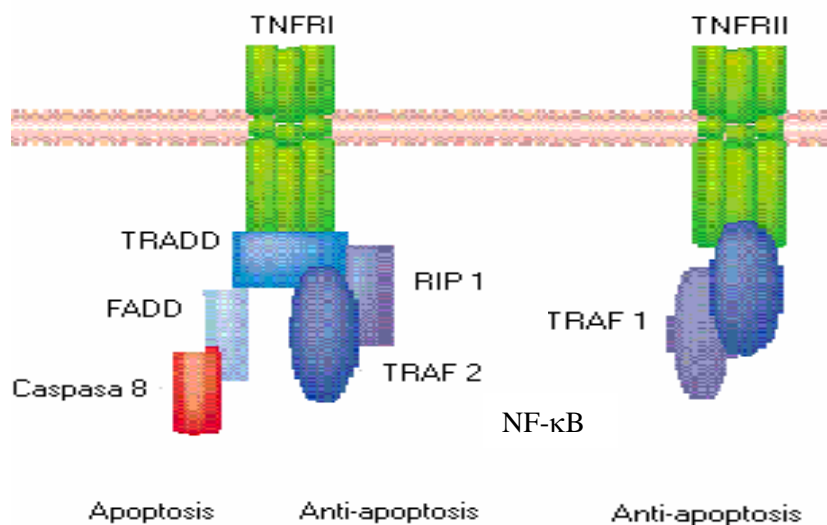


Figura 10. Receptores tipo I y tipo II de TNF- α

5.3. Transmisión de señales al citosol

El TNF- α se une a sus receptores TNFR1 y TNFR2 causando una iniciación de múltiples señales que darán lugar bien, a una activación de factores de transcripción o bien a una activación de caspasas produciendo apoptosis (ver figura 10).

Así, dependiendo de a que receptor se una el TNF- α , podemos tener una de estas dos vías:

1. Activación del **NF- κ B**, debido fundamentalmente a la unión de TNF- α al TNFR1. Esta unión provoca que una proteína llamada TRADD (TNFR-associated death domain) se una al receptor y esta unión a su vez, promueve la unión de proteínas adaptadoras (RIP1, TRAF2). Estas últimas proteínas, activan una quinasa inductora del NF- κ B (NIK) que va a fosforilar a I κ B-quinasa (IKK) (Karin y Delhase, 1998) de forma que se activa NF- κ B y se puede traslocar al núcleo, con la consiguiente señal antiapoptótica. Existe una ruta alternativa que se ha descrito en algunos tipos de células en las que el TNF- α activa la PI3-quinasa y ésta a su vez activa a Akt que fosforila IKK (Ozes y cols., 1999) y se activa NF- κ B.

Cómo se dijo al principio la activación de NF- κ B, se produce fundamentalmente por unión del TNF- α al TNFR1, pero no sólo. Así, la unión del TNF- α al TNFR2 hace que la proteína adaptadora TRAF1 se una al receptor y esto provoca una activación de NF- κ B.

Por lo tanto, y para resumir, las señales anti-apoptóticas del TNF- α se producen por activación de NF- κ B, a través de TNFR1, PI3-quinasa y TNFR2.

2. Activación de una cascada de **casapasas**, debido fundamentalmente a la unión de TNF- α al TNFR1. Esta unión provoca que la proteína TRADD se una al receptor y esta unión a su vez, va a promover la unión de una proteína adaptadora llamada FADD que activa a la caspasa 8 iniciándose así una cascada antiapoptótica.

5.4. Actividad biológica

Aunque originalmente se tomó al TNF- α como un agente antitumoral, en la actualidad se considera una de las principales citoquinas implicadas en la inflamación. Forma parte importante de la estimulación inmunogénica y de la resistencia a agentes infecciosos y tumores (Old, 1985). Por otra parte la sobreproducción de TNF- α durante una infección conlleva una toxicidad sistémica grave, siendo uno de los principales componentes del

desarrollo del shock séptico en respuesta a infecciones por Gram-negativos, que puede conducir a la muerte (Tracey y cols., 1987).

En definitiva el rango de actuaciones en el que interviene es muy amplio incluyendo apoptosis, diferenciación, proliferación y supervivencia.

El TNF- α actúa de un modo autocrino y paracrino (en células de las inmediaciones) a bajas concentraciones sobre los leucocitos y células endoteliales, causando:

*Aumento en la expresión de moléculas de adhesión en las células endoteliales, lo que facilita la adhesión de los leucocitos.

*Estimula los fagocitos mononucleares y otras células a producir citoquinas: IL-1, IL-6, IL-8.

*Puede ser un coestimulador en la activación de las células T y estimula la producción de anticuerpos por las células B.

*Ejerce una acción protectora frente a virus parecida a la del interferón, y aumenta la expresión de MHC-I (complejo mayor de histocompatibilidad), con lo que se incrementa la posibilidad de reconocimiento de esas células por los linfocitos Tc.

Si la concentración de TNF- α es muy alta, como sucede en el transcurso de una sepsis por gram-negativos, estas concentraciones de TNF- α pueden ser causantes de muerte por sí mismas. Estos efectos fatales pueden deberse a que producen contracción del miocardio, depresión del tono muscular (reducción del riego y presión sanguínea), trombosis intravascular debida a una estimulación de la coagulación y activación de los neutrófilos en los vasos produciendo trombos.

Aparte de estar involucrado en esta gran cantidad de funciones biológicas, se piensa que el TNF- α es mediador en una gran cantidad de enfermedades neurológicas incluyendo tanto enfermedades infecciosas e inmunológicas como la esclerosis múltiple (Hofman y cols., 1989; Probert y cols., 1995), la meningitis bacteriana (Leist y cols., 1988), la malaria (Grau y cols., 1989) y el SIDA (Tyor y cols 1992; Sippy y cols., 1995), así como lesiones, en principio, sin componente infeccioso, como, por ejemplo, la isquemia (Feuerstein y cols., 1994), de lo que se hablará ampliamente. También es importante su participación en enfermedades neurodegenerativas como las enfermedades de Parkinson (Mogi y cols., 1994) y de Alzheimer (Mattson., 1997).

5.5. TNF- α en SNC/isquemia cerebral

La isquemia cerebral produce un aumento en los niveles de RNAm de TNF- α a las seis horas después de la lesión (Feuerstein y cols., 1994). Este aumento se mantiene durante dos días y vuelve a niveles basales al quinto. La expresión de TNF- α coincide con la expresión de otras citoquinas, de moléculas de adhesión y de quimioquinas. El TNF- α que se produce después de una isquemia o lesión se va a localizar en microglía y astrocitos activados (Lieberman y cols., 1989; Chung and Benvniste 1990; Ganter y cols., 1992), en neuronas del tejido que rodea a la lesión (penumbra) (Breder y cols., 1994), y en macrófagos del tejido lesionado (Buttini y cols., 1994). El TNF- α que se liberado participa en:

- Activación de leucocitos (macrófagos y neutrófilos) y migración de éstos a la zona lesionada (Wright y cols., 1992; Liu y cols., 1994).

- Aumento en la expresión de moléculas de adhesión, fundamentalmente E-selectina, VCAM-1 e ICAM-1 (Hurwitz y cols., 1992).

- Aumento en los niveles de MMP-2 y MMP-9 (Rosenberg y cols., 1996)

- Estimula la síntesis de DNA y la proliferación celular (Barna y cols., 1990). También la proliferación de microglía y de astrocitos (Selmaj y cols., 1990; Ganter y cols., 1992).

- Aumenta la toxicidad producida por el glutámico debido a la alteración que produce en la recaptación de glutámico por los astrocitos (Chao and Hu 1994). También aumenta los niveles de LDH (Terada y cols., 1992).

En cuanto a los efectos del TNF- α en el SNC se han demostrado dos, que además son opuestos: por un lado efectos tóxicos (Talley y cols., 1995) y por otro efectos protectores (Cheng y cols., 1994; Barone y cols., 1997). Clásicamente el TNF- α ha sido considerada como una citoquina que está involucrada en la inflamación y en la muerte celular. Así, en el SNC está demostrada su capacidad de iniciar vías que conducen a la muerte neuronal por apoptosis (Knoblach y cols., 1999). Además de producir muerte neuronal, también se han descrito efectos neuroprotectores fundamentalmente en condiciones de muerte por excitotoxicidad (Cheng y cols., 1994). También se ha demostrado que TNF- α posee acciones anti-apoptóticas en células nerviosas (Barger y cols., 1995; Mattson 1997; Diem y cols., 2001) y que induce factores de crecimiento que contribuye a la supervivencia neuronal (Donato y cols., 1989; Feuerstein y cols., 1994). Además existen algunas evidencias del papel del TNF- α en el preconditionamiento isquémico (Wang y cols., 2000).

I.INTRODUCCIÓN

II.HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

III.MATERIAL Y MÉTODOS

IV.RESULTADOS

V.DISCUSIÓN

VI.CONCLUSIONES

VII.BIBLIOGRAFÍA

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Los antecedentes que existían al comienzo de la realización de la presente tesis doctoral, y que hemos detallado en la introducción eran los siguientes:

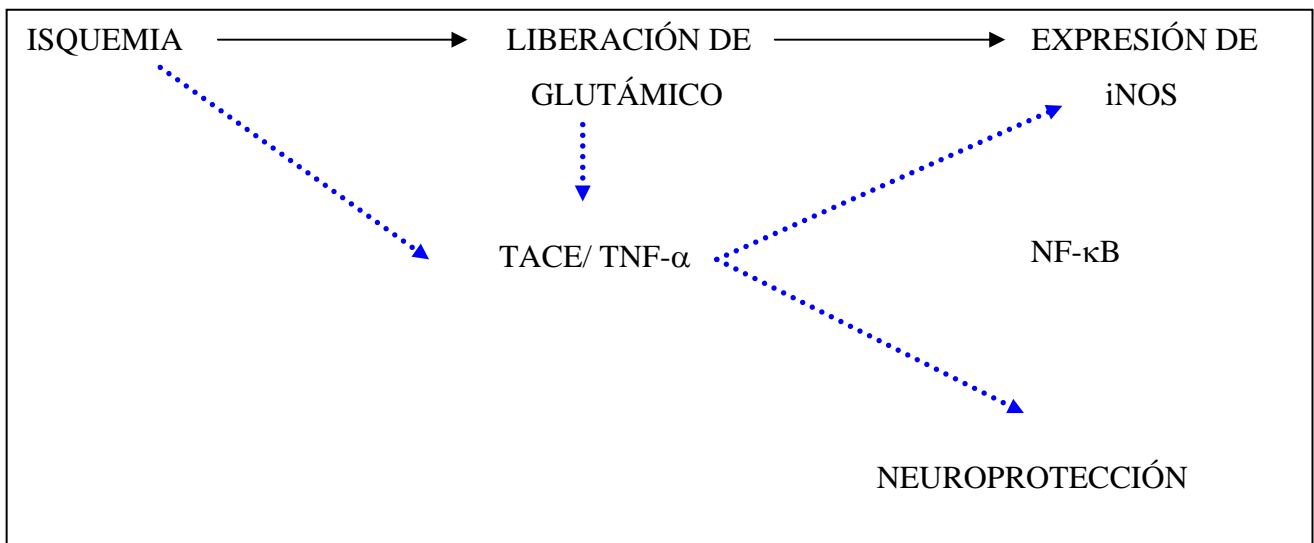
1) Tras un proceso isquémico se produce expresión y liberación de TNF- α (para revisión ver Feuerstein y cols., 1998). El TNF- α se libera gracias a una enzima llamada TACE (Gearing y cols., 1994; Black y cols., 1997; Moss y cols., 1997; Rosendahl y cols., 1997).

2) El TNF- α está implicado en la expresión de iNOS a nivel del SNC (Galea y cols., 1992; Simmons and Murphy 1992,1993; Peterson y cols., 1994; Minc-Golomb y cols., 1994, 1996; Akama y Van Eldik, 2000).

3) Tras procesos isquémicos existe una expresión de iNOS debida en parte a la liberación de glutámico (Cárdenas y cols., 2000).

4) El TNF- α también está implicado en procesos de neuroprotección (Cheng y cols., 1994; Barone y cols., 1997).

Por lo tanto, a partir de estos antecedentes nos planteamos la siguiente hipótesis: Un aumento de la expresión de TACE, regulada por glutámico, es responsable, al menos en parte, de la liberación de TNF- α tras la isquemia. Además, el TNF- α liberado puede estar implicado, bien en la inducción de iNOS, o bien ejercer efectos neuroprotectores.



La confirmación de esta hipótesis, supondría la primera demostración de la expresión de TACE en el SNC y de su regulación tras exposición a POG o a glutámico. Además, constituiría la primera demostración de la participación del TNF- α liberado en la isquemia en la expresión de iNOS.

Para demostrar nuestra hipótesis nos planteamos los siguientes objetivos:

- 1) Estudiar la expresión de TACE y su papel en la liberación de TNF- α tras la isquemia.
- 2) Estudiar la implicación del glutámico liberado durante la isquemia en la regulación de TACE.
- 3) Estudiar el papel de TNF- α sobre la viabilidad celular, y los mecanismos implicados.

I.INTRODUCCIÓN
II.HIPÓTESIS Y OBJETIVOS
III.MATERIAL Y MÉTODOS
IV.RESULTADOS
V.DISCUSIÓN
VI.CONCLUSIONES
VII.BIBLIOGRAFÍA

1.MODELOS EXPERIMENTALES DE ISQUEMIA CEREBRAL

Para estudiar la hipótesis y los objetivos propuestos, en la presente tesis doctoral se han utilizado los siguientes modelos experimentales:

1.1 Rebanadas de cerebro anterior de rata sometidas a privación de glucosa y oxígeno (POG)

El modelo que se ha utilizado en la presente tesis es una versión modificada de la originalmente utilizada desde 1995 por nuestro grupo (Lizasoain y cols., 1995). El uso de rebanadas de cerebro es una preparación que ofrece muchas ventajas ya que la morfología del tejido se encuentra inalterada respecto al animal entero, ofrece un acceso directo e inmediato al compartimento extracelular debido a la falta de barrera hemato-encefálica, los factores ambientales se pueden controlar directamente, es una excelente preparación para la farmacología cuantitativa, no se requieren anestésicos y permite la disminución del número de animales de experimentación utilizados.

A) Corte y obtención de las rebanadas:

Ratas Sprague-Dawley macho (200-250 g) se decapitan y el cerebro anterior se corta sagitalmente (2 mm anterior y 6 mm posterior al bregma). La parte central se separa y se corta en rebanadas de 0,4 mm utilizando un vibrotomo (Vibroslice, Campden Instruments) en una *solución de corte* fría con la siguiente composición (mM): NaCl (120), KCl (2), CaCl₂ (0,5), NaHCO₃ (26), MgSO₄ (10), KH₂PO₄ (1,18), glucosa (11) y sacarosa (200) (Garthwaite y cols., 1979; Lizasoain y cols., 1995).

Para evitar el daño provocado durante la manipulación y corte, la solución de corte se modifica añadiendo sacarosa (200mM), para obtener una solución hipertónica que previene el edema del tejido, y utilizando bajas concentraciones de Ca²⁺ (0,5 mM) y altas de Mg²⁺ (10 mM), para bloquear el subtipo de receptor de glutámico NMDA y prevenir así el daño asociado a su estimulación (Aitken y cols., 1995).

B) Período de preincubación:

Una vez obtenidas se transfieren dos rebanadas (una muestra) a un vial que contiene 10 ml de la *solución de preincubación* (de igual composición que la solución de corte pero sin sacarosa) y burbujeados con carbógeno (95% O₂ / 5% CO₂); el vial se introduce en un baño

con agitación termostatazado a 37°C durante 45 minutos. Por experimentos previos se considera que éste es el tiempo necesario para que se recuperen los niveles de ATP, que sufren una caída como consecuencia de la manipulación inicial del tejido (Phyllis y cols., 1996).

C) Período de equilibrado:

Transcurrido el período anterior, se elimina la solución de preincubación, y se añaden 10 ml de la *solución de incubación* con la siguiente composición (mM): NaCl (120) , KCl (2), CaCl₂ (2), NaHCO₃ (26), MgSO₄ (1,19), KH₂PO₄ (1,18) y glucosa (11) a la que se ha añadido un cofactor de la NOS, tetrahidrobiopterina (BH₄;10 µM). En esta solución se mantiene 15 minutos para su adaptación al nuevo medio.

La inclusión de BH₄ desde este momento y hasta el final del experimento se debe a que experimentos preliminares han demostrado que en ausencia de dicho cofactor, la actividad NOS decrece progresivamente; mientras que en su presencia se mantiene la actividad de la NOS en la rebanada en niveles que no son significativamente diferentes de los niveles que existen en cerebro anterior fresco (Lizasoain y cols., 1995).

D) Período de privación de oxígeno y glucosa (POG) o "isquemia":

Durante 20 minutos las rebanadas se incuban en 2,4 ml de una *solución de POG*, que posee la misma composición que la solución de incubación descrita pero que carece totalmente de glucosa y que es burbujeada con una mezcla de 95% N₂/5% CO₂ para producir una isquemia experimental (POG). Las muestras control se incuban en 2,4 ml de la solución de incubación y son burbujeadas con carbógeno.

E) Período de reperusión:

Finalmente, se cambian las soluciones anteriores en ambos grupos por 2,4 ml de la *solución de incubación* y se burbujea con carbógeno. Las muestras se mantienen así durante 2 ó 3 horas, cambiando la solución por otra "fresca" cada 30 minutos, para recrear un periodo de reperusión.

Al finalizar este periodo, se extraen las muestras con una pinza y se introducen en un tubo Eppendorf de 2 ml, tras lo cual se congelan inmediatamente en hielo seco.

1.2 Cultivos primarios de neuronas corticales de rata.

Las principales ventajas de los cultivos celulares son que permiten el control total del entorno fisicoquímico (pH, temperatura, presión osmótica, presión de O₂ y de CO₂), de las

condiciones fisiológicas y la homogeneidad de la muestra. Además los cultivos permiten someter a las células a unas concentraciones conocidas y definidas, asegurando un acceso directo a ellas.

A) Preparación del cultivo

Para la preparación de cultivos primarios de neuronas corticales se extraen los cerebros de fetos de ratas Wistar en el día embrionario 18, y se disecciona el área cortical. Las neuronas se disocian mecánicamente en un **medio de incubación** que contiene: medio mínimo esencial Eagle (MEM; 80 % v/v), glucosa (3,3 mM), glutamina (1,98 mM), suero de caballo (10 % v/v), suero fetal de ternera (10 % v/v) y 16 mg/l gentamicina.

Las neuronas disociadas se siembran en placas Petri tratadas previamente con 20µg/ml de poli-L-lisina a una densidad de 300.000 células/cm² en placas de 6, 12 ó 24 pocillos. Algunos experimentos se realizaron a una densidad de 50.000 células/cm² en placas de 6 pocillos. Las placas se mantienen en un incubador a 37°C en atmósfera húmeda con 95% aire/5% CO₂. En el día 4, el medio se cambia por un **medio de crecimiento** que contiene MEM (80 % v/v), glucosa (3,3 mM), glutamina (1,98 mM), suero de caballo (10 % v/v), 16 mg/l gentamicina y arabinósido de citosina (CAR; 10 µM).

El medio se cambia dos veces por semana con un medio igual que el de crecimiento, pero sin CAR y la privación de oxígeno y glucosa o el tratamiento con glutámico se realiza en el día 9-10 *in vitro*, cuando los cultivos consisten en un porcentaje ±60 % en neuronas.

B) Período de privación de oxígeno y glucosa (POG) o “isquemia”

Para simular un proceso isquémico las células se incuban durante 150 min en Krebs que contiene (mM): NaCl (130), KCl (5,4), CaCl₂ (1,8), MgCl₂ (0,8), NaH₂PO₄ (1,3), NaHCO₃ (26) y 2% de suero de caballo. Esta solución carece de glucosa y está equilibrada con 95% N₂/ 5% CO₂. La incubación se realiza en una cámara hermética (Hot Box System) en la que se mantiene una presión constante de 0,15 bar y es termostaticada a 37°C. Las células control se incuban con un Krebs de la misma composición al que se añade glucosa 33,3 mM e introducidas en el incubador normóxico.

C) Período de reperfusión

Al final de este periodo, se retira la solución de Krebs y se reemplaza por un **medio de**

reperfusión que contiene MEM (80 % v/v), glucosa (3,3 mM), glutamina (1,98 mM), suero

de caballo (2 % v/v), 50 µg/l estreptomicina y 5 UI/ml de Penicilina, manteniendo las células en el incubador normóxico. Las células se recogen a diversos tiempos tras la privación de oxígeno y glucosa y se congela el pellet inmediatamente en hielo seco.

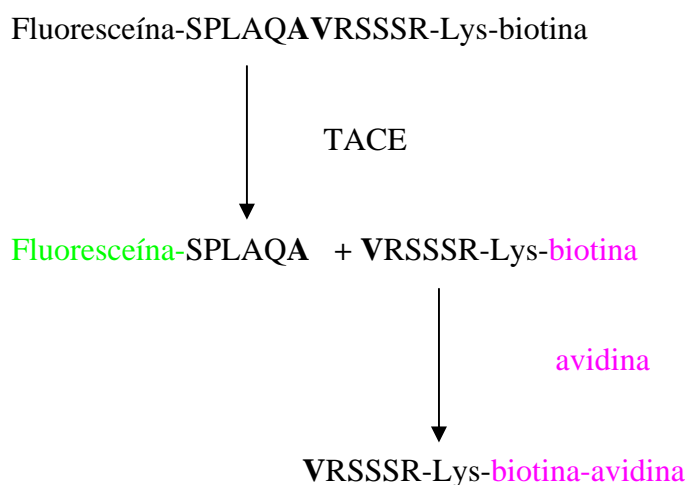
2. DETERMINACIONES

2.1 Determinaciones Bioquímicas

Medida de la actividad enzimática de TACE

La actividad del enzima TACE se determina después de la sonicación de las rebanadas (Labsonic 2000, Barcelona, España) a 4°C en 5 volúmenes de un buffer de homogenización con la siguiente composición: sacarosa (320 mM), EDTA (1mM), DTT (1mM), leupeptina (10 µg/ml), fluoruro de fenilmetilsulfonilo (100 µg/ml), inhibidor de tripsina (10 µg/ml), aprotinina (2 µg/ml), y Tris Base (50 mM) ajustado a pH 7,0 a 20°C con HCl. Este buffer se modificó añadiendo además NaF (5 mM), NaVO₄ (1mM), NaMoO₄ (10 mM) y Nonidet P-40 (0,2 %).

Para la determinación de la actividad TACE se usa un péptido, diseñado por nuestro grupo con el asesoramiento del Dr. David Andreu (Facultad de Químicas, Universidad de Barcelona). El péptido presenta 12 aminoácidos y está marcado en un extremo con una molécula fluorescente (fluoresceína) y en el otro con biotina: Fluoresceína-SPLAQA^{VRSSSR}-Lys-biotina (pro-péptido o péptido sustrato). Se usa este péptido por contener la secuencia de pro-TNF alfa que reconoce TACE al formar TNF-α. Una vez hidrolizado el pro-péptido, los residuos que llevan la biotina y no son fluorescentes (^{VRSSSR}-Lys-biotina), así como el péptido sin cortar, son eliminados mediante avidina (avidina inmovilizada en perlas de agarosa al 6%). La fluorescencia del péptido producto Fluoresceína-SPLAQA se mide en un lector de placas de fluorescencia (Fluoroskan FL Ascent, Labsystems) a una longitud de onda de excitación de 485 nm y de emisión de 510 nm. La actividad TACE se calcula por la diferencia entre la fluorescencia de las muestras y la fluorescencia de las muestras que contienen fenantrolina (100 µM), un inhibidor inespecífico de metaloproteasas.



Para la actividad enzimática de TACE el péptido sustrato Fluoresceína-SPLAQAVRSSSR-Lys-biotina se utiliza disuelto a una concentración final de 0,025 mg/ml en un tampón con la siguiente composición: DTT (1mM), NaF (5 mM), NaVO₄ (1 mM), NaMoO₄ (10 mM), ZnCl₂ (100 μM), y Tris (50 mM) a pH 7,4 y 37 °C. Además, la actividad del enzima TACE en cultivos celulares se determina incubando el péptido en el medio de incubación sobre las células intactas.

Medida de la actividad enzimática de óxido nítrico sintasa (NOS)

La actividad de NOS en rebanadas de cerebro anterior se determina después de la sonicación del tejido (Labsonic 2000, Barcelona, España) a 4 °C en 5 volúmenes del buffer de homogenización. El homogeneizado se centrifuga a 4°C y a 12000 g durante 20 minutos y el sedimento se descarta. La actividad de la NOS se determina entonces en el sobrenadante (postmitocondrial), midiendo la conversión de L-[U-¹⁴C]-arginina en L-[U-¹⁴C]-citrulina (ya que la NOS genera NO y citrulina en iguales proporciones), añadiendo al medio de incubación enzimática NADPH (100μM), BH₄ (3μM), FAD (3μM), y FMN (3μM) como cofactores (Salter y cols., 1991; Rees y cols., 1995). La arginina marcada sobrante se separa de la citrulina mediante una resina intercambiadora catiónica Dowex-50W/H₂O y la citrulina marcada formada se mide en un contador de centelleo.

La actividad NOS calcio-dependiente se calcula a partir de la diferencia entre la L[U¹⁴C]citrulina

producida por muestras control y muestras que contenían ácido etilenglicol bis (β -amónioetil

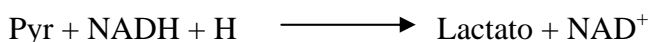
éter)-N,N'-tetraacético (EGTA) 1mM como quelante de calcio; la actividad de la isoforma calcio-independiente se determina a partir de la diferencia entre muestras que contenían EGTA 1 mM y muestras que contenían 1 mM de N^G-monometil-L-arginina (L-NMMA) como inhibidor no selectivo de todas las isoformas de NOS.

Determinación de TNF- α

El TNF- α liberado al medio de incubación tanto de las rebanadas como de los cultivos se determinó por ELISA (R&D systems), de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Medida de la liberación de LDH

La LDH es una enzima ampliamente distribuida en los tejidos del organismo y de localización citosólica. Su presencia en el medio se puede utilizar como una medida de muerte celular (Koh y Choi, 1987). La determinación de esta actividad se basa en la capacidad de la enzima de transformar piruvato en lactato, utilizando como coenzima nicotin-adenin-dinucleótido reducido (NADH) que pasa a su forma oxidada (NAD⁺). Para su determinación se recoge medio de incubación de rebanadas y de cultivos.

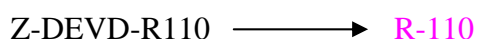


El NADH absorbe a una longitud de onda de 340 nm. Así, la LDH se determina midiendo la desaparición de NADH por la disminución de absorbancia a esa longitud de onda, en condiciones de máxima actividad enzimática (piruvato sódico 3,2 mM; NADH 0,42 mM en tampón KH₂PO₄/K₂HPO₄,1M) utilizando un espectrofotómetro (Beckman DU-7500) o un lector de placas (Molecular Devices).

Medida de la Actividad de Caspasa-3

Como un indicador de apoptosis se mide la actividad caspasa-3 en células mediante un kit comercial (Rhodamine 110, Z-DEVD-R110 Molecular Probes).

El fundamento del ensayo se basa en la capacidad del enzima caspasa-3 de romper el sustrato Z-DEVD-R110 y dar una molécula fluorescente.



La fluorescencia del producto se mide en un lector de placas de fluorescencia (Fluoroskan FL Ascent, Labsystems) a una longitud de onda de excitación de 485 nm y de emisión de 510.

Medida del contenido proteico

El contenido de proteína se determina utilizando el método del ácido bicinconínico (Hill y Straka, 1988). El reactivo que se utiliza es una mezcla de ácido bicinconínico (48%) y $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (2% p/v). Las proteínas reducen el Cobre (II) a Cobre (I) de forma concentración dependiente. Cu (I) reacciona con el ácido bicinconínico formando un complejo púrpura con un máximo de absorción a 562 nm. Dicha lectura se realiza en un lector de placas (Molecular Devices). La determinación de la concentración de proteínas se hace preparando una curva patrelaborada a partir de albúmina sérica bovina (BSA).

2.2 Determinaciones moleculares

Determinación de las proteínas TACE y ADAM10 por Western blot

Las rebanadas o las células se homogeneizan a 4°C en 5 volúmenes del buffer de homogenización que se modificó añadiendo: Nonidet (0,2 %) y fenantrolina (100 μM). Se añade fenantrolina para evitar la acción proteolítica de TACE sobre sí misma (Schlöndorff y cols., 2000). El homogeneizado se centrifuga a 4°C y a 12000 g durante 5 minutos y el sedimento obtenido se descarta. Una vez calculada la proteína, se añade SDS 10% y se procede al hervido de las muestras tras lo cual se añade Nonidet 0,5%. Tras esto, las muestras obtenidas se deglicosilan añadiendo 3 μl de N-Glicosidasa F (Roche Diagnostic) durante 3 horas a 37°C (Lammich et al., 1999). Las proteínas se cargan (10 μg) y se separan según su peso molecular mediante electroforesis en un gel de poliacrilamida-SDS al 10% (50mA). Los geles se transfieren a una membrana de PVDF (Millipore) y se incuban, con un anticuerpo policlonal específico para TACE (Chemicon, dilución 1:1000; Black y cols., 1997; Moss y cols., 1997) o para ADAM10 (Chemicon, dilución 1:1000). El revelado se realiza con un ECLTM-kit siguiendo las instrucciones del fabricante (Amersham).

Determinación de la proteína iNOS

Las rebanadas se homogeneizan a 4°C en 5 volúmenes del buffer de homogenización. El

homogeneizado se centrifuga a 4°C y a 12000 g durante 20 minutos, el sedimento obtenido se descarta, las proteínas presentes en el sobrenadante se cargan (10 µg) y se separan por peso

molecular mediante electroforesis en un gel de poliacrilamida-SDS al 10% (50mA). Los geles se transfirieron a una membrana de PVDF (Millipore) y se incuban con un anticuerpo policlonal específico para iNOS (Santa Cruz; dilución 1:1000). Se revelaron según lo expuesto anteriormente.

Determinación de mRNA de TACE por PCR

Es un método enzimático que usa dos oligonucleótidos complementarios de los extremos 3' del molde como cebadores (primers) y así sintetiza numerosas copias de DNA comprendido entre ambos oligonucleótidos.

Tejido → Extracción del RNA → Síntesis de DNA → PCR

El RNA total de la rebanadas se extrae por el método de isotiocianato de guanidina (Chirgwin y cols., 1979). Una vez aislado el RNA, el mRNA es tratado con una transcriptasa inversa y con el cebador oligo(dT) 12-18, obteniendo así el cDNA. El oligo(dT) reconoce la cola Poli A del mRNA y empieza a sintetizar el cDNA. El álcali presente en el medio degrada el mRNA y mediante una polimerasa se sintetiza la hebra complementaria, con lo que tenemos la doble hélice de DNA. El cDNA obtenido se amplifica usando el GeneAmp RNA PCR y Core kit (Perkin-Elmer): así al tratar el cDNA con la enzima Taq polimerasa y con 2 oligonucleótidos se va a amplificar la señal. Se van a producir cuatro ciclos de temperatura: 96 °C, durante 4 minutos; 50°C, durante 20 segundos; 72°C, durante 30 segundos; 52°C, 30 segundos. Durante 30 ciclos con estas características se va a producir una amplificación de hasta 1 millón de veces.

Las secuencias oligonucleotídicas que corresponden al mRNA murino de TACE y que fueron usadas como cebadores son: 5'GTTACAACATCATGAATTGGG3' y 5'GACAGTTTTTACAGCAAGG3' (nucleótidos del 1359 al 1379 y del 1746 al 1765 respectivamente). Los fragmentos amplificados son analizados en un gel de agarosa al 1,5% de

bajo punto de fusión y con bromuro de etidio.

2.3 Determinaciones histoquímicas

Fijación de las células en cultivo

Para realizar los experimentos de inmunocitoquímica, previamente se procedió a la fijación de las células con formaldehído al 4% en PBS (buffer fosfato salino). Para ello, las células sobre placas Petri se lavan 2 veces con PBS. Posteriormente, se tratan con p-formaldehído al 4% en PBS durante 30 min y finalmente, se lavan 3 veces nuevamente con PBS.

Tripsinización

Las células sobre placas Petri se tratan con una solución de tripsina (0,025%) y EDTA (0.02%) en PBS. Esta solución se inactiva con suero fetal (10%) en MEM tras lo cual se centrifugan las células a 110 g. Se elimina el sobrenadante recogiendo las células en formaldehído al 4% y centrifugándolas a 3000 g durante 10 min. A continuación estas células se lavan dos veces con PBS.

Doble marcaje por inmunofluorescencia

a. Doble marcaje para MAP2/TACE

La tinción doble con TACE y MAP2 (marcador específico de neuronas) se realizó tras fijar, permeabilizar durante 10 min con 0,1% de Tritón X-100 a temperatura ambiente y tratar las células con suero de albúmina bovina (BSA) al 3% durante 30 min a temperatura ambiente. Estas células se incuban con un anticuerpo policlonal específico anti-TACE (Chemicon; dilución 1:300) y con un anticuerpo monoclonal anti-MAP2 (Chemicon; dilución 1:200) durante dos horas a temperatura ambiente. Tras lavar en PBS, las células se incuban con el anticuerpo secundario respectivo durante una hora. Para TACE se empleó un anti IgG de conejo conjugado con Cy-3 (Amersham Pharmacia Biotech; dilución 1:300) y para MAP-2 un anti IgG de ratón conjugado con Cy-2 (Amersham Pharmacia Biotech; dilución 1:300) durante dos horas a temperatura ambiente. Las células se lavan con PBS y se montan en PBS/glicerina (1/1). La fluorescencia de cada fluoróforo se observa con el filtro B2A y G2A respectivamente en un microscopio de fluorescencia Nikon Eclipse TE300, con objetivos de

Flúor 20x/0.45 ó 40x/0.6.

b. Doble marcaje para proteína acídica fibrilar glial (GFAP)/TACE

La tinción doble con TACE y GFAP (proteína acídica fibrilar glial, marcador específico de astrocitos) se realiza siguiendo lo realizado para el doble marcaje MAP2/TACE. Estas células se incuban con un anticuerpo policlonal específico anti-TACE (Chemicon, dilución 1:300) y con un anticuerpo monoclonal anti-GFAP (Chemicon, dilución 1:100) durante dos horas a temperatura ambiente. Los anticuerpos secundarios usados fueron Cy-3 y Cy-2 respectivamente.

c. Doble marcaje con aglutinina de *Lycopersicon esculentum* (lectina de tomate)/TACE

La tinción doble con TACE/ lectina de tomate se realiza siguiendo lo indicado para el doble marcaje MAP2/TACE. Estas células fueron incubadas con un anticuerpo policlonal específico anti-TACE (Chemicon, dilución 1:300) y con lectina de tomate (Sigma; dilución 1:150) que está unida a fluoresceína y reconoce glicoproteínas específicas de la membrana plasmática de microglía y macrófagos (Acarin y cols., 1994, 1669; Velasco y cols., 1995) durante dos horas a temperatura ambiente. El anticuerpo secundario usado para anti-TACE fue Cy-3.

Anexina V

Las células apoptóticas se caracterizan por la exposición de fosfatidilserina en su superficie celular. Esta exposición de fosfatidilserina puede ponerse de manifiesto mediante la unión de anexina. Mediante un kit comercial (Molecular Probes) que contiene FITC-anexina V se determina el número de células apoptóticas usando para su visualización un microscopio de fluorescencia Nikon Eclipse TE300, con objetivo de Flúor 20x/0.45 y un filtro B2A de Nikon.

Hoechst 33342

Otra forma de reconocer células apoptóticas es por cambios morfológicos que sufren

como por ejemplo la condensación de cromatina. Para ello se utiliza un kit comercial (Molecular Probes) que contiene Hoechst 33342 que se une a la cromatina condensada. Se usa para su visualización un microscopio de fluorescencia Nikon Eclipse TE300, con objetivo de

Flúor 20x/0.45 y un filtro UV de Nikon.

Contaje de células positivas

El contaje de las células se realizó mediante la selección de 4 campos al azar.

2.4 Citometría de flujo

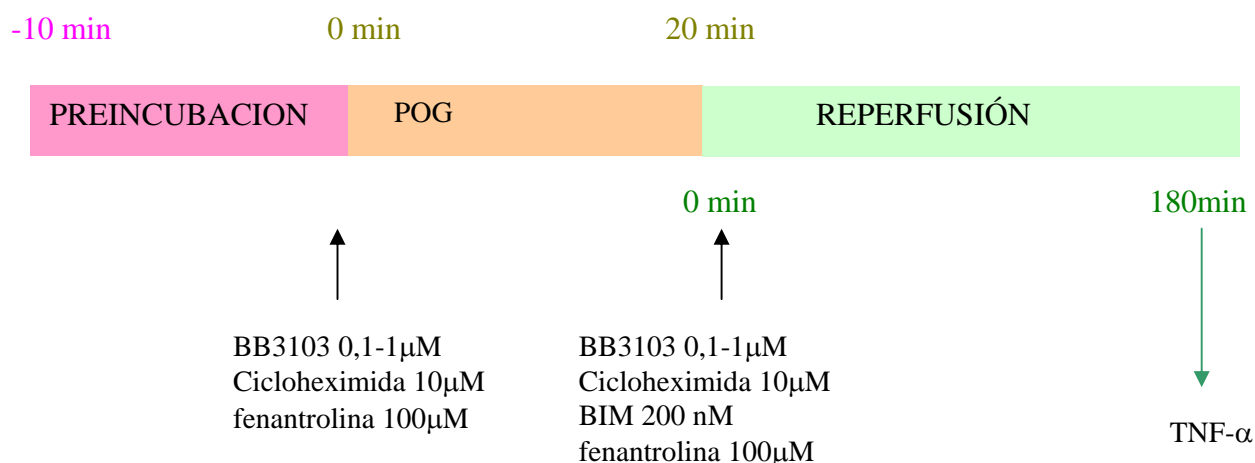
El porcentaje de neuronas existentes en los cultivos celulares se determina mediante citometría de flujo. Las células sobre placas Petri se tratan con una solución de tripsina (0,025%) y de EDTA (0,02%) en PBS. Las células obtenidas se incuban con un anticuerpo monoclonal anti-MAP2 (Chemicon, dilución 1:200) durante dos horas a temperatura ambiente. Tras lavar en PBS, las células se incuban con un anticuerpo secundario, Cy-2 (Amersham Pharmacia Biotech; dilución 1:300). La suspensión celular convenientemente procesada y teñida, se inyecta en la cámara de flujo del citómetro, que está enfocada para que las células pasen individualmente, a través de un punto en que éstas interaccionan físicamente con un haz de luz monocromática, dispersando la luz en todas las direcciones. La luz dispersada hacia adelante (llamada forward scatter a 0 grados) está relacionada con el tamaño de la célula. La luz dispersada a 90 grados del eje del haz lumínico (light scatter a 90 grados) está relacionada con la estructura interna y la complejidad citoplasmática. Así, las células se analizan en un citómetro de flujo FACScan (Becton-Dickinson, Mountain View, CA) conectado a un sistema MacIntosh Quadra II.

3.PROTOCOLOS EXPERIMENTALES

3.1 Experimentos en rebanadas de cerebro anterior de rata

A) Estudios de liberación de TNF- α

La liberación de TNF- α se determina a los 180 minutos de reperusión. Para comprobar la implicación de TACE en la liberación de TNF- α y su regulación se incuban las rebanadas tanto durante la fase de privación de oxígeno y glucosa (POG) como durante la fase de reperusión con fenantrolina (inhibidor de amplio espectro de metaloproteasas; 100 μ M), con BB3103 (inhibidor de TACE; 0,1-1 μ M), con cicloheximida (inhibidor de la síntesis de proteínas; 10 μ M) y con bisindolilmaleimida I 200nM (inhibidor de PKC; 200nM).



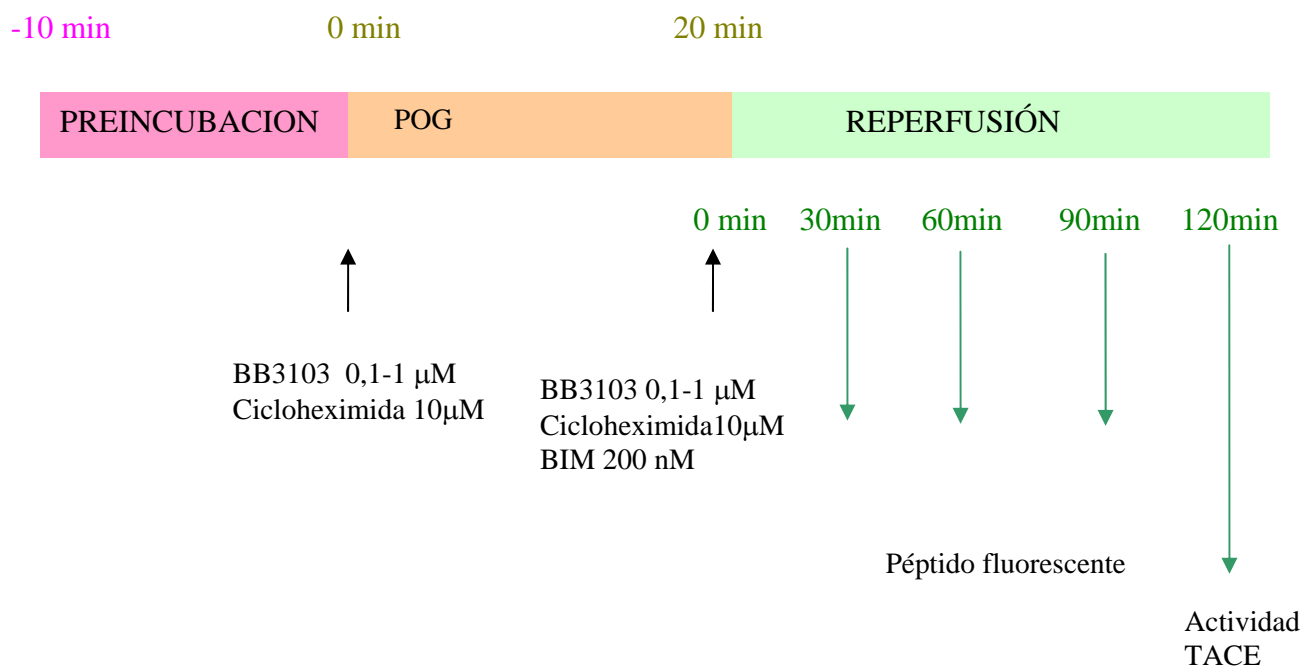
B) Medida de la actividad neta de TACE

Para determinar si el aumento de TNF- α tras la isquemia se debe a un aumento en los niveles de TACE, a un aumento en los niveles del sustrato pro-TNF- α o a ambos, incubamos las rebanadas con el propéptido fluorescente que contiene el sitio de corte para TACE a una concentración de 0,025mg/ml, que actúa así como sustrato de TACE en condiciones de saturación. Este propéptido fue incluido en reperusión y se tomaron muestras a 30, 60, 90 y

120 minutos para la medida del producto fluorescente. Para estudiar la regulación de la actividad TACE incubamos las rebanadas con BB3103 (0,1 μ M), con cicloheximida (10 μ M)

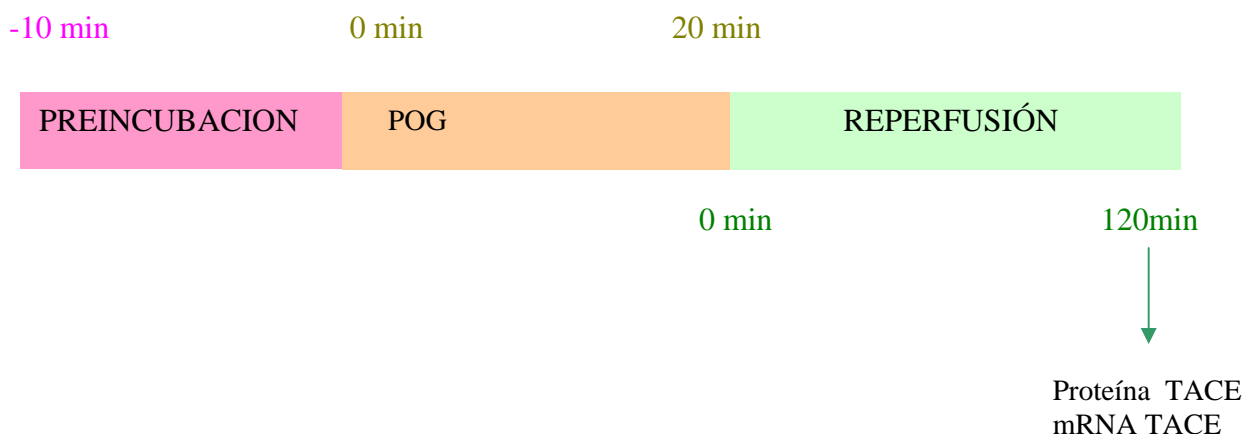
y con bisindolilmaleimida I (200nM).

También se recogieron las rebanadas a 120 min de reperfusión para la medida de actividad TACE (pmol/min mg de proteína).



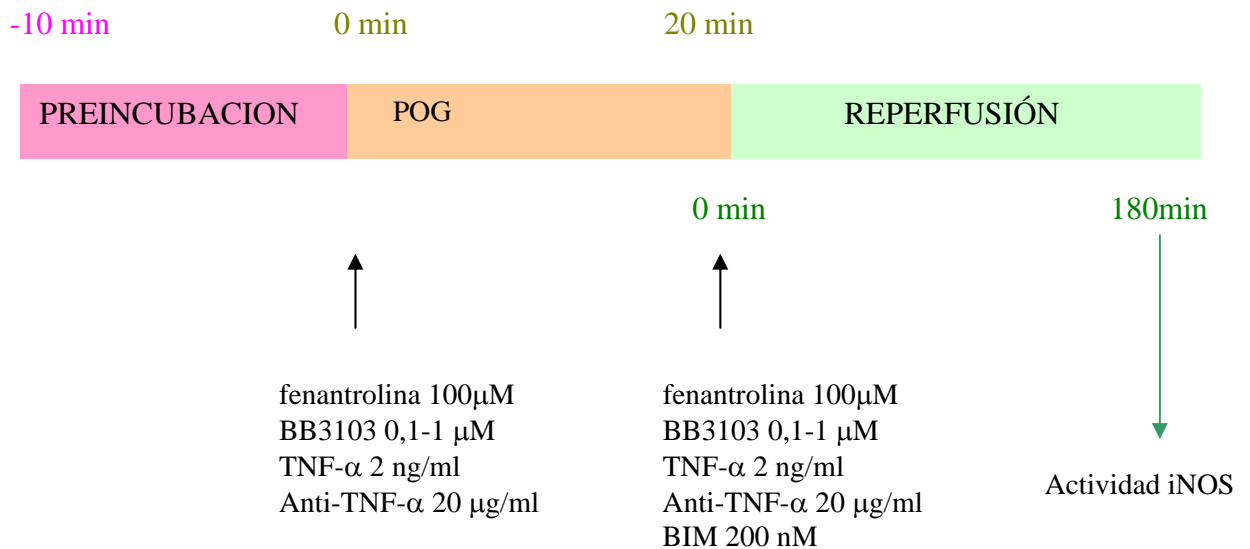
C) Medida de la proteína TACE y del mRNA

Se determinaron los niveles de proteína TACE mediante la técnica de Western blot utilizando para ello las rebanadas recogidas a los 120 minutos de reperfusión después de 20 minutos de POG. También se determinaron niveles de mRNA mediante PCR usando rebanadas recogidas bajo las mismas condiciones que se usaron para la determinación de la proteína TACE.



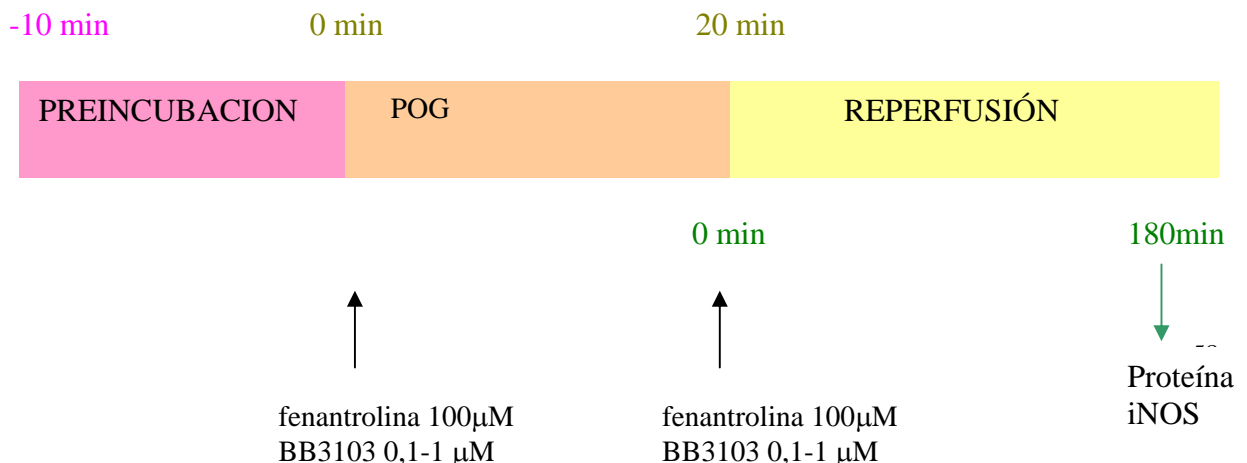
D) Medida de la actividad NOS calcio-independiente

Para comprobar la implicación de TNF- α en la inducción de la isoforma inducible NOS (iNOS) cuya actividad es calcio-independiente, se sometieron las rebanadas a una POG de 20 minutos y a una posterior reperfusión de 180 min, tras lo cual se recogieron las rebanadas para la medida de la actividad. Las rebanadas fueron incubadas con fenantrolina (100 μ M) o con BB3103 (0,1-1 μ M) para comprobar la implicación de TNF- α en la inducción de iNOS. Las rebanadas también se incubaron con TNF- α (2ng/ml), anticuerpo anti TNF- α (20 μ g/ml) y con bisindolilmaleimida I (200 nM).



E) Medida de la proteína iNOS

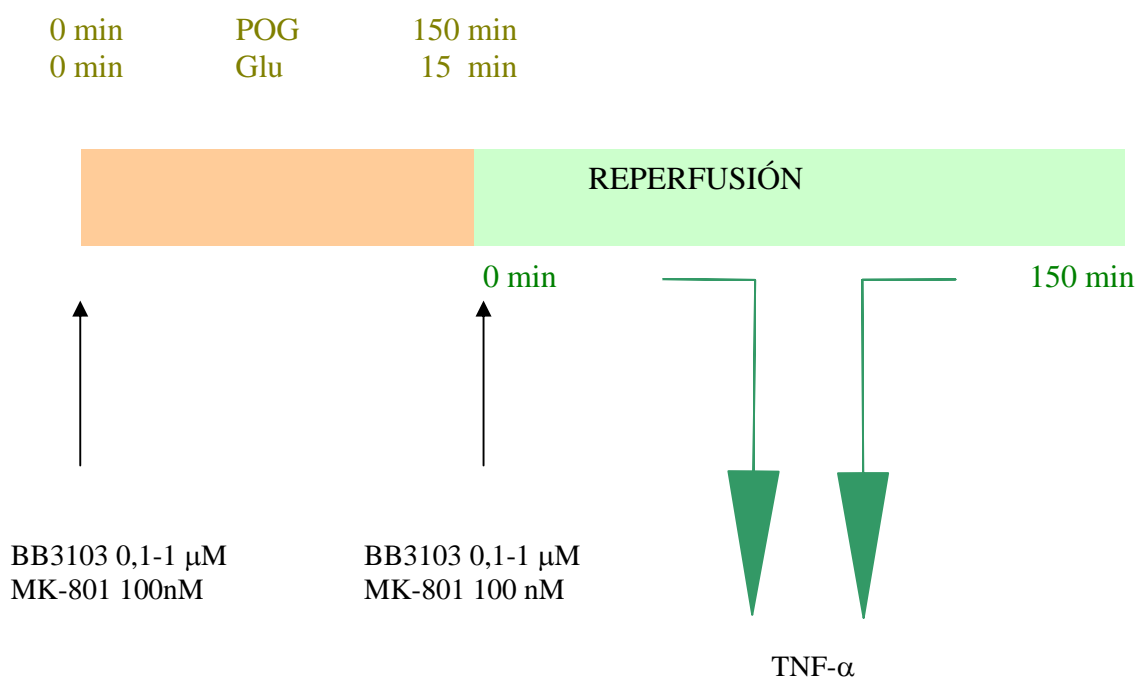
Para la medida de la proteína iNOS se recogieron las rebanadas a las 3 horas de reperfusión después de 20 minutos de POG. También se determinaron los niveles de iNOS tras el tratamiento con fenantrolina (100 μ M) y el inhibidor de TACE BB3103 (0,1-1 μ M).



3.2 Experimentos en cultivos primarios de neuronas corticales de rata

A) Estudios de liberación de TNF- α

En estos experimentos, las células se someten a 150 minutos de POG ó a 15 minutos de tratamiento con glutámico 10 μ M, tras lo cual se recoge el medio de incubación a 0 y a 150 minutos de reperusión. Para comprobar la implicación de TACE en la liberación de TNF- α se incuban las células tanto en POG como en reperusión, en presencia y ausencia de BB3103 (inhibidor de TACE; 0,1-1 μ M) o de MK-801 (antagonista del receptor NMDA; 100 nM).



B) Medida de proteína TACE/ADAM-17

Para determinar los niveles de proteína TACE se utilizan las células recogidas a los 120 minutos de reperusión después de 150 minutos de isquemia o de 15 minutos de tratamiento con glutámico. Para la determinación de la localización de la inmunorreactividad de TACE se procede a su fijación después de 120 minutos de

reperfusión tras exposición a glutámico (10 μ M) ó a POG.

0 min POG 150 min
 0 min Glu 15 min



120 min

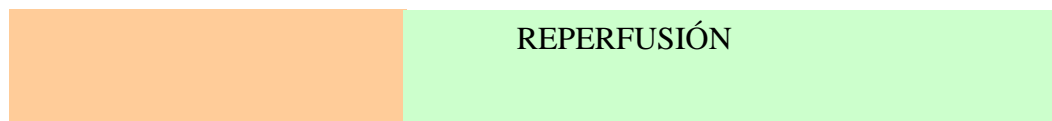


Proteína
TACE/ADAM10

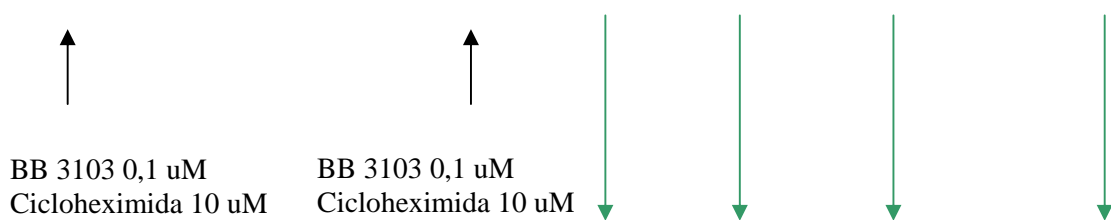
C) Medida de la actividad neta TACE

Para la medida de la actividad TACE, incubamos las células con el propéptido fluorescente que contiene el sitio de corte para TACE. Este propéptido fue incluido en reperfusión y se tomaron muestras a 30, 60, 90 y 120 minutos después del tratamiento con glutámico, para la medida del producto fluorescente. En este grupo de experimentos incubamos las rebanadas con BB3103 (0,1 μ M) y con cicloheximida (inhibidor de la síntesis de proteínas; 10 μ M).

0 min Glu 15 min



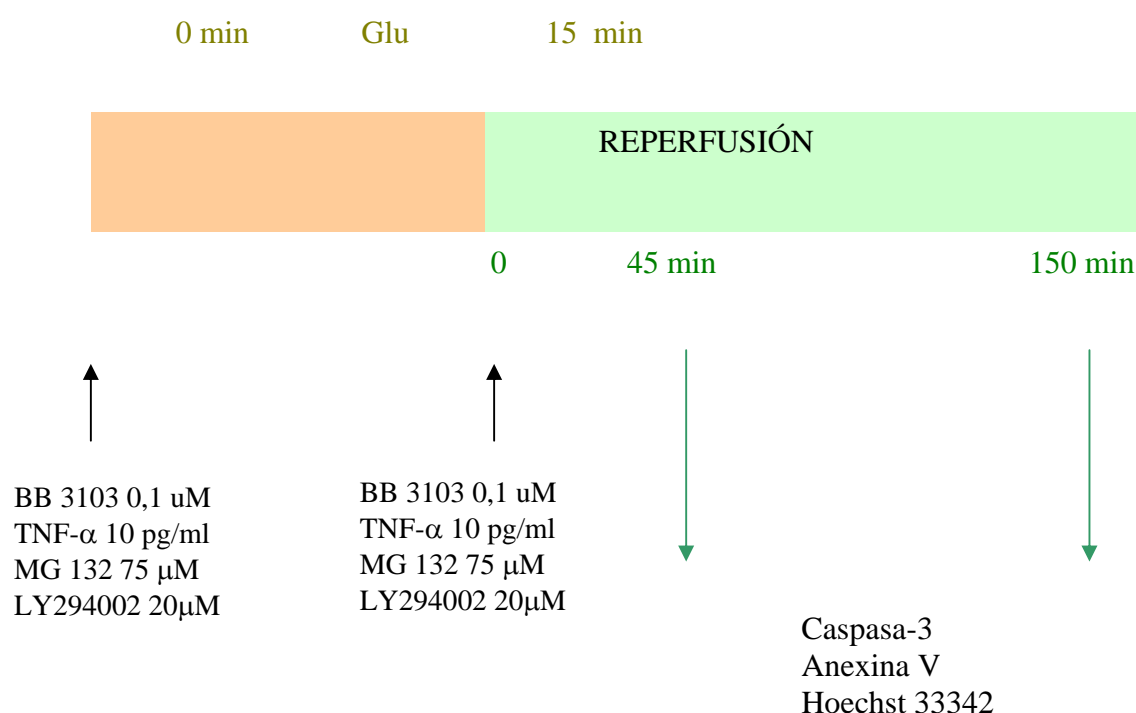
0 30 60 90 120 min



Péptido fluorescente 60

D) Medida de parámetros apoptóticos: Anexina V, caspasa-3 y Hoechst 33342

La medida de la apoptosis se realiza a los 45 minutos y a los 150 minutos de reperfusion tras el tratamiento con glutámico 10 μ M. Los parámetros apoptóticos fueron tres: la medida de la actividad enzimática de caspasa-3, la detección de fosfatidilserina expuesta en la membrana mediante su unión a anexina V y la tinción de la cromatina condensada con Hoechst 33342. Dichos experimentos se realizan tras el tratamiento de las células con BB3103 (0,1 μ M) o con TNF- α (10 pg/ml). Para caracterizar la ruta antiapoptótica inducida por TACE/TNF- α se incuban las células con el inhibidor de NF- κ B MG 132 (75 μ M) y con el inhibidor de PI3-kinasa LY294002 (20 μ M).



4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados se expresan como media \pm e.e.m del número indicado de experimentos, y las comparaciones estadísticas se hicieron usando un test de Newman-Keuls

($P < 0.05$ se consideraba significativo).

I.INTRODUCCIÓN
II.HIPÓTESIS Y OBJETIVOS
III.MATERIAL Y MÉTODOS
IV.RESULTADOS
V.DISCUSIÓN
VI.CONCLUSIONES
VII.BIBLIOGRAFÍA

1.RESULTADOS OBTENIDOS EN REBANADAS DE CEREBRO ANTERIOR DE RATA

1.1 Estudio de la liberación de TNF- α tras POG

1.1.1 Resultados de la medida de TNF- α

En la figura 11 se representan los niveles de TNF- α liberados por las rebanadas expuestas a diversos tratamientos. Los niveles de TNF- α se determinaron al final del periodo de reperfusión (120 minutos). Cuando las rebanadas fueron expuestas a 20 minutos de POG se produjo un aumento en los niveles de TNF- α liberados al medio. Además, cuando fueron incubadas con el inhibidor inespecífico de metaloproteasas, o-fenantrolina (100 μ M, phen), con el inhibidor específico de TACE, BB3103 (0,1-1 μ M, BB), con el inhibidor de la síntesis de proteínas, cicloheximida (10 μ M, CHX) y con el inhibidor de la PKC, bisindolilmaleimida I (200nM, BIM), se produjo en todos los casos una disminución significativa en los niveles de TNF- α liberados al medio de incubación tras la POG.

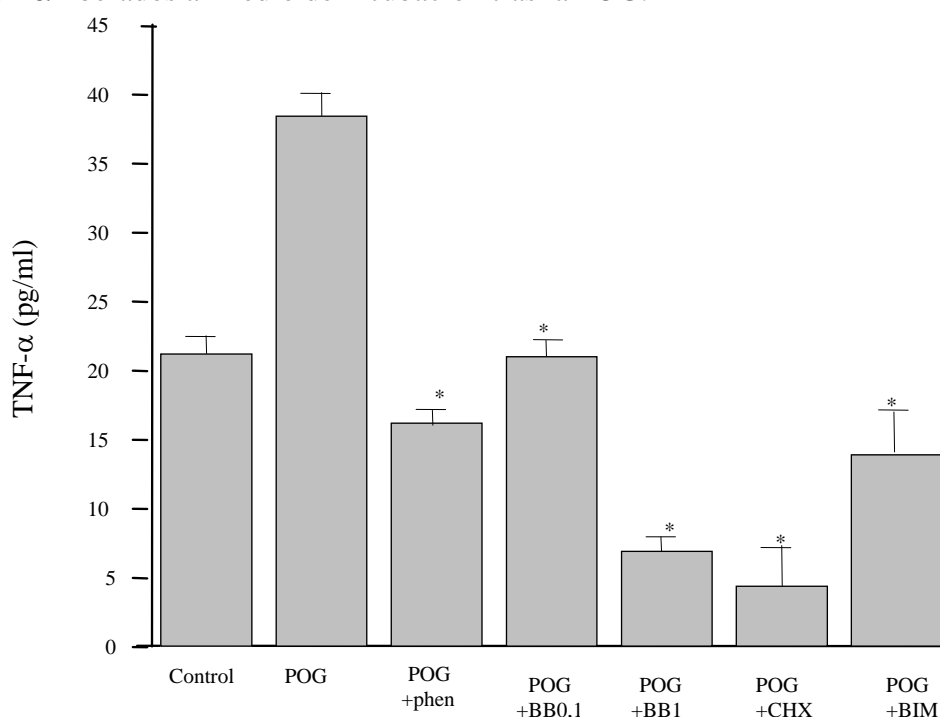


Figura 11. Niveles de TNF- α medidos en el medio de incubación de las rebanadas. Efecto de POG y de los inhibidores de TACE, [o-fenantrolina (100 μ M, phen) y BB3103 (0,1-1 μ M, BB)], del inhibidor de la síntesis de proteínas cicloheximida (10 μ M, CHX) y del inhibidor de PKC bisindolilmaleimida I (200 nM, BIM). *p<0,05 vs POG n=4

1.2 Estudio de la expresión de TACE y de su regulación por POG

1.2.1 Actividad TACE en homogenados de rebanadas

Como puede observarse en la figura 12, existe actividad enzimática TACE en los homogenados obtenidos de rebanadas control. Además, cuando las rebanadas son sometidas a 20 minutos de POG y tras 2 horas de reperusión se produjo un aumento en la actividad TACE en dichos homogenados.

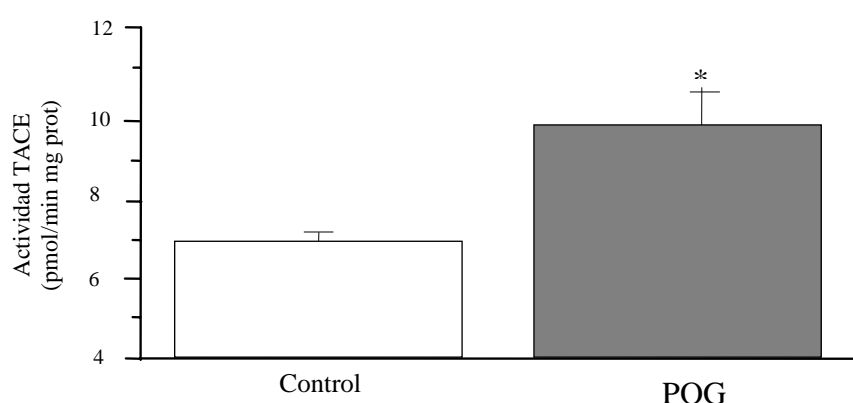


Figura 12. Actividad TACE a las 2 horas de reperusión en rebanadas expuestas a 20 min de POG. Los datos son expresados como la media (pmol/min mg proteína) \pm e.s.m * $p < 0,05$ vs control n=4

1.2.2 Análisis de proteína TACE por Western blot

Al analizar por Western blot la presencia de TACE, encontramos que en tejido control existen dos bandas inmunorreactivas a TACE de 100 y 180 kDa, correspondientes a los tamaños de TACE madura y de su precursor, respectivamente. Además, como se observa en la figura 13, la exposición de las rebanadas a 20 minutos de POG causó un aumento en la expresión de proteína TACE en rebanadas recogidas a los 120 minutos de reperusión.

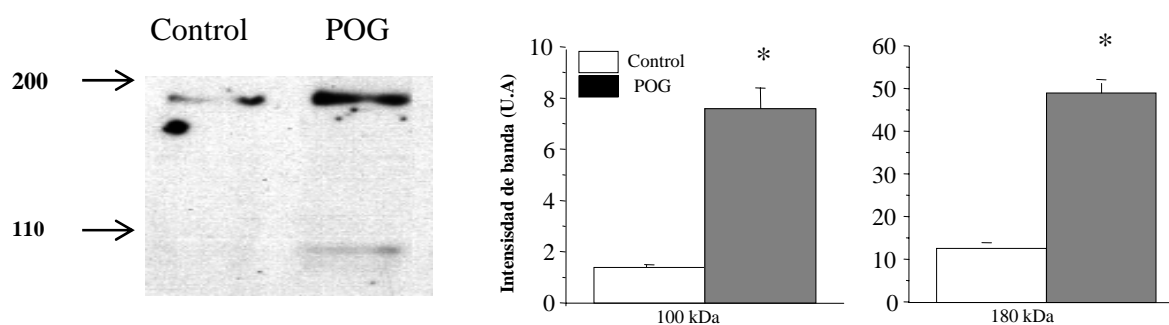


Figura 13. Aumento en la expresión de la proteína TACE después de POG.

Izquierda: Western blot de TACE en extractos solubles de homogenados de rebanadas .

Derecha: Análisis de expresión de proteína TACE por densitometría laser. U.A: unidades de absorbancia. * $p < 0,05$ vs control n=4

1.2.3 Análisis del mRNA por PCR

Al analizar el mRNA de TACE por PCR, encontramos la presencia de una banda con el tamaño previsto, en tejido control (figura 14). Además, y de acuerdo con nuestros datos anteriores, en las rebanadas sometidas a 20 minutos de POG puede observarse un aumento en los niveles de mRNA de TACE cuando se compara con el grupo control.

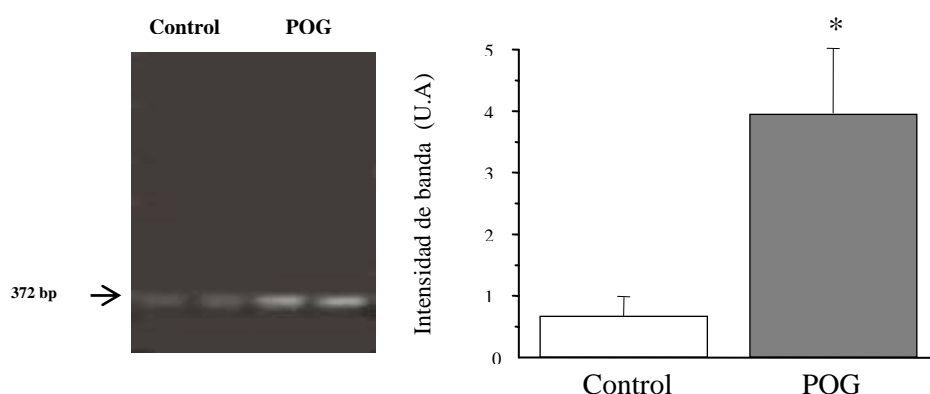


Figura 14. Izquierda: Análisis del mRNA de TACE por PCR en rebanadas sometidas a 20 minutos de POG. **Derecha:** análisis por densitometría láser del mRNA de TACE. U.A: unidades de absorbancia. * $p < 0,05$ vs control $n=4$

1.2.4 Actividad TACE en rebanadas intactas durante la reperfusion

En la figura 15 se representa el nivel de actividad TACE cuando las rebanadas son incubadas con el péptido fluorescente (propéptido). Se observa que los niveles de fluorescencia correspondientes al péptido producto fueron aumentando a lo largo del experimento. Al analizar farmacológicamente la actividad TACE a los 120 minutos de reperfusion, encontramos que la formación de péptido producto era inhibida cuando las rebanadas se coincubaban con el inhibidor de TACE, BB3103 (0,1 μM , BB), con el inhibidor de síntesis proteica, cicloheximida (10 μM , CHX) y con el inhibidor de PKC, bisindolilmaleimida (200nM, BIM).

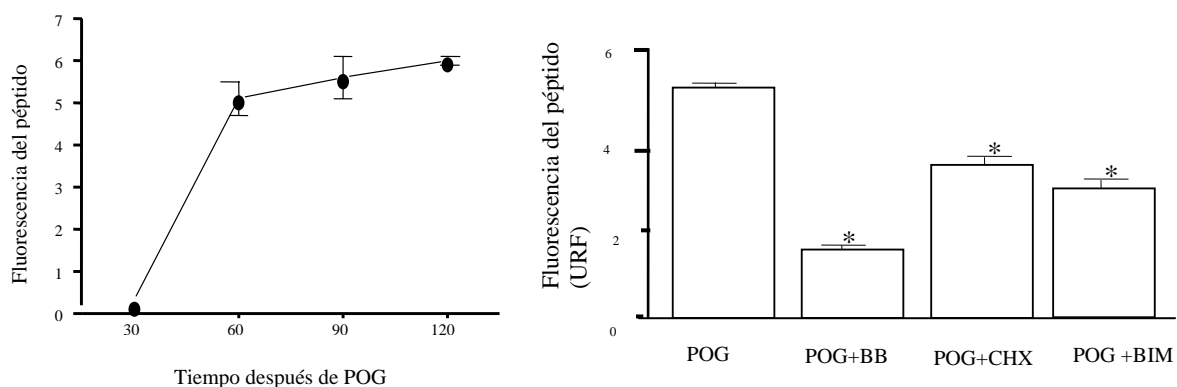


Figura 15. Izquierda: Actividad neta de TACE durante la reperfusion en rebanadas sometidas a 20 minutos de POG. **Derecha:** Actividad neta de TACE en rebanadas a los 120 min de reperfusion. Efecto del BB3103 (0,1 μM , BB), de cicloheximida (10 μM , CHX) y de bisindolilmaleimida I (200nM, BIM) * $p < 0,05$ vs POG $n=4$ URF: unidades relativas de fluorescencia.

1.3 Estudio de la participación de TACE en la inducción de iNOS tras POG

1.3.1 Actividad NOS calcio-independiente

Como se había demostrado previamente, la exposición a 20 minutos de POG produjo la aparición de una actividad NOS calcio-independiente en rebanadas recogidas a 180 minutos de reperfusión. En la figura 16, además, puede observarse un bloqueo en la aparición de dicha actividad cuando las rebanadas fueron incubadas con inhibidores de TACE, tanto con o-fenantrolina (100 μ M) como con BB3103 (0,1-1 μ M). El bloqueo que produce BB3103 (1 μ M) en la actividad se revirtió en presencia de TNF- α exógeno (2 ng/ml). Cuando se añadió anticuerpo anti TNF- α (20 μ g/ml) al medio de incubación se bloqueó la aparición de la actividad iNOS tras POG. La incubación de las rebanadas con bisindolilmaleimida I (200nM) también inhibió la actividad iNOS inducida por POG en ese tejido.

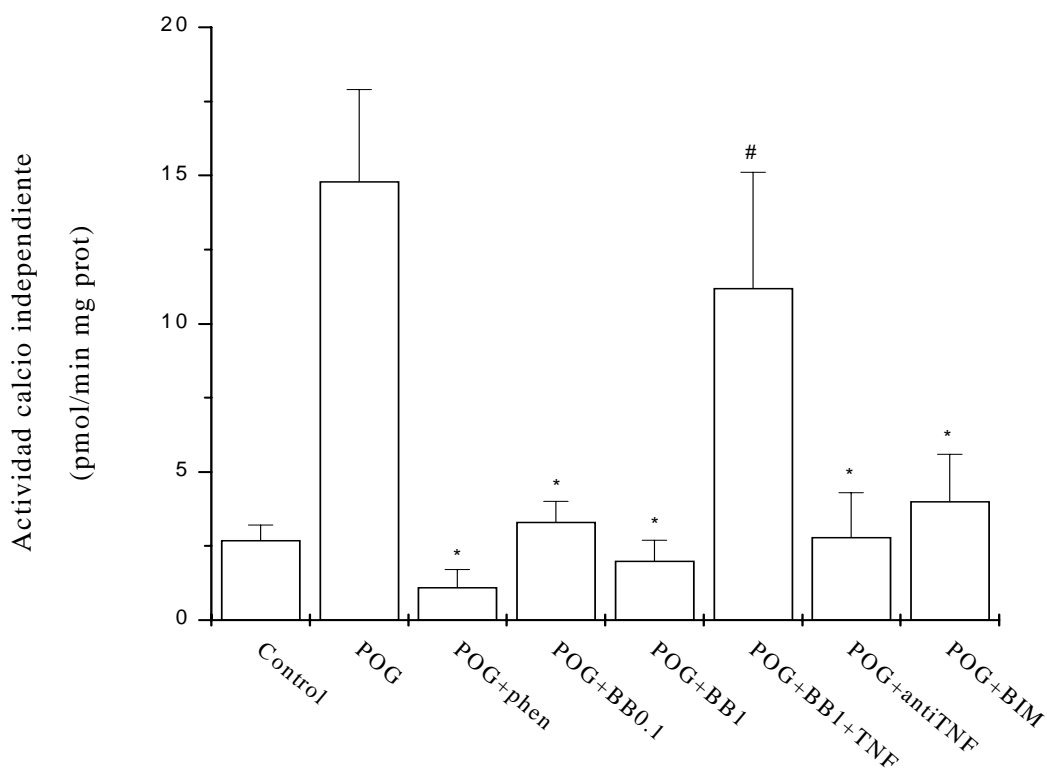


Figura 16. Efecto de los inhibidores de TACE o-fenantrolina (100 μ M, phen), BB3103 (0,1-1 μ M, BB); anticuerpo anti-TNF- α (20 μ g/ml; anti-TNF- α); TNF- α (2ng/ml) en presencia de BB 1 μ M (BB1+TNF) y del inhibidor de PKC bisindolilmaleimida I (200 nM, BIM). * p <0,05 vs POG n =4, # p <0,05 vs OGD+BB1

1.3.2 Análisis de proteína iNOS por Western blot

La exposición de las rebanadas a 20 minutos de POG causó la expresión de proteína iNOS en rebanadas recogidas a los 180 minutos de reperfusión (figura 17). Cuando las rebanadas se coincubaron con o-fenantrolina (100 μ M, phen) y BB3103 (0,1-1 μ M, BB) se produjo una disminución en dicha expresión.

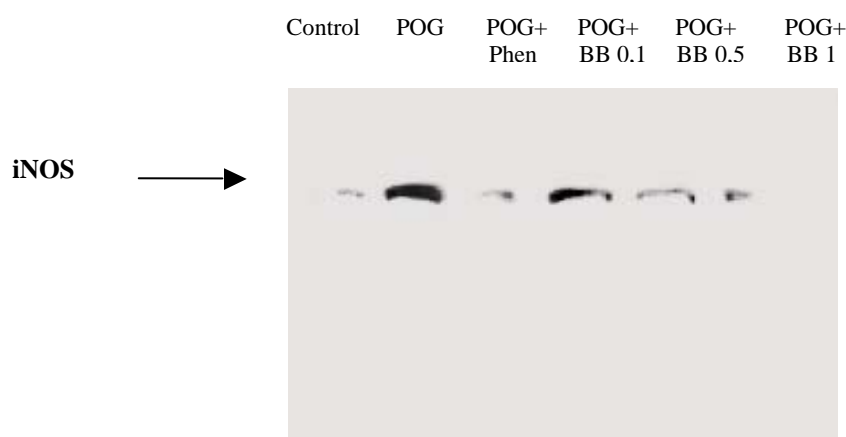


Figura 17. Efecto de los inhibidores de TACE o-fenantrolina (100 μ M; phen) y BB3103 (0,1-1 μ M, BB) sobre la expresión de iNOS en rebanadas sometidas a 20 minutos de POG.

2. RESULTADOS OBTENIDOS EN CULTIVOS PRIMARIOS DE NEURONAS CORTICALES DE RATA

2.1 Estudio de la liberación de TNF- α tras POG y tras exposición a glutámico

2.1.1. Medida de liberación de TNF- α

En la figura 18 se representan los niveles de TNF- α en el medio de incubación de los cultivos corticales después de diversos tratamientos. Se observa un aumento en los niveles de TNF- α en las células sometidas a 150 minutos de POG o a 15 minutos de tratamiento con glutámico (10 μ M) cuando se comparan con el grupo control. Los niveles de TNF- α se midieron al final del periodo de reperfusión (120 minutos). Cuando las células expuestas a POG fueron incubadas con el inhibidor específico de TACE, BB-3103 (0,1-1 μ M) o con el bloqueante del receptor NMDA, MK-801 (100 nM), se produjo una disminución significativa en los niveles de TNF- α liberados al medio de incubación.

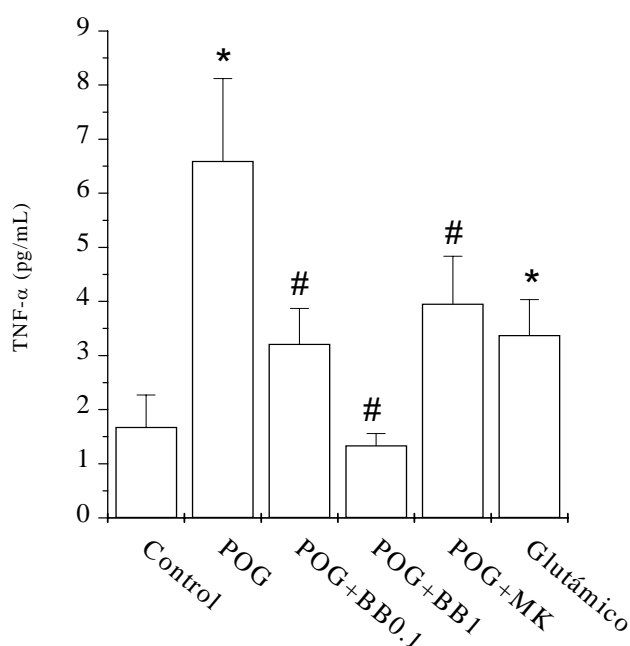


Figura 18. Efecto de POG y de glutámico en la liberación de TNF- α . Efecto del inhibidor de TACE BB3103 (0.1-1 μ M, BB) y del antagonista del receptor NMDA MK-801 (100 nM, MK) en la liberación de TNF- α al medio de incubación tras la POG. Los niveles de TNF- α fueron medidos por ELISA. * p <0,05 vs control $n=4$, # p <0,05 vs POG.

2.2 Estudio de la expresión de TACE y de su regulación tras la exposición a POG y glutámico

2.2.1 Análisis de la proteína TACE por Western blot

Al analizar TACE por Western blot se encontró una banda inmunopositiva en homogenados obtenidos de cultivos corticales (figura 19). Además, cuando las células fueron expuestas a POG durante 150 minutos se produjo un aumento en la expresión de TACE. La exposición de las células a glutámico durante 15 minutos también causó un aumento en la expresión de proteína TACE en las células recogidas a los 120 minutos de reperusión.

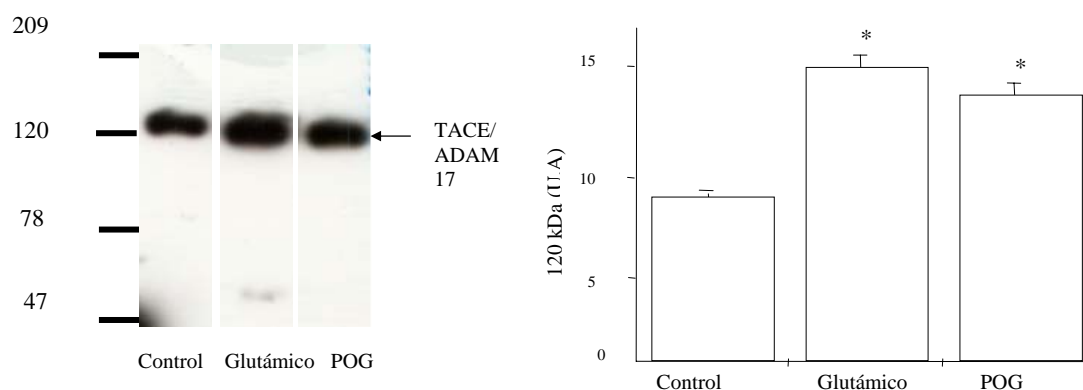


Figura 19. Efecto de glutámico y de POG en los niveles de proteína TACE/ADAM17.

Izquierda: Western blot de TACE en homogenado de células control, expuestas a glutámico y sometidas a POG.

Derecha: Análisis de expresión de proteína TACE por densitometría laser. U.A: unidades de absorbancia. * p <0,05 vs control $n=4$

2.2.2 Actividad TACE en células intactas tras exposición a glutámico

Como puede observarse en la figura 20, cuando las células fueron incubadas con el péptido fluorescente se produjo un aumento en la fluorescencia correspondiente al péptido producto de TACE a lo largo del tiempo de reperusión. Esta fluorescencia fue mayor cuando las células fueron incubadas previamente durante 15 minutos con glutámico 10 μ M. Además, la formación del producto tras la incubación con glutámico se bloqueó cuando son tratadas con el inhibidor de TACE BB3103 (0,1 μ M, BB) o con el inhibidor de síntesis de proteínas cicloheximida (10 μ M, CHX).

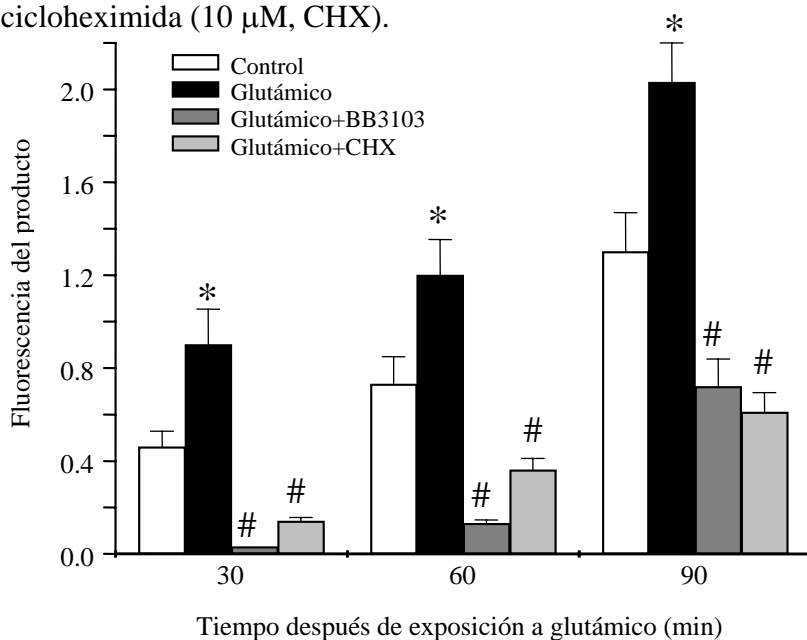


Figura 20. Actividad TACE en células control y en células tratadas con glutámico (10 μ M). Efecto del inhibidor de TACE BB3103 (0,1 μ M; BB) y del inhibidor de la síntesis de proteínas cicloheximida (10 μ M; CHX). * $p < 0,05$ vs control $n=4$, # $p < 0,05$ vs glutámico.

2.3 Estudios de expresión de ADAM10 tras exposición a POG o glutámico

2.3.1 Análisis de la proteína ADAM10 por Western blot

Al analizar por Western blot homogenizados de células corticales se detectó la presencia de ADAM10. Cuando las células fueron expuestas a POG durante 150 minutos, se observó una disminución de dicha expresión (figura 21). La exposición de las células a glutámico durante 15 minutos también disminuyó la expresión de proteína ADAM10 en las células recogidas a los 120 minutos de reperusión.

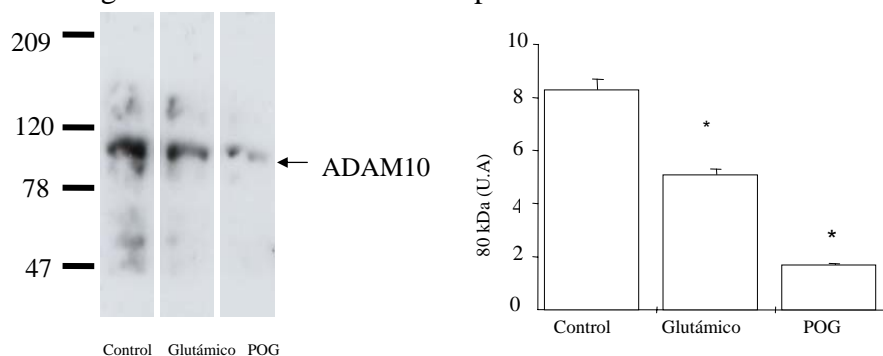


Figura 21. Proteína ADAM10 **Izquierda:** Western blot de ADAM10 en células control, expuestas a glutámico y sometidas a POG. **Derecha:** Análisis de proteína por densitometría laser. U.A: unidades de absorbancia.

2.4 Estudio de la localización celular de TACE

2.4.1. Estudio de colocalización TACE/microglía

La localización celular de TACE se determinó mediante inmunofluorescencia. Así, en las células control se observó que sólo el 30 ± 3 % de las células a las que se une la aglutinina de *L. esculentum* (microglía) fueron TACE positivas (figura 22); tras la exposición a glutámico (10 μ M), el 90 ± 10 % de las células de microglía muestran inmunoreactividad a TACE.

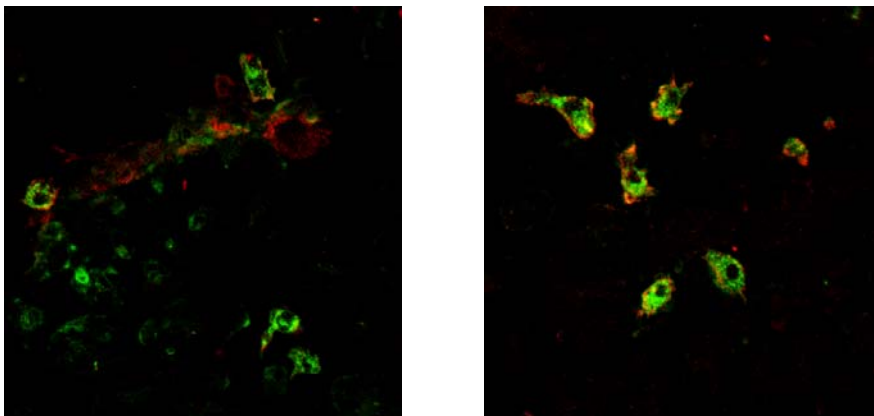


Figura 22. Doble inmunofluorescencia para TACE y microglía/macrófagos. **Izquierda:** situación control. Rojo: TACE. Verde: microglía/macrófagos **Derecha:** células tratadas con glutámico 10 μ M

2.4.2 Estudios de colocalización TACE/astrocitos

En las células control un 2 ± 2 % de las células inmunorreactivas para GFAP (astrocitos) fueron TACE positivas; tras la exposición a glutámico (10 μ M), el porcentaje de células positivas para TACE aumentó a 12 ± 2 % (figura 23).

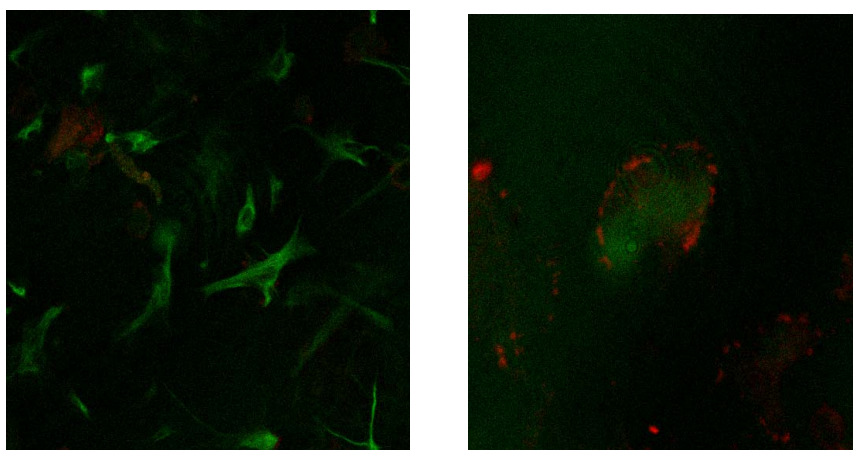


Figura 23. Doble inmunofluorescencia para TACE y astrocitos. **Izquierda:** situación control. Rojo: TACE. Verde: astrocitos **Derecha:** células tratadas con glutámico 10 μ M.

2.5 Estudio de parámetros apoptóticos tras exposición a glutámico

2.5.1 Actividad caspasa 3

En la figura 24 se observa la actividad caspasa 3 en células expuestas a diversos tratamientos. La medida de la actividad se realizó a los 45 minutos y a los 150 minutos de la exposición al estímulo correspondiente. El tratamiento con glutámico no afectó la actividad caspasa 3 medida en las células corticales a ninguno de los tiempos estudiados. Sin embargo, la presencia de BB3103 (0,1 μ M, BB) sí produjo un aumento en la actividad caspasa 3 en los cultivos tratados con glutámico, aumento que fue revertido con la adición de TNF- α exógeno (10 pg/ml).

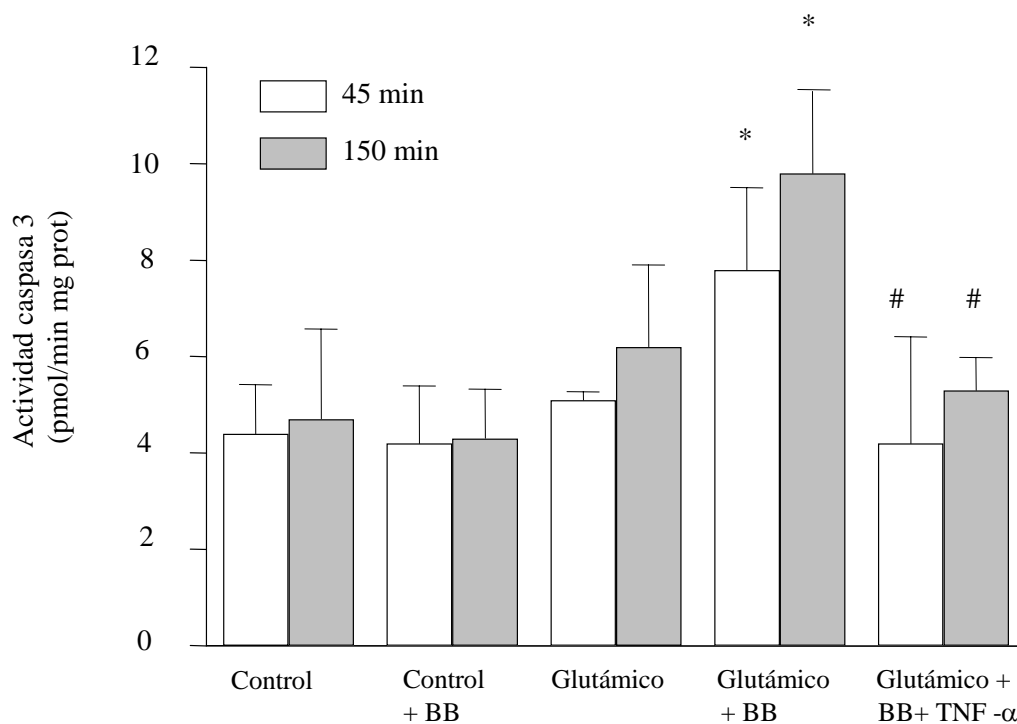


Figura 24. Actividad caspasa 3 en células expuestas a glutámico 10 μ M. Efecto del BB 3103 (0,1 μ M, BB) y del TNF- α (10 pg/ml) en la actividad caspasa 3. * $p < 0,05$ vs glutámico $n=4$. # $p < 0,05$ vs glutámico + BB $n=4$.

2.5.2 Contaje de células positivas para anexina V

En la figura 25 se observa el porcentaje de células que son positivas para anexina V. La exposición a glutámico no produjo un aumento significativo en el número de células positivas para anexina. En cambio, en presencia de BB3103 sí se produjo un aumento significativo en el número de células marcadas con anexina V.

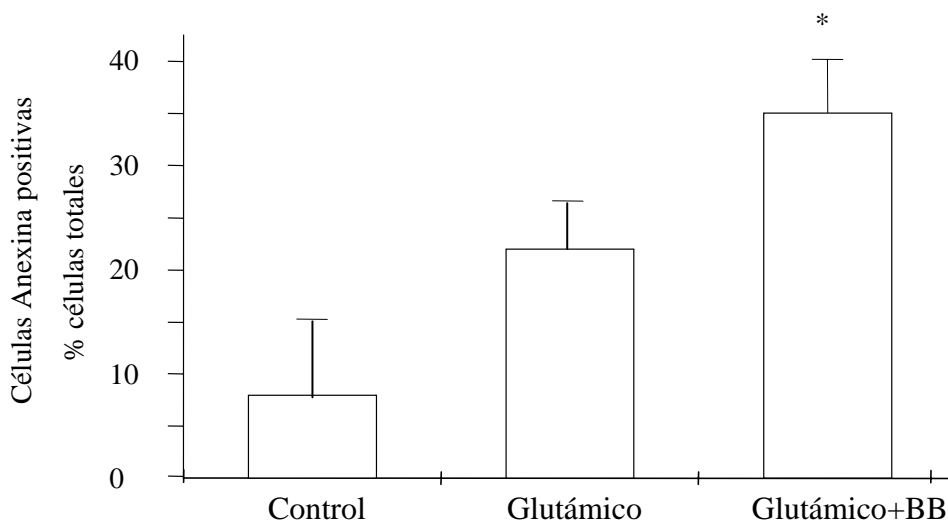


Figura 25. Contaje de células positivas para anexina V. Efecto de la exposición a glutámico (10 μ M) y del inhibidor de TACE, BB3103 (0,1 μ M, BB). * $p < 0,05$ vs glutámico n=4

2.5.3 Contaje de células con la cromatina condensada

En la figura 26 se observa el porcentaje de células que presentan la cromatina condensada, puesto de manifiesto por la tinción con Hoechst 33342. El porcentaje de células con la cromatina condensada fue mayor en las células tratadas con glutámico y BB3103; en cambio la exposición a glutámico en ausencia de BB3103 no produjo un aumento significativo en el número de células positivas respecto a la situación control.

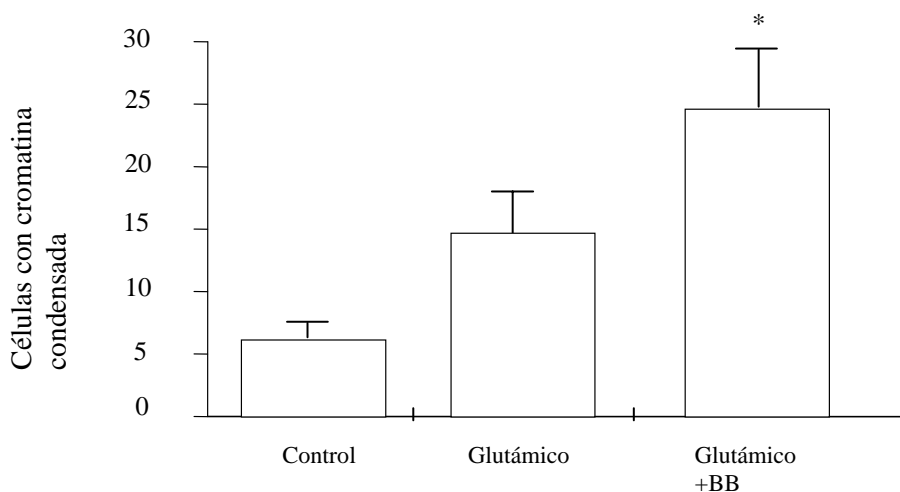


Figura 26. Contaje de células positivas para Hoechst 33342. Efecto de la exposición a glutámico 10 μ M y del inhibidor de TACE, BB3103 (0,1 μ M, BB). * $p < 0,05$ vs glutámico n=4

2.5.4 Caracterización farmacológica del efecto antiapoptótico de la vía TACE/TNF- α

Los datos anteriores sugieren que la vía TACE/TNF- α ejerce un efecto antiapoptótico en este sistema. Con el fin de caracterizar farmacológicamente este efecto, analizamos la actividad de caspasa-3 a los 45 minutos del tratamiento con glutámico y BB3103, en presencia del inhibidor de NF- κ B MG-132 (75 μ M, MG) y del inhibidor de PI3-kinasa LY 294002 (20 μ M, LY) (figura 27). Tanto el MG-132, como el LY 294002 produjeron un aumento de la actividad caspasa 3 en células control. Cuando las células fueron expuestas a glutámico, sólo MG-132 causó un aumento superior en la actividad caspasa 3 al encontrado en el grupo control. Además, la adición de TNF- α exógeno en estas condiciones revirtió el aumento de actividad caspasa 3 producido por BB3103.

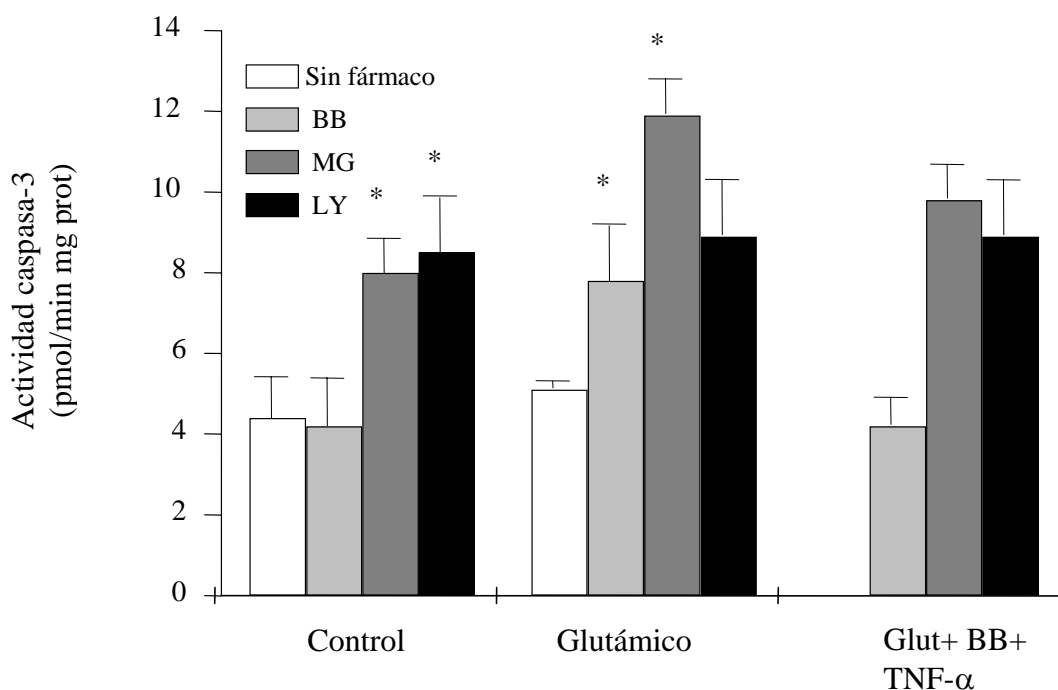


Figura 27. Caracterización farmacológica del efecto antiapoptótico de la vía TACE/TNF- α . Efecto del inhibidor de NF- κ B MG-132 (75 μ M, MG) y del inhibidor de PI3-kinasa LY 294002 (20 μ M, LY). * $p < 0,05$ vs control $n=4$.

I.INTRODUCCIÓN
II.HIPÓTESIS Y OBJETIVOS
III.MATERIAL Y MÉTODOS
IV.RESULTADOS
V.DISCUSIÓN
VI.CONCLUSIONES
VII.BIBLIOGRAFÍA

1. PARTICIPACIÓN DE LA VIA TACE/TNF- α EN ISQUEMIA CEREBRAL.

1.1 LIBERACIÓN DE TNF- α

Ya se ha comentado previamente en el apartado de Introducción que tras un proceso de isquemia cerebral se produce un rápido aumento en los niveles de citoquinas en general y en concreto de TNF- α (Liu y cols., 1994; Buttini y cols., 1996; De Bock y cols., 1996; Feuerstein y cols., 1998); fenómeno que debíamos demostrar en nuestros modelos experimentales de isquemia, para poder posteriormente contestar los objetivos que nos habíamos fijado.

En este sentido, nuestros resultados utilizando el modelo de rebanadas de cerebro anterior de rata o el modelo de cultivo de neuronas corticales demuestran que la exposición a la privación de oxígeno y glucosa (POG) produce un aumento en los niveles de TNF- α liberados al medio de incubación. Estos resultados están de acuerdo con lo previos descritos por otros autores tanto en modelos *in vitro* de isquemia cerebral (De Bock y cols., 1996; Tezel y cols., 2000), como en modelos *in vivo* (Liu y cols., 1994; Buttini y cols., 1996) y ponen de manifiesto la validez de los modelos experimentales utilizados en esta Tesis Doctoral para llevar a cabo el estudio de la vía TACE/TNF- α en la isquemia cerebral.

1.2 PROCESADO DE TNF- α : TACE

a) Liberación de TNF- α a través de TACE

Una vez demostrado que en nuestros modelos se producía la liberación de TNF- α tras POG, el siguiente objetivo era estudiar si este TNF- α se estaba produciendo gracias al enzima TACE/ADAM17. TACE/ADAM17 es el enzima encargado de la liberación, mediante el proceso de “shedding” (del que se habló ampliamente en la Introducción) del TNF- α que se encuentra unido a la membrana en forma de precursor (Gearing y cols., 1994; Black y cols., 1997; Moss y cols., 1997; Rosendahl y cols., 1997).

Los estudios farmacológicos que llevamos a cabo, demuestran que el incremento de los niveles de TNF- α tras POG es inhibido por o-fenantrolina, un inhibidor de metaloproteasas de amplio espectro, y por un hidroxamato -el BB3103- inhibidor específico

de metaloproteasas con actividad “sheddasas” (Ancuta y cols., 1997; Middelhoven y cols., 1997; Fiorucci y cols., 1998; Lammich y cols., 1999). Estos resultados nos sugerían la participación de TACE en dicha liberación.

Además, el valor de IC_{50} de BB3103 que inhibió la liberación de TNF- α inducida por POG en ambos modelos utilizados, fue de $0.1\mu M$, lo que confirmaba la participación de TACE en la liberación de TNF- α . De hecho, aunque otras proteasas como α -secretasa o ADAM10, poseen la capacidad de liberar el TNF- α unido a la membrana (Lammich y cols., 1999), los hidroxamatos han sido utilizados para distinguir entre esas proteasas y TACE, ya que son más potentes para inhibir TACE (IC_{50} entre 0,05 y $0.1\mu M$) que para inhibir la α -secretasa o ADAM10 (IC_{50} en un rango de 3 a $20\mu M$; Parvathy y cols., 1998; Hooper y cols., 2000). Por último el que los niveles de la proteína ADAM10 estén disminuidos después de POG (como comentaremos posteriormente) de nuevo confirma la participación de TACE en la liberación de TNF- α .

b) Existencia de TACE en nuestros modelos

Una vez demostrado que en nuestros modelos se producía una liberación de TNF- α , y que los datos farmacológicos sugerían que TACE estaba implicada en su liberación; decidimos estudiar en nuestros modelos la expresión de TACE en situaciones control así como su regulación tras la exposición a POG.

Nuestros resultados, determinando directamente la actividad enzimática, confirman la existencia de actividad TACE en tejido control. Además mediante el análisis por estudios de Western Blot y RT-PCR demostró la presencia de proteína y RNAm TACE en dicho tejido. Estos resultados junto con los bajos niveles de proteína que hemos encontrado están de acuerdo con un trabajo reciente que demuestran la existencia de RNAm de TACE en cerebro adulto de rata y ratón (Kärkkäinen y cols., 2000).

Además y más relevante es que demostramos que la POG produce un aumento de la actividad TACE. El hecho de que la actividad enzimática esté aumentada tras la POG, inicialmente sugiere que TACE puede estar regulada bien a nivel de actividad enzimática, bien de síntesis proteica *de novo* o de ambas. En la mayoría de los tipos celulares, la activación de TACE no requiere ni de síntesis proteica ni de transcripción del mensajero

(Black y cols., 1997; Watanabe y cols., 1998), sin embargo, nuestros datos son los primeros en indicar que la expresión de TACE está aumentada después de POG, como se demuestra por el hecho de que los niveles de proteína y de mRNA TACE son mayores tras POG en comparación con los controles. Es importante destacar que en los homogenados de rebanadas de cerebro anterior cuando se analizó la proteína TACE por Western blot, aparecen dos bandas de 100 kDa y de 180 kDa que han sido descritas que corresponden a la TACE madura y glicosilada (Schlöndorff y cols., 2000); sin embargo en el caso de los homogenados de células sólo aparece una única banda correspondiente a TACE madura; posiblemente este hallazgo se deba a que fueron sometidos a un proceso de deglicosilación previa.

Estos resultados nos demuestran la existencia de TACE tanto en rebanadas de cerebro anterior de rata, como en cultivos de neuronas corticales y también que la actividad y la expresión TACE aumentan tras la POG.

La mayoría de los estudios que existen hasta ahora indican que TACE es regulada a nivel post-translacional. En este sentido, se ha comprobado que la maduración por actividad proteolítica es esencial para generar TACE activa (Milla et al 1999). Además, se ha descrito en diferentes trabajos, la implicación de los ésteres de forbol posiblemente vía PKC en la activación de TACE (Arribas y cols., 1996; Hooper y cols., 2000; Doedens y Black, 2000). Este mecanismo parece ser el que está implicado en nuestro modelo de rebanadas de cerebro anterior de rata, ya que el inhibidor de PKC utilizado es capaz de reducir no sólo la liberación de TNF- α inducida por POG sino también la actividad TACE en rebanadas intactas expuestas a POG. Estos datos nos indican que en nuestro modelo la función TACE está siendo íntimamente regulada a nivel de su actividad catalítica por PKC.

Por último, el hallazgo de la inhibición de la liberación de TNF- α inducida por POG, por parte de un inhibidor de la síntesis proteica como es la cicloheximida, nos sugieren que es necesario una síntesis de proteína para la liberación de TNF- α ; pero lo que no nos clarificaba era si esta síntesis era debida a una síntesis de pro-TNF- α , de TACE o de ambos. Para estudiar este punto, las rebanadas se incubaron con un péptido fluorescente (pro-péptido) que contiene la secuencia de pro-TNF- α a concentraciones de saturación. El resultado obtenido nos indica que la rotura del pro-péptido en rebanadas sometidas a POG, no sólo se inhibía con el inhibidor de PKC sino también con el inhibidor de la síntesis de proteínas. Por tanto, TACE no sólo está regulada a nivel de actividad catalítica sino que también es importante el aumento en la expresión de TACE/ADAM17 para la liberación de TNF- α tras POG.

2. REGULACIÓN DE TACE/TNF- α POR GLUTÁMICO

Ya hemos comentado que durante la isquemia cerebral existe una liberación de glutámico que interviene entre otros procesos en los de excitotoxicidad (para revisión ver Goldberg y Choi, 1995). Nuestro grupo previamente ya había demostrado que en los modelos utilizados en esta Tesis Doctoral también se produce liberación de glutámico tras POG y que este glutámico participa en procesos de muerte celular (Cárdenas y cols., 2000). Con estos antecedentes y teniendo en cuenta, como hemos visto anteriormente, que la liberación de TNF- α también ha sido relacionada con procesos de muerte; nos planteamos que el glutámico podía estar regulando de alguna manera la liberación de TNF- α y/o la expresión de TACE.

2.1 GLUTÁMICO Y TACE/TNF- α

El primer resultado que nos sugiere que el glutámico es responsable, al menos en parte, de la liberación de TNF- α y de la regulación de TACE es el efecto que hemos encontrado con el antagonista de los receptores NMDA (MK-801). La incubación de la células expuestas a POG con MK-801 produce una inhibición de la liberación de TNF- α inducida por isquemia. Además, nuestros resultados demostrando que la exposición de las células a glutámico es capaz “per se” de producir un aumento de los niveles de TNF- α liberados al medio, confirma la participación de este aminoácido.

Además, estos resultados fueron confirmados mediante el estudio de la proteína TACE por Western blot que demuestra un aumento de expresión TACE tras exposición a glutámico. También hemos demostrado que existe una mayor actividad TACE en las células expuestas a glutámico que en las controles. Aunque, como ya comentamos en el apartado anterior, la inhibición farmacológica de la producción de TNF- α con concentraciones bajas de BB3103 excluyen la participación de ADAM10 en el procesado de esta citoquina, hemos confirmado estos datos, al mostrar que aunque ADAM10 está presente en tejido control, sus niveles están aún incluso disminuidos después de la exposición a glutámico.

Por último, al igual que en el caso de la regulación de TACE por POG, el aumento de expresión TACE por glutámico podía estar regulada bien a nivel de actividad enzimática, bien de síntesis proteica *de novo* o de ambas. Para dilucidar esta pregunta, seguimos la misma pauta que en el caso de POG y las células se incubaron con un péptido fluorescente (pro-

péptido) que contiene la secuencia de pro-TNF- α a concentraciones de saturación. El resultado obtenido indicándonos que la rotura del pro-péptido en células expuestas a glutámico, se inhibe con ambos el BB3103 y con el inhibidor de la síntesis de proteínas nos sugiere de forma consistente que el aumento tanto de actividad como de expresión TACE interviene en la liberación de TNF- α tras glutámico.

2.2 LOCALIZACIÓN CELULAR DE TACE

El siguiente punto que decidimos estudiar fue la localización celular de TACE. Así, en los cultivos primarios pudimos ver que ninguna célula que era inmunoreactiva para astrocito (GFAP) expresaba TACE, pero cuando las células eran expuestas a glutámico algunos astrocitos sí que expresaban TACE. En cuanto a la microglía, en células control alguna célula a la que se une la aglutinina de *L. esculentum* (microglía) si expresa TACE y prácticamente toda la microglía expresa TACE cuando el cultivo es expuesto a glutámico.

Estos resultados explicarían algunos descritos por otros autores como el incremento de la producción de TNF- α tras la estimulación del receptor de glutámico AMPA-kainato en microglía (Noda y cols., 2000) o tras POG en astrocitos (Tezel y Wax, 2000). Estos resultados sugieren que la activación de los receptores de glutámico en células gliales inducen la regulación a la alta de TACE/ADAM17 en éstas células. La región promotora TACE/ADAM17 contiene múltiples sitios de unión para factores de transcripción como AP2 y SP1 (Mizui y cols., 1999) que pueden ser responsables de este efecto.

Este resultado supone la primera demostración de la localización de TACE y su regulación por el incremento de la expresión en células gliales tras la exposición a glutámico. Recientemente se ha descrito la existencia de TACE en astrocitos y células endoteliales humanas (Goddard y cols., 2001) y en neuronas del córtex y del hipocampo en pacientes con enfermedad de Alzheimer (Skovronsky y cols., 2001). Por último, se ha encontrado también expresión de TACE en pacientes con meningitis bacteriana (Leib y cols., 2001) y en un modelo de colitis experimental (Colón y cols., 2001), demostrando una vez más que la expresión de TACE está muy relacionada con procesos inflamatorios.

3. PAPEL DE LA VIA TACE /TNF- α EN ISQUEMIA CEREBRAL

Una vez demostrado la expresión constitutiva de TACE, su regulación a la alta tras un proceso isquémico y por glutámico y su localización, la pregunta que quedaba por responder era el papel que posee esta nueva vía TACE/TNF- α en el SNC y tras procesos de isquemia.

3.1 PAPEL DE TACE/ TNF- α EN LA INDUCCIÓN DE iNOS

Clásicamente, TNF- α ha sido implicado en los **procesos de toxicidad** ya que la administración de anticuerpos anti-TNF- α producía una disminución de los infartos isquémicos, y por otra parte la administración de TNF- α potenciaba el daño. Los mecanismos por los que TNF- α produce daño son múltiples: aumentando la permeabilidad de la barrera hematoencefálica por efectos a nivel vascular, induciendo la expresión de moléculas de adhesión, favoreciendo la acumulación de neutrófilos, induciendo, a través de mecanismos NF- κ B-dependientes la expresión de genes inflamatorios como iNOS/COX-2 que inducen apoptosis en neuronas (Ogura y cols., 1997; Chung y cols., 1999; Heneka y cols., 1999; Tezel y Wax, 2000; Combs y cols., 2001) y que son potentes productores de radicales libres (para revisión ver Lipton 1999) o inducir apoptosis via TNFR1 (p55), que produce la activación de caspasas (para revisión ver Askenazi y Dixit, 1998)

Previos trabajos de nuestro grupo habían demostrado que la isoforma inducible de NOS, iNOS, se expresa en rebanadas de cerebro después de POG (Moro y cols., 1998; De Alba y cols., 1999; Cárdenas y col., 1998, 2000). Además, la implicación de TNF- α en la expresión de iNOS está ampliamente documentada (Galea y cols., 1992; Simmons and Murphy 1992, 1993; Peterson y cols., 1994; Minc-Golomb y cols., 1994, 1996; Akama y Van Eldik, 2000). Faltaba por demostrar cuál era la relación entre ambos y que hasta entonces no había sido demostrado.

Para demostrar que el TNF- α liberado por las rebanadas de cerebro anterior de rata tras la POG, producía una inducción en la actividad iNOS, dichas rebanadas fueron coincubadas con , o-fenantrolina y con el inhibidor específico de TACE, BB3103. Tanto o-fenantrolina, como BB3103 inhibieron no sólo la liberación de TNF- α inducida por POG que ya hemos comentado, sino también la actividad y la expresión iNOS. Estos resultados indican que el TNF- α liberado a partir de TACE está involucrado en la expresión de iNOS en rebanadas de cerebro anterior de rata sometidas a POG. Además, la inhibición en la expresión

de iNOS neutralizando el TNF- α con el anticuerpo anti-TNF- α o indirectamente por la inhibición de PKC con bisindolilmaleimida I, y por último la reversión de la inhibición de la actividad iNOS inducida por BB3103 cuando el TNF- α se añade de manera exógena, nos demuestran por primera vez que el TNF- α participa en la expresión de iNOS después una POG en SNC y la participación de TACE en la isquemia cerebral.

3.2 PAPEL DE TACE/ TNF- α EN LA NEUROPROTECCIÓN

Pero además, existen múltiples evidencias que demuestran un **papel neuroprotector** inducido por TNF- α (Cheng y cols., 1994; Mattson y cols., 1995; Houzen y cols., 1997; Shinpo y cols., 1999; Sullivan y cols., 1999; Tarkowski y cols., 1999). Por ejemplo, ratones deficientes genéticamente en el receptor TNF desarrollan infartos mayores que los ratones que no poseen esa deficiencia (Bruce et al., 1996). También se ha demostrado que TNF- α posee acciones anti-apoptóticas en células nerviosas (Barger y cols., 1995; Mattson y cols., 1997; Tamatani y cols., 1999; Diem y cols., 2001) y que induce factores de crecimiento en astrocitos que contribuye a la supervivencia neuronal a través de un mecanismo NF- κ B-dependiente (Donato y cols., 1989, Feuerstein y cols., 1994).

Para estudiar este último papel del TNF- α en nuestro sistema se usó el modelo de cultivo primario de neuronas corticales de rata, exponiendo las células a una concentración de glutámico que sólo producía un daño débil y no era capaz de matar las células por necrosis. Esta concentración no fue suficiente para producir un aumento en la actividad caspasa-3. Cuando estas células se coincubaron con BB3103, además de la caída en los niveles de TNF- α se produce un aumento en la actividad caspasa 3, demostrando el papel antiapoptótico del TNF- α . Este resultado se confirmó mediante la incubación de las células con TNF- α exógeno, que hizo que la actividad caspasa 3 disminuyera. Así se demuestra que TNF- α tiene un efecto antiapoptótico en nuestro modelo de neuronas corticales. Estas acciones antiapoptóticas de TNF- α las encontramos no sólo a 45 minutos después del tratamiento con glutámico, sino también a 150 minutos, lo que sugiere que tanto el aumento en la actividad enzimática como en la expresión TACE tienen un papel fundamental en este efecto antiapoptótico.

Cuando se estudiaron otros parámetros apoptóticos, como por ejemplo el número de células positivas para anexina y el número de núcleos con la cromatina condensada el

resultado que se obtuvo fue el mismo, es decir el número de eventos apoptóticos fue mayor cuando las células eran coincubadas con BB3103.

Existen múltiples evidencias que señalan a NF- κ B como el principal mediador del efecto antiapoptótico de TNF- α (para revisión ver Mattson y cols., 2000). NF- κ B es un factor de transcripción que se encuentra en forma inactiva en el citosol interaccionando con I κ B (Baldwin, 1996; Verma y Stevenson, 1997; Ghosh y cols., 1998; Karin, 1999). La activación se produce por fosforilación y degradación de I κ B. Una vez activado se produce la translocación al núcleo. El mecanismo por el cual el TNF- α produce un efecto antiapoptótico implica fundamentalmente al receptor de TNF- α tipo I (TNFR1) que a través de TRADD produce una activación de IKK (Hsu y cols., 1995, 1996; Lee y cols., 1997; Malinin y cols., 1997, Regnier y cols., 1997; Karin y Delhase, 1998). También a través de este receptor se activa la ruta PI3quinasa/Akt (Hanna y cols., 1999; Kim y cols., 1999; Ozes y cols., 1999; Reddy y cols., 2000), que permite una activación de Akt que fosforila IKK (Ozes y cols., 1999; Romashkova y Makarov, 1999).

Para estudiar a través de que vía se está produciendo el efecto antiapoptótico de TNF- α bien a través de NF- κ B o bien a través de la vía PI3quinasa/Akt, las células se incubaron con un inhibidor de NF- κ B, MG-132 y con un inhibidor de PI3quinasa, LY 249002. Ambos, MG-132 como LY 249002 produjeron un aumento en la actividad caspasa-3 de las células control, lo que indica que ambas rutas son necesarias para la supervivencia de la célula. Sin embargo después de la exposición a glutámico sólo MG-132 aumentó la actividad caspasa-3 comparada con su respectivo control, y no LY 249002 lo que nos indica que la ruta PI3quinasa/Akt no está implicada en el efecto antiapoptótico de TNF- α tras exposición a glutámico. Para comprobar que el TNF- α endógeno era responsable de la acción antiapoptótica enmascarada en presencia de BB3103, realizamos el experimento añadiendo TNF- α exógeno estando bloqueada la producción endógena con BB3103; en estas condiciones MG-132 revirtió la acción inhibitoria de TNF- α en la actividad caspasa-3 después de la exposición a glutámico y en presencia de BB3103.

Con estos experimentos se demostró que el efecto antiapoptótico de TNF- α se produce a través de NF- κ B.

I.INTRODUCCIÓN
II.HIPÓTESIS Y OBJETIVOS
III.MATERIAL Y MÉTODOS
IV.RESULTADOS
V.DISCUSIÓN
VI.CONCLUSIONES
VII.BIBLIOGRAFÍA

Las principales conclusiones de esta tesis doctoral son las siguientes:

- 1) La exposición de rebanadas de cerebro anterior de rata o de cultivos corticales de rata a privación de glucosa y oxígeno (dos maneras de isquemia experimental *in vitro*) produce una liberación de TNF- α al medio de incubación.
- 2) El TNF- α liberado en estos modelos se produce principalmente por la actividad enzimática del enzima TACE/ADAM17.
- 3) La isquemia experimental en estos modelos provoca un aumento en la expresión y actividad de TACE.
- 4) El glutámico liberado por la isquemia experimental es responsable, al menos en parte de la regulación a la alta de TACE.
- 5) La localización celular de TACE se concreta en microglía en situación control y tras tratamiento con glutámico se observa también en astrocitos.
- 6) El TNF- α liberado por rebanadas de cerebro anterior de rata es esencial para la expresión de iNOS tras la isquemia experimental.
- 7) Por otra parte, el TNF- α liberado tras la exposición de cultivos corticales a un estímulo glutámico subletal indica un efecto antiapoptótico, por activación de NF- κ B.

I.INTRODUCCIÓN
II.HIPÓTESIS Y OBJETIVOS
III.MATERIAL Y MÉTODOS
IV.RESULTADOS
V.DISCUSIÓN
VI.CONCLUSIONES
VII.BIBLIOGRAFÍA

- Acarin L., González B., Castellano B., Castro AJ. (1996). Microglial response to N-methyl-D-aspartate-mediated excitotoxicity in the immature rat brain. *J Comp Neurol.* **367**, 361-374.
- Acarin L., Vela JM., González B., Castellano B. (1994). Demonstration of poly-N-acetyl lactosamine residues in amoeboid and ramified microglial cells in rat brain by tomato lectin binding. *J Histochem Cytochem.* **42**, 1033-1041.
- Ahonen M., Baker A:H., Kähäri V.M (1998). Adenovirus-mediated gene delivery of tissue inhibitor of metalloproteinase-3 inhibits invasion and induces apoptosis in melanoma cells. *Cancer Res.* **58**, 2310-2315.
- Aitken PG., Breese GR., Dudek FF., Edwards F., Espanol MT., Larkman PM., Lipton P., Newman GC., Nowak Jr TS., Panizzon KL., Raley-Susman KM., Reid KH., Rice ME., Sarvey JM., Schoepp DD., Segal M., Taylor CP., Teyler TJ and Voulalas PJ. (1995). Preparative methods for brain slices: a discussion. *J Neurosci Meth.* **59**, 139-149.
- Akama K.T., Van Eldik L.J. (2000). Beta-amyloid stimulation of inducible nitric-oxide synthase in astrocytes is interleukin-1 β - and tumor necrosis factor- α (TNF α)-dependent, and involves a TNF α receptor-associated factor- and NF κ B-inducing kinase-dependent signaling mechanism. *J Biol Chem.* **275**, 7918-7924.
- Alberts MJ., Bertels C., Dawson DV. (1990). An analysis of time of presentation after stroke. *JAMA.* **263**, 65-68.
- Amour A., Slocombe P., Webster A., Butler M., Knight G., Smith B., Stephens P., Shelley C., Hutton M., Knäuper V., Docherty A., and Murphy G. (1998). TNF- α converting enzyme (TACE) is inhibited by TIMP-3. *FEBS Letters.* **435**, 39-44.
- Ancuta P., Fahmi H., Pons JF., Le Blay K., and Chaby R (1997). Involvement of the membrane form of tumour necrosis factor- α in lipopolysaccharide-induced priming of mouse peritoneal macrophages for enhanced nitric oxide response to lipopolysaccharide. *Immunology.* **92**, 259-266.
- Arribas J., Coodly L., Vollmer P., Kishimoto T.K., Rose-John S., Massague J. (1996). Diverse cell surface protein ectodomains are shed by a system sensitive to metalloprotease inhibitors. *J Biol Chem.* **10**, 11376-11382.
- Arriza JL., Eliasof S., Kavanaugh MP. And Amara SG. (1997). Excitatory amino acid transporter 5, a retinal glutamate transporter coupled to a chloride conductance. *Proc Natl Aca Sci USA.* **94**, 4155-4160.
- Asahi M., Asahi K., Jung J., Del Zoppo G., Fini ME., Lo EH. (2000). Role for matrix metalloproteinase 9 after focal cerebral ischemia: effects of gene knockout and enzyme inhibition with BB-94. *J Cereb Blood Flow Metab.* **20**, 1681-89.
- Askenazi A., and Dixit VM. (1998). Death receptors: signaling and modulation. *Science.* **281**, 1305-1308.
- Astrup J., Symon L., Branston NM and Lassen NA. (1977). Cortical evoked potential and extracellular K⁺ and H⁺ at critical levels of brain ischaemia. *Stroke.* **8**, 51-57.

Balasingan V., Tejada-Berges T., Wright E., Bouckova R, Young VW (1994) Reactive astrogliosis in the neonatal mousebrain and its modulation by cytokines. *J Neurosci.* **14**, 846-856.

Baldwin AS Jr. (1996) The NF-kappa B and I kappa B proteins: new discoveries and insights. *Annu Rev Immunol.* **14**, 649-83.

Barger SW., Horster D., Furukawa K., Goodman Y., Krieglstein J. and Mattson MP. (1995). Tumor necrosis factors alpha and beta protect neurons against amyloid beta-peptide toxicity: evidence for involvement of a kappa B-binding factor and attenuation of peroxide and Ca²⁺ accumulation. *Proc Natl Acad Sci USA.* **92**, 9328-32.

Barna B., Estes M., Jacobs B., Hudson S. And Ransohoff R. (1990). Human astrocytes proliferate in response to tumor necrosis factor alpha. *Journal of Neuroimmunology.* **30**, 239-243.

Barone F., Arvin B., White B., Miller A., Webb C., Willette R., Lysko P. And Feuerstein G. (1997). Tumor necrosis factor alpha. A mediator of local ischaemia brain injury. *Stroke.* **28**, 1233-1244.

Bates S., Read SJ., Harrison DC., Topp S., Morrow R., Gale D., Murdock P., Barone FC., Parsons AA., Gloger IS. (2001). Characterisation of gene expression changes following permanent MCAO in the rat using subtractive hybridisation. *Mol Brain Res.* **93**, 70-80.

Bazan NG. (1989). Arachidonic acid in the modulation of excitable membrane function and at the onset of brain damage. *Ann N Y Acad Sci.* **559**, 1-16.

Beckman JS, Beckman TW, Chen J, Marshall PA and Freeman BA. (1990). Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc Natl Acad Sci USA.* **87**, 1620-1624.

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

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

Bodmer JL., meier P., Tschopp J., Schneider P. (2000). Cysteine 230 is essential for the structure and activity of the cytotoxic ligand TRAIL. *J Biol Chem.* **275**, 20632-7.

Borland G., Murphy G., and Ager A. (1999). Tissue inhibitor of metalloproteinase 3 inhibits of L-selectin from leukocytes. *J Biol Chem.* **274**, 2810-2815.

Breder C., Hazulea C., Ghayur T., Klug C., Huginin M., Yasuda K., Teng M., and Saper C. (1994). Regional induction of tumor necrosis factor α expression in the mouse after systemic lipopolysaccharide administration. *Proc Natl Acad Sci USA.* **91**, 11393-11397.

- Brojatsch J., Naughton J., Rolls M.M., Zingler K., Young J.A.T. (1996). CAR 1, a TNF-related protein is a cellular receptor for cytopathic avian leukosis-sarcoma viruses and mediates apoptosis. *Cell*. **87**,845-55.
- Brosnan CF., Litwak MS., Schroeder CE., Selmaj K., Raine CS., Arezzo JC. (1989). Preliminary studies of cytokine-induced functional effects on the visual pathways in the rabbit. *J Neuroimmunol*. **25**, 227-39.
- Brott T. and Bogousslavsky J. (2000). Treatment of acute ischemic stroke. *N Engl J Med*. **343**, 710-22.
- Brown P.D. (1999). Clinical studies with matrix metalloproteinase inhibitors. *APMIS*. **107**, 174-80.
- Bruce AJ., Boling W., Kindy MS., Peschon J., Kraemer PJ., Carpenter MK., Holsberg FW., and Mattson MP. (1996). Altered neuronal and microglial responses to excitotoxic and ischemic brain injury in mice lacking TNF receptor. *Nat Med*. **2**, 788-94.
- Bursch W., Oberhammer BF., and Schuler-Hermann R. (1992). Cell death by apoptosis and its protective role against disease. *Trends Pharmacol Sci*. **13**, 245-251.
- Buttini M., Appel K., Sauter A., Gebicke-Haerter P., and Boddeke H. (1996). Expression of tumor necrosis factor alpha after focal cerebral ischemia in the rat. *Neuroscience*. **71**, 1-16.
- Buxbaum J.D., Liu K.N., Luo Y., Slack J.L., Stocking K.L., Peschon J.J., Johnson R.S., Castner B.J., Cerretti D.P., and Black R.A. (1998). Evidence that tumor necrosis factor alpha converting enzyme is involved in regulated α -secretase cleavage of the Alzheimer amyloid protein precursor. *J Biol Chem*. **273**, 27765-27767.
- Cárdenas A., De Alba J., Moro M.A., Leza J.C., Lorenzo P., and Lizasoain I. (1998). Neuroprotective effect of N-(3-(aminomethyl benzyl) acetamidine, an inducible nitric oxide synthase inhibitor, in brain slices exposed to oxygen-glucose deprivation. *Eur J Pharmacol*. **354**, 161-165.
- Cárdenas A., Moro M.A., Hurtado O., Leza J.C., Lorenzo P., Boscá L., Bodelón O.G., Lizasoain I. (2000). Implication of glutamate in the expression of inducible nitric oxide synthase after oxygen and glucose deprivation in rat forebrain slices. *J Neurochem*. **74**, 2041-2048.
- Carswell E.A., Old L.J., Kassel R.L., Green S., Flore N., and Williamson B. (1975). An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc Natl Acad Sci USA*. **72**, 3666-3670.
- Chan PH. (1996). Role of oxidants in ischemic brain damage. *Stroke*. **27**, 1124-1129.
- Chantry A., Gergson N., and Glynn P. (1992). Degradation of myelin basic protein by a membrane-associated metalloprotease neural distribution of the enzyme. *Neurochem Res*. **17**, 861-868.
- Chao C., and Hu S. (1994). Tumor necrosis factor- α potentiates glutamate neurotoxicity in human fetal brain cell cultures. *Developmental Neuroscience*. **16**, 172-179.

- Chao DT and Korsmeyer SJ (1998). Bcl-2 family: regulators of cell death. *Annu Rev Immunol.* **16**, 395-419.
- Cheng B., Christakos S. And Mattson MP. (1994). Tumor necrosis factor protect neurons against metabolic excitotoxic insults and promote maintenance of calcium homeostasis. *Neuron.* **14**, 139-153.
- Chinnaiyan A.M., O'Rourke K., Yu G.L., Lyons R.H., Garg H., Duan D.R., Xing L., Gentz R., Ni J., Rixit V.M. (1996). Signal transduction by DR3, a death domain containing receptor related TNFR-1 and CD95. *Science.* **274**, 990-2.
- Chirgwin J.M., Przybyla A.E., MacDonal, R.J & Rutter, W.J. (1979). Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *Biochem.* **18**, 2594-5299.
- Choi DW. (1988). Glutamate neurotoxicity and diseases of the nervous system. *Neuron.* **1**, 623-634.
- Choi DW., Koh JY. (1998). Zinc and brain injury. *Annu Rev Neurosci.* **21**, 347-375.
- Chung I.Y., and Benvniste E.N. (1990). TNF α production by astrocytes: induction by lipopolysaccharide, interferon-gamma and interleukin-1. *J Immunol.* **144**, 2999-3007.
- Chung KC., Park JH., Kim CH., Ahn YS. (1999) Tumor necrosis factor-alpha and phorbol 12-myristate 13-acetate differentially modulate cytotoxic effect of nitric oxide generated by serum deprivation in neuronal PC12 cells. *J Neurochem* **72**, 1482-1488.
- Clark RK., Lee EV., Fish CJ., White RF., Price WJ., Jonak GL., Feuerstein GZ., Barone Fc. (1993). Development of tissue damage inflammation and resolution following stroke: An immunohistochemical and quantitative planimetric study. *Brain Res Bull.* **31**, 565-572.
- Collier MA., Yuen GJ., Bansal SK., Kolis S., Chew TG., Appelt K., Clendennin NJ. (1997). A phase I study of the matrix metalloproteinase inhibitor AG3340 given in single doses to healthy volunteers. *Proc Am Assoc Cancer Res.* **38**, 1749, 221.
- Colón AL., Menchén LA., Hurtado O., De Cristóbal J., lizasoain I., Leza JC., Lorenzao P., and Moro MA. (2001). Implication of TNF- α convertase (TACE/ADAM17) in inducible nitric oxide synthase expression and inflammation in an experimental model of colitis. *Cytokine.* **16**, 220-226.
- Combs CK., Karlo JC., Kao S-C., Landreth GE. (2001). β -amyloid stimulation of microglia and monocytes results in TNF α -dependent expression of inducible nitric oxide synthase and neuronal apoptosis. *J Neurosci.* **21**, 1179-1188.
- Cooper JR., Bloom FE., and Roth RH. (1991) The biochemical basis of Neuropharmacology. Ed: Oxford University Press New York Oxford.
- Dawson DA., Martin D., Hallenbeck JM. (1996) Inhibition of tumor necrosis factor-alpha reduces focal cerebral ischemic injury in the spontaneously hypertensive rat. *Neurosci Lett* **218**, 41-44.

- De Alba J., Moro M.A., Leza J.C., Lorenzo P., Boscá L., Lizasoain I. (1999). Down-regulation of neuronal NO synthase by NO after oxygen-glucose deprivation in rat forebrain slices. *J Neurochem.* **72**, 248-254.
- De B., Natchus MG., Cheng M., Pikul S., Almstead NG., Taiwo YO., Snider CE., Chen L., Barnett B., Gu F., Dowty M. (1999). The next generation of MMP inhibitors. Design and synthesis. *Ann N Y Acad Sci.* **30**, 40-60.
- De Bock F., Dornand J., Rondouin G. (1996). Release of TNF α in the rat hippocampus following epileptic seizures and excitotoxic neuronal damage. *NeuroReport.* **7**, 1125-1129.
- De Cristóbal J., Cárdenas A., Lizasoain I., Leza JC., Fernández-Tomé P., Lorenzo P., Moro MA. (2002) Inhibition of glutamate release via recovery of ATP levels accounts for a neuroprotective effect of aspirin in rat cortical neurones exposed to oxygen-glucose deprivation. *Stroke* **33**, 261-267
- Diem R, Meyer R, Weishaupt JH, Bähr M (2001) Reduction of potassium currents and phosphatidylinositol 3-kinase-dependent Akt phosphorylation by tumor necrosis factor- α rescues axotomized retinal ganglion cells from retrograde cell death in vivo. *J Neurosci* **21**, 2058-2066.
- Ding JF., Egger LA., Gaffney EP., Limjuco G., Palyha OC., Raju SM., Rolando AM., Salley JP., Yasmin Y., Lee TD., Shively JE., McCross MM., Mumford RA., Schmidt JA., Tocci MJ (1992). A novel heterodimeric cysteine protease is required for interleukin 1 β processing in monocytes. *Nature.* **356**, 768-774.
- Doedens J.R., Black R.A. (2000). Stimulation-induced down-regulation of tumor necrosis factor- α converting enzyme. *J Biol Chem.* **275**, 14598-14607.
- Donato NJ., Gallick GE., Steck PA., Rosenblum MG. (1989). Tumor necrosis factor modulates epidermal growth factor receptor phosphorylation and kinase activity in human tumor cells. Correlation with cytotoxicity. *J Biol Chem.* **264**, 20474-81.
- Downen M., Amaral TD., Hua LL., Zhao M-L., Lee SC. (1999) Neuronal death in cytokine-activated primary human brain cell culture: Role of tumor necrosis factor- α . *Glia* **28**, 114-127.
- Eccles SA., Box GM., Court WJ., Bone EA., Thomas W., and Brown PD. (1996). Control of lymphatic and hematogenous metastases of rat mammary carcinoma by the matrix metalloproteinase inhibitor batimastat (BB-94). *Cancer Res.* **56**, 2815-22.
- El-Agnaf OM., Jakes R., Curran MD., Middleton D., ingenitor R., Bianchi E., Pessi A., Neill D., Wallace A. (1998). Agregates from mutant and wild-type synuclein proteins and NAC peptides induce apoptotic cell death in human neuroblastoma cells by formation of sheet and amyloid-like filaments.. *FEBS Lett.* **440**, 71-75.

- Fairman WA., Vanderberg RJ., Arriza JL., Kavanaugh MP., and Amara SG. (1995). An excitatory amino-acid transporter with properties of ligand-gated chloride channel. *Nature*. **375**, 599-603.
- Felbor U., Beukwitz C., Klein M.L., Greenberg J., Gregory C.Y., and Weber B.H.F. (1997). Sorsby fundus dystrophy. Reevaluation of variable expressivity in patients carrying a TIMP-3 founder mutation. *Arch Ophthalmol*. **115**, 1569-1571.
- Feuerstein G., Liu T., and Barone F.C. (1994). Cytokines, inflammation, and brain injury: role of tumor necrosis factor α . *Cerebrovasc Brain Metab Rev*. **6**, 341-360.
- Feuerstein G.Z., Wang X., Barone F.C. (1998). The role of cytokines in the neuropathology of stroke and trauma. *Neuroimmunomodulation*. **5**, 143-159.
- Fiorucci S., Antonelli E., Migliorati G., Santucci L., Morelli O., Federici B., Morelli A. (1998). TNF- α processing enzyme inhibitors prevent aspirin-induced TNF- α release and protect against gastric mucosal injury in rats. *Aliment Pharmacol Ther*. **12**, 1139-1153.
- Frederickson CJ. (1989). Neurobiology of zinc and zinc-containing neurons. *Int Rev Neurobiol*. **31**, 145-238.
- Fujimura M., Gasche Y., Morita-Fujimura Y., Massengale J., Kawase M., Chan PH., (1999). Early appearance of activated matrix metalloproteinase-9 and blood-brain disruption in mice after focal cerebral ischemia and reperfusion. *Brain Research*. **842**, 92-100.
- Galea E., Feinstein D.L., Reis D.J. (1992). Induction of calcium-independent nitric oxide synthase activity in primary rat glial cultures. *Proc Nat Acad Sci USA*. **89**, 10945-10949.
- Ganter S., Northoff H., Mannel D. and Gebidke-Harter P. (1992). Growth control of cultured microglia. *Journal of Neuroscience Research*. **33**, 218-230.
- García JH., Kamijo Y. (1974). Evolution of histopathological changes after occlusion of a middle cerebral artery in primates. *J Neuropathol Exp Neurol*. **33**, 409-421.
- Garthwaite J., Woodhams P. L., Collins M. J., Balazs R. (1979). On the preparation of brain slices: morphology and cyclic nucleotides. *Brain Res*. **173**, 373-377.
- Gearing A.J., Beckett P., Christodoulou M., Churchill M., Clements J., Davidson AH., Drummond AH., Galloway WA., Gilbert R., Gordon JL. (1994). Processing of tumour necrosis factor-alpha precursor by metalloproteinases. *Nature*. **18**, 555-557.
- Ghosh S., May MJ., Kopp EB. (1998). NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu Rev Immunol*. **16**, 225-260.
- Gijbels K., Masure S., Carton H., and Opdenakker G. (1992). Gelatinase in the cerebrospinal fluid of patients with multiple sclerosis and other inflammatory neurological disorders. *J Neuroimmunol*. **44**, 29-34.
- Goddard D.R., Bunning R.A.D., and Woodroffe M.N. (2001). Astrocyte and endothelial cell expression of ADAM 17 (TACE) in adult human CNS. *Glia*. **34**, 267-271.

- Goldberg MP., and Choi DW. (1993) Combined oxygen and glucose deprivation in cortical cell culture: calcium-dependent and calcium-independent mechanisms of neuronal injury. *J Neurosci.* **13**, 3510-3524.
- Grau G.E., Piguet P.F., Vassalli P., Lambert P.H., (1989). Tumor necrosis factor and other cytokines in cerebral malaria: Experimental and clinical data. *Inmunol Rev.* **189**, 49-70.
- Hakim AM. (1987). The cerebral ischemic penumbra. *Can J Neurol Sci.* **14**, 557-559.
- Hakim AM., Shoubridge EA. (1989). Cerebral acidosis in focal ischemia. *Cerebrovasc Brain Metab Rev.* **1**, 115-32.
- Hankey GJ., Sudlow CL., and Dunbabin DW. (2000). Thienopyridines or aspirin to prevent stroke and other serious vascular events in patients at high risk of vascular disease? A systematic review of the evidence from randomized trials. *Stroke.* **31**, 1779-84
- Hanna AN, Chan EY, Xu J, Stone JC, Brindley DN (1999) A novel pathway for tumor necrosis factor-alpha and ceramide signaling involving sequential activation of tyrosine kinase, p21(ras), and phosphatidylinositol 3-kinase. *J Biol Chem.* **274**, 12722-9.
- Heneka MT., Feinstein DL., Galea E., Gleichmann M., Wullner U., Klockgether T. (1999) Peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonists protect cerebellar granule cells from cytokine-induced apoptotic cell death by inhibition of inducible nitric oxide synthase. *J Neuroimmunol.* **100**, 156-168.
- Hill H.D., and Straka J.G. (1998). Protein determination using bicinchoninic acid in the presence of sulfhydryl reagents. *Anal Biochem.* **170**, 203-208.
- Hofman F.M., Hinton D.R., Johnson K., Merrill J.E. (1989). Tumor necrosis factor identified in multiple sclerosis brain. *J Exp Med.* **170**, 607-612.
- Hooper N.M., Karran E.H., Turner A.J. (1997). Membrane protein secretases. *Biochem J.* **321**, 265-279.
- Hooper N.M., Trew AJ, Parkin E.T, Turner A.J. (2000). The role of proteolysis in Alzheimer's disease. *Adv Exp Med Biol.* **477**, 379-390.
- Hortelano S., Alvarez AM., Boscá L. (1999). Nitric oxide induces tyrosine nitration and release of cytochrome c preceding an increase of mitochondrial transmembrane potential in macrophages. *FASEB J.* **13**, 2311-7.
- Hossmann KA. (1994). Viability thresholds and the penumbra of focal ischemia. *Ann Neurol.* **36**, 57-565.
- Hossmann KA., Kleihues P. (1973). Reversibility of ischemic brain damage. *Arch Neurol.* **29**, 375-384.
- Houzen H, Kikuchi S, Kanno M, Shinpo K, Tashiro K (1997) Tumor necrosis factor enhancement of transient outward potassium currents in cultured rat cortical neurons. *J Neurosci Res.* **50**, 990-999.

- Hsu CY., An G., Liu JS., Xue JJ., He XY., Lin TW. (1993) Expression of immediate early gene and growth factor mRNA in a focal cerebral ischaemia model in the rat. *Stroke*. **24**, I78-I81.
- Hsu H, Huang J, Shu HB, Baichwal V, Goeddel DV (1996) TNF-dependent recruitment of the protein kinase RIP to the TNF receptor-1 signaling complex. *Immunity*. **4**, 387-396.
- Hsu H, Xiong J, Goeddel DV (1995) The TNF receptor 1-associated protein TRADD signals cell death and NF-kappa B activation. *Cell*. **81**, 495-504.
- Hurwitz A., Lyman W., Guida M., Calderon T., and Berman J., (1992). Tumor necrosis factor alpha induces adhesion molecule expression on human fetal astrocytes. *Journal of Experimental Medicine*. **176**, 1631-1636.
- Iadecola C. (1997). Bright and dark sides of nitric oxide in ischemic brain injury. *Trends Neurosci*. **20**, 132-139.
- Iadecola C. (1999). Cerebral ischemia. Molecular and Cellular Pathophysiology. Humana Press.
- Jacewicz M, Kiessling M, Pulsinelli WA. (1986). Selective gene expression in focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab*. **6**, 263-72.
- Jones E.Y., Stuart D.I., and Walker N.P.C. (1989). Structure of tumour necrosis factor. *Nature*. **338**, 225-228.
- Kagansky N., Levy S., Knobler H. (2001). The role of hyperglycemia in acute stroke. *Arch Neurol*. **58**, 1209-1212.
- Kanai Y., and Hedige MA. (1992). Primary structure and functional characterization of a high affinity glutamate transporter. *Nature*. **360**, 467-471.
- Karin M. (1999) The beginning of the end: I κ B kinase (IKK) and NF- κ B activation. *J Biol Chem*. **274**, 27339-27342.
- Karin M and Delhase M. (1998). JNK or IKK, AP-1 or NF-kappa B, which are the targets for MEK kinase 1 activation?. *Proc Natl Acad Sci USA*. **95**, 9067-9.
- Kärkkäinen I., Rybnikova E., Peltö-Huikko M., and Hopvila AP. (2000). Metalloprotease-disintegrin (ADAM) genes are widely and differentially expressed in adult SNC. *Mol Cell Neurosci*. **15**, 547-560.
- Kerr J.F.R and Harmon B.V. (1991). Definition and incidence of apoptosis: an historical perspective in apoptosis: the molecular basis of cell death. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*. New York. 5-29
- Killar L., White J., Black R., Peschon J. (1999). Adamalysins. A family of metzincins including TNF- α converting enzyme (TACE). *Ann. N.Y. Acad. Sci*. **878**, 442-452.

- Kim BC, Lee MN, Kim JY, Lee SS, Chang JD, Kim SS, Lee SY, Kim JH (1999) Roles of phosphatidylinositol 3-kinase and Rac in the nuclear signaling by tumor necrosis factor- α in rat-2 fibroblasts. *J Biol Chem.* **274**, 24372-24377
- Kim YH., Kim EY., Gwag BJ., Sohn S., Koh JY. (1999). Zinc-induced cortical neuronal death with features of apoptosis and necrosis: mediation by free radicals. *Neuroscience.* **89**,175-82.
- Klein R.M, Choudhuri R., Meara J:B, and S., Galtone V.H.(1993). Cytokine gene expression following two models of brain injury. *Soc Neurosci Ast.* **19**,1721.
- Knoblauch SM., Fan L., and Faden A.L. (1999). Early neuronal expression of tumor necrosis factor alpha after experimental brain injury contributes to neurological impairment. *J. Neuroimmunol.*, **95**, 115-125.
- Kochanek PM., and Hallenbeck JM (1992). Polymorphonuclear leukocytes and monocytes/macrophages in the pathogenesis of cerebral ischaemia and stroke. *Stroke.* **23**, 1367-1379.
- Koh J. Y. and Choi D. W. (1987). Quantitative determination of glutamate mediated cortical neuronal injury in cell culture by lactate dehydrogenase efflux assay. *J Neurosci. Meth.* **20**, 83-90.
- Kontos HA. (1985). George E. Brown memorial lecture. Oxygen radicals in cerebral vascular injury. *Circ Res.* **57**, 508-16.
- Lammich S., Kojro E., Postina R., Gilbert S., Pfeiffer R., Jasionowski M., Haass C., Fahrenholz F. (1999). Constitutive and regulated α -secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by a disintegrin metalloprotease. *Proc Natl Acad Sci USA.* **96**, 3922-3927.
- Lascola C., Kraig RP. (1997). Astroglial acid-base dynamics in hyperglycemic and normoglycemic global ischemia. *Neurosci Biobehav Rev.* **21**, 143-50.
- Lee FS., Hagler J., Chen ZJ., Maniatis T. (1997) Activation of the IkappaB alpha kinase complex by MEKK1, a kinase of the JNK pathway. *Cel.* **88**, 213-22
- Lee JM., Grabb MC., Zipfel GJ., Choi DW. (2000). Brain tissue responses to ischemia. *J Clin Invest.* **106**, 723-731.
- Leib S., Clemnts J., Lindberg R., Loeffler J., Pfister L., Tauber M., Leppert D. (2001). Inhibition of matrix metalloproteinases and tumour necrosis factor α converting enzyme as adjuvant therapy in pneumococcal meningitis. *Brain.* **124**, 1734-1742.
- Leist T.P, Frei K, Kam-Hansen S, Zinkernagel R.M, Fontana A. (1988). Tumor necrosis factor alpha in cerebrospinal fluid during bacterial, but not viral, meningitis: evaluation in murine model infections and in patients. *J Exp Med.* **167**, 1743-1748.
- Liberman A., Pitha P., Shin H., and Shin M. (1989). Production of tumor necrosis factor and other cytokines by astrocytes stimulated with lipopolysaccharide or a neurotropic virus. *Proc Natl Acad Sci USA.* **86**, 6348-6352.
- Lipton (1999). Ischaemic cell death in brain neurons. *Physiological reviews.* **79**,1431-1568.

- Liu J.P. (1999). Studies of the molecular mechanisms in the regulation of the telomerase activity.. *FASEB J.* **13**, 2091-2104.
- Liu T., Clarck R.K., McDonnell P.C., Young P.R., White R.F., Barone F.C and Feuerstein G.Z. (1994). Tumor necrosis factor- α expression in ischemic neurons. *Stroke.* **25**, 1481-1488.
- Liu Z.G., Hsu H., Goeddel D.U., Karin M., (1996). Dissection of TNF receptor 1 effector functions: JNK activation is not linked to apoptosis while NF- λ B activation prevents cell death. *Cell.* **87**, 565-76.
- Lizasoain I., Knowles R. G. and Moncada S. (1995). Inhibition by lamotrigine of the generation of nitric oxide in rat forebrain slices. *J Neurochem.* **64**, 636-642.
- Lobner D., Canzoniero LM., Manzerra P., Gottron F., Ying H., Knudson M., Tian M., Dugan LL., Kerchner GA., Sheline CT., Korsmeyer SJ., Choi DW. (2000). Zinc-induced neuronal death in cortical neurons. *Cell Mol Biol.* **46**, 797-806.
- Loechel f., Overgaard M. T., Oxvig C., Albrechtsen R., and Wewer U.M (1999). Regulation of human ADAM 12 protease by the prodomain. Evidence for a funtional cysteine switch. *J Biol Chem.* **274**, 13424-13433.
- Malinin NL., Boldin MP., Kovalenko AV., Wallach D. (1997). MAP3K-related kinase involved in NF-kappaB induction by TNF, CD95 and IL-1. *Nature* **385**, 540-544.
- Mattson MP. (1997). Neuroprotective signal transduction: revelance to stroke. *Neuroscience and biobehavioral-reviews.* **21**, 193-206.
- Mattson MP., Cheng B., Baldwin S., Smith-Swintosky VL., Keller J., Geddes JW., Scheff SW., Christakos S. (1995). Brain injury and tumor necrosis factors induce expression of calbindin D-28k in astrocytes: a cytoprotective response. *J Neurosci Res.* **42**, 357-370.
- Mattson MP., Culmsee C., Yu ZF., and Camandola S. (2000). Roles of nuclear Factor κ B in neuronal survival and plasticity. *J Neurchem.* **74**, 443-456.
- McGeehan G.M., Becherer J.D., Bast Jr. R.C., Boyer C.M., Champion B., Connolly K.M., Conway J.G., Furdon P., Karp S., Kidao S., McElroy A.B., Nichols J., Pryzwanski K.M., Schoenen F., Sekut L., Truesdale A., Verghese M., Warner J., Ways J.P. (1994). Regulation of tumour necrosis factor- α processing by a metalloproteinase inhibitor. *Nature.* **370**, 558-561.
- Meistrell ME, Botchkina GI, Wang H, Di Santo E, Cockroft KM, Bloom O, Vishnubhakat JM, Ghezzi P, Tracey KJ. (1997). Tumor necrosis factor is a brain damaging cytokine in cerebral ischemia. *Shock.* **8**, 341-348.
- Merlos-Suárez A., and Arribas J. (1999). Mechanisms controlling the shedding of transmembrane molecules. *Biochem Soc Trans.* **27**, 243-6.

- Merlos-Suárez A., Fernández-Larrea J., Reddy P., Baselga J., Arribas J. (1998). Pro-tumour necrosis factor- α processing activity is tightly controlled by a component that does not affect notch processing. *J Biol Chem.* **273**, 24955-24962.
- Middelhoven PJ., Ager A., Ross D., Verhoeven AJ. (1997). Involvement of a metalloprotease in the shedding of human neutrophil Fc gamma RIIIB. *FEBS Letters.* **414**, 14-18.
- Milla M., Leesnitzer A., Moss M., Clay W., Carter H., Miller A., Su J., Lambert M., Willard D., Sheeley D., Kost T., Burkhart W., Moyer M., Blackburn R., Pahel G., Mitchell J., Hoffman C., and Becherer D. (1999). Specific sequence elements are required for the expression of functional tumor necrosis factor- α -converting enzyme (TACE). Specific sequence elements are required for the expression of functional tumor necrosis factor- α -converting enzyme (TACE). *Journal of Biological Chemistry.* **274**, 30563-30570.
- Millar AW., Brown PD., Moore J., Galloway WA., Cornish AG., Lenehan TJ., and Lynch KP. (1998). Results of single and repeat dose studies of the oral matrix metalloproteinase inhibitors marimastat in healthy male volunteers. *Br J Clin Pharm.* **54**, 21-6
- Miller RJ. (1991). The control of neuronal calcium homeostasis. *Prog Neurobiol.* **37**, 255-285.
- Minc-Golomb D., Tsarfaty I., Schwartz J.P. (1994). Expression of inducible nitric oxide synthase by neurons following exposure to endotoxin and cytokine. *Br J Pharmacol.* **112**, 720-722.
- Minc-Golomb D., Yadid G., Tsarfaty I., Resau J.H., Schwartz J.P. (1996). In vivo expression of inducible nitric oxide synthase in cerebellar neurons. *J Neurochem.* **66**, 1504-1509.
- Mitsiade N., Poulaki V., Leone A., and Tsokos M. (1999). Fas-mediated apoptosis in Ewing's sarcoma cell lines by metalloproteinase inhibitors. *J Natl Cancer Int.* **91**, 1678-1684.
- Mizui Y., Yamazaki K., Segane K., and Tanake I. (1999). cDNA cloning of mouse tumor necrosis factor-alpha converting enzyme (TACE) and partial analysis of its promoter. *Gene.* **233**, 67-74.
- Mogi M., Harada M., Riederer P., Narabayashi H., Fujita K., Nagatsu T. (1994). Tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) increases both in the brain and in the cerebrospinal fluid from parkinsonian patients. *Neuroscience-letters.* **165**, 208-10.
- Montana JG., Buckeley GM., Cooper N., Dyke HJ., Gowers N., Gregory JP., Hellewell PG., Kendadll HJ., Lowe C., Maxey R., Miotla J., Naylor RJ., Runcie KA., Tuladhar B., and Warneck JB. (1998). Aryl sulfonamides as selective PDE4 inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett.* **19**, 2634-40.
- Moro M.A., De Alba J., Leza J.C., Lorenzo P., Fernández A.P., Bentura M.L., Boscá L., Rodrigo J., Lizasoain I. (1998) Neuronal expression of inducible nitric oxide synthase after oxygen and glucose deprivation in rat forebrain slices. *Eur J Neurosci.* **10**, 445-456.

- Moss M.L., Jin S.-L.C., Milla M.E., Burkhart W., Carter H.L., Chen W.J., Clay W.C., Didsbury J.R., Hassler D., Hoffman C.R., Kost T.A., Lambert M.H., Leesnitzer M.A., McCauley P., McGeehan G., Mitchell J., Moyer M., Pahel G., Rocque W., Overton L.K., Schoenen F., Seaton T., Su J.-L., Warner J., Willard D., Becherer J.D. (1997). Cloning of a disintegrin metalloproteinase that processes precursor tumour-necrosis factor- α . *Nature*. **385**, 733-736.
- Müllberg J., Rauch C.T., Wolfson M.F., Castner B., Fitzner J.N., Otten-Evans C., Mohler K.M., Cosman D., and Black R.A. (1997). Further evidence for a common mechanism for shedding of cell surface proteins. *FEBS Lett.* **401**, 235-8.
- Nawashiro H., Martin D., Hallenbeck J.M. (1997) Inhibition of tumor necrosis factor and amelioration of brain infarction in mice. *J Cereb Blood Flow Metab.* **17**, 229-232.
- Nedergaard M., Astrup J. (1986). Infarct effects of hyperglycaemia on direct current potential and ^{14}C -2-deoxyglucose phosphorylation. *J Cereb Blood Flow Metab.* **6**, 607-615.
- Noda M, Nakanishi H, Nabekura J, Akaike N (2000) AMPA-kainate subtypes of glutamate receptor in rat cerebral microglia. *J Neurosci.* **20**, 251-258.
- Norton W.T., Aquino D.A., Hozumi I., Chiu T.C., Brosnan C.F. (1992) Quantitative aspects of reactive gliosis: A review. *Neurochem Res.* **17**, 877-885.
- Nowak T.S., Ikeda S., Nakajima T. (1990) 70 Kda HSP and c-fos gene expression after transient ischaemia. *Stroke.* **21**, 107-111.
- Ogura T., Tatemichi M., Esumi H. (1997) TNF- α mediates inducible nitric oxide synthase expression in human neuroblastoma cell line by cisplatin. *Biomed Biophys Res Commun.* **233**, 788-791.
- Okada Y., Copeland B.R., Mori E., Tung M.M., Thomas W.S., Del Zoppa G.Z. (1994) P-selectin and IAM-1 expression after focal brain ischaemia and reperfusion. *Stroke.* **25**, 202-211.
- Old L.J. (1985). Tumor necrosis factor (TNF). *Science.* **230**, 630-2.
- Olney J.W., Sharpe L.G. (1969). Brain lesions in an infant rhesus monkey treated with monosodium glutamate. *Science.* **166**, 386-388.
- Orrenius S., McConkey D.J., Bellomo G., and Nicotera P. (1989). Role of Ca^{+2} in toxic cell killing. *Trends Pharmacol Sci.* **10**, 281-5.
- Ozes O.N., Mayo L.D., Gustin J.A., Pfeffer S.R., Pfeffer L.M., Donner D.B. (1999). NF- κ B activation by tumor necrosis factor requires the Akt serine-threonine kinase. *Nature.* **401**, 82-5.
- Palmiter R.D., Cole T.B., Quaife C.J., Findley S.D. (1996). ZnT-3, a putative transporter of zinc into synaptic vesicles. *Proc Natl Acad Sci USA.* **93**, 14934-14939.

- Parvathy S., Karran E.H., Turner A.J., Hooper N.M. (1998). The secretases that cleave angiotensin converting enzyme and the amyloid precursor protein are distinct from tumour necrosis factor- α convertase. *FEBS Lett.* **431**, 63-65.
- Pavloff N., Staskus P., Kishnani N., and Hawkes S. (1992). A new inhibitor of metalloproteinases from chicken: ChTIMP-3. A third member of the TIMP family. *J Biol. Chem.* **267**, 17321-17326.
- Peschon JJ., Slack JL., Reddy P., Stocking KL., Sunnarborg SW., Lee DC., Russell WE., Castner BJ., Johnson RS., Fitzner JN., Boyce RW., Nelson N., Kozlosky CI., Wofson MF., Rauch CT., Cerreti DP., Paxton RJ., March CJ., and Black RA. (1998). An essential role for ectodomain shedding in mammalian development. *Science.* **282**, 1281-1284.
- Peterson P.K., Hu S., Anderson W.R., Chao C.C. (1994). Nitric oxide production and neurotoxicity mediated by activated microglia from human versus mouse brain. *J Infect Dis.* **170**, 457-460.
- Phyllis JW, O'Regan MH, Estevaz AY, Song D and VanderHeide SJ. (1996). Cerebral energy metabolism during severe ischaemia of varying duration and following reperfusion. *J Neurochem.* **67**, 1525-1531.
- Pines G., Danbolt NC., Bjoras M., Zhang Y., Bendahan A., Eide L., Koepsell H., Storm-Mathisen J., Seeberg E., and Kanner B.I. (1992). Cloning and expression of a rat brain l-glutamate transporter. *Nature.* **360**, 464-467.
- Pober JS., Cotran RS. Cytokines and endothelial cell biology. (1990) *Physiol. Rev.* **70**, 427-451.
- Probert L., Akassoglou K., Pasparakis M., Kontogeorgos G., Kollias G. (1995). Spontaneous inflammatory demyelinating disease in transgenic mice showing central nervous system-specific expression of tumor necrosis factor- α . *Proc Natl Acad Sci. USA* **92**, 11294-11298.
- Reddy P., Slack J.L., Davis R., Cerreti DP., Kozlosky CJ., Blanton RA., Shows D., Peschon JJ., Black RA. (2000). Functional analysis of the domain structure of tumor necrosis factor- α converting enzyme. *J Biol Chem.* **275**, 14608-14614.
- Rees DD., Cunha FQ., Assreoy J., Herman AG y Moncada S. (1995) Sequential induction of nitric oxide synthase by *C. parvum* in different organs of the mouse. *Br J Pharmacol.* **114**, 689-693.
- Regnier CH., Song HY., Gao X., Goeddel DV., Cao Z., Rothe M. (1997) Identification and characterization of an IkappaB kinase. *Cell* **90**, 373-83
- Roghani M., Becherer J.D., Moss M.L., Atherton R.E., Erdjument-Bromage H., Arribas J., Blackburn R.K, Weskamp G., Tempst P., and Blobel C.P. (1999). Metalloprotease-disintegrin MDC9: intracellular maturation and catalytic activity. *J Biol Chem.* **274**, 3531-3540.
- Romashkova JA, Makarov SS (1999) NF-kappaB is a target of AKT in anti-apoptotic PDGF signalling. *Nature* **401**, 86-90

- Rosenberg GA., Estrada EY., Dencoff JE. (1998). Matrix metalloproteinases and TIMPs are associated with blood-brain barrier opening after reperfusion in rat brain. *Stroke*. **29**, 2189-95.
- Rosenberg GA., Navratil M., Barone F., Feuerstein G. (1996). Proteolytic cascade enzymes increase in focal cerebral ischemia in rat. *J Cereb Blood Flow Metab*. **16**, 360-366.
- Rosendahl M.S., Ko S.C., Long D.L., Brewer M.T., Rosenzweig B., Hedl E., Anderson L., Pyle S.M., Moreland J., Meyers M.A., Kohno T., Lyons D., Lichenstein H.S. (1997). Identification and characterization of a pro-tumor necrosis factor- α -processing enzyme from the ADAM family of zinc metalloproteases. *J Biol Chem*. **272**, 24588-24593.
- Salter M., Knowles RG., and Moncada S. (1991) Widespread tissue distribution, species distribution and changes in activity of Ca²⁺-dependent and Ca²⁺-independent nitric oxide synthases. *FEBS Lett*. **291**, 145-149.
- Sawa A., Wiegand GW., Cooper J., Margolis RL., Sharp AH., Lawler JF Jr., Greenamyre JT., Snyder SH., Ross CA. (1999). Increased apoptosis of Huntington disease lymphoblasts associated with repeat length-dependent mitochondrial depolarization. *Nature Med*, **5**, 1194-1198.
- Schlomann U., Rathke-Hartlieb S., Yamamoto S., Jockusch H and Bartsch J.W. (2000). Tumor necrosis α induces a metalloprotease-disintegrin, ADAM8 (CD156): implications for neuron-glia interactions during neurodegeneration. *J Neurosci*. **20**, 7964-7971.
- Schlöndorff J., and Blobel C.P. (1999). Modular proteins of promoting cell-cell interactions and triggering signals by protein-ectodomain shedding. *J Cell Sci*. **112**, 3603-3617.
- Schlöndorff, J. , Becherer, J. D. , Blobel, C.P. (2000). Intracellular maturation and localization of the tumor necrosis factor α convertase (TACE). *Biochemistry Journal*. **347**, 131-138.
- Schmith ML., Marcos A. dos Santos Silva., Herbert Altmann., Michael Czisch., Tad A. Holak., and Patrick A. Bacule. (1994). Structural and functional analysis of the NF- λ B p65 C terminus. *J Biol Chem*. **269**, 25613-25620.
- Selmanj K., Farooq M., Norton W., Raine C. and Brosnan C. (1990). Proliferation of astrocytes in vitro in response to cytokines. *Journal of Immunology*. **144**, 129-139.
- Sewter CP., Digby JE., Blows F., Prins JB., and O'Rahilly. (1999). Regulation of tumor necrosis factor-alpha release from human adipose tissue in vitro. *J Endocrinol*. **163**, 33-38.
- Shah A., Sundaresan P., Humphrey R., Heller AH. (1998). Comparative pharmacokinetics (PK) of BAY 12-9566, a metalloproteinase (MMP) inhibitor for the treatment of rheumatoid arthritis. *Proc Am Assoc Cancer Res*. **39**, 521.
- Sharp FR., Massa SM., Swanson RA. (1999). Heat-shock protein protection. *Trends Neurosci*. **22**, 97-99.

- Shinpo K., Kikuchi S., Moriwaka F., Tashro K. (1999) Protective effects of the TNF-ceramide pathway against glutamate neurotoxicity on cultured mesencephalic neurons. *Brain Res* **819**, 170-173.
- Simmons M.L., Murphy S. (1993). Cytokines regulate L-arginine-dependent cyclic GMP production in rat glial cells. *Eur J Neurosci.* **5**, 825-831.
- Simmons M.L., Murphy S. (1992). Induction of nitric oxide synthase in glial cells. *J Neurochem.* **59**, 897-905.
- Sipe KJ, Srisawasdi D, Dantzer R, Kelley KW, Weyhenmeyer JA (1996) An endogenous 55 kDa TNF receptor mediates cell death in a neural cell line. *Brain Res Mol Brain Res* **38**, 222-232.
- Sippy B.D., Hofman F.M., Wallach D., and Hinton D.R. (1995). Increased expression of tumor necrosis factor-alpha receptors in the brain of patients with AIDs. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol.* **10**, 511-521.
- Skovronsky DM., Fath S., Lee VM., Milla ME. (2001). Neuronal localization of the TNFalpha converting enzyme (TACE) in brain tissue and its correlation to amyloid plaques. *J Neurobiol.* **49**, 40-6.
- Smith C.A., Farrah T., Goodwin R.G. (1994). The TNF receptor superfamily of cellular and viral proteins: activation, costimulation and death. *Cell.* **76**,959-62
- Sortino MA, Condorelli F, Vancheri C, Canonico PL (1999) Tumor necrosis factor-alpha induces apoptosis in immortalized hypothalamic neurons: involvement of ceramide-generating pathways. *Endocrinology* **140**, 4841-4849.
- Storck T., Schulte S., Hoffman K., and Stoffel W. (1992). Structure, spression and funtional analysis of Na-dependt glutamate/aspartate transporter from rat brain. *Proc Natl Acad Sci USA.* **89**, 10955-10959.
- Talley A., Dewhurt S., Perry S., Pollard S., Gummulun S., Fine S., Nem D., Epstein L., Gendelman H., and Geldbard H. (1995). Tumor necrosis alpha induced apoptosis in human neuronal cells: protection by the antioxidant N-acetylcysteine and the genes bcl-2 and crmA. *Mol Cel. Biol.* **15**, 2359-2366.
- Tamatani M., Che YH., Matsuzaki H., Ogawa S., Okado H., Miyake S., Mizuno T., Tohyama M. (1999) Tumor necrosis factor induces Bcl-2 and Bcl-x expression through NFkappaB activation in primary hippocampal neurons. *J Biol Chem.* **274**, 8531-8538.
- Tamura A., Graham DI., McCulloch J., Teasdale GM. (1981). Focal cerebral ischaemia in the rat: 2. Regional cerebral blood flow determined by [14C]iodoantipyrine autoradiography following middle cerebral artery occlusion. *J Cereb Blood Flow Metab.* **1**, 61-9.
- Tarkowski E., Blennow K., Wallin A., Tarkowski A. (1999) Intracerebral production of tumor necrosis factor-alpha, a local neuroprotective agent, in Alzheimer disease and vascular dementia. *J Clin Immunol.* **19**, 223-230.

- Tartaglia L.A., Rothe M., Hu Y.F., Goeddel D.V. (1993). Tumor necrosis factor's cytotoxic activity is signaled by the p55 TNF receptor. *Cell*. **73**,213-6
- Tchelingerian J., Quinonero J., Booss J., Jacque C. (1993). Localisation of TNF α and IL-1 α immunoreactives in striatal neurons after surgical injury to the hippocampus. *Neuron*.**10**, 213-224.
- Tchelingerian J., Vignais L., and Jacques C. (1994). TNF alpha gene expression is induced in neurons after hippocampal lesion. *Neuroreport*. **5**, 585-588.
- Tenneti L., Danielle MD., Troy CM., Lipton S. (1998) Role of caspases in NMDA induced apoptosis in cerebral neurons. *J Neurochem*. **71**, 946-959.
- Terada L., Willingham I., Guidot D., Shibao G., and Kindt G. (1992).Tugsten treatment prevents tumor necrosis factor-induced injury of brain endothelial cell. *Inflammation*. **16**, 13-19.
- Tezel G, Wax MB (2000) Increased production of tumor necrosis factor- α by glial cells exposed to simulated ischemia or elevated hydrostatic pressure induces apoptosis in cocultured retinal ganglion cells. *J Neurosci*. **20**, 8693-8700.
- Thornberry NA., Bull HG., Calycay JR., Champan KT., Howard AD., Kostura MJ., Miller DK., Molineaux SM., Weidner JR., Aunins J., Elliston KO., Ayla JM., Casano FJ., Chin J., Tomimoto H., Akiguchi I., Wakita H., Kinoshita A., Ikemoto A., Nakamura S., Kimura J. (1996). Glial expression of cytokines in the brains of cerebrovascular disease patients. *Acta-neuropathologica*. **92**, 281-7.
- Tonder N., Johansen FF., Frederickson CJ., Zimmer J. and Diemer NH. (1990). Possible role of zinc in the selective degeneration of dentate hilar neurons after cerebral ischemia in the adult rat. *Neurosci lett*. **109**, 247-52.
- Tracey KJ., Fong J., Hesse DG., Manogue KR., Lee AT., Kuo GC., Lowry SF., Cerami A. (1987). Anti-cachectin/TNF monoclonal antibodies prevent septic shock during lethal bacteraemia. *Nature*. **330**, 662-4.
- Tyor W.R., Glass J.D., Griffin J.W., Becker P.S., McArthur J.C., Bezman L., and Griffin D.E. (1992). Cytokine expression in the brain during the acquired immunodeficiency syndrome. *Ann Neurol*. **31**, 349-360.
- Uemura Y., Konowall NW., Moskowitz MA (1991). Focal ischaemia in rats causes time dependent expression of c-fos protein immunoreactivity in wide-spread regions of ipsilateral cortex. *Brain Res*. **522**, 99-105.
- Velasco A., Caminos E., Vecino E., Lara JM., Aijón J. (1995) Microglia in normal and regenerating visual pathways of the tench (*Tinca tinca* L., 1758; Teleost): a study with tomato lectin. *Brain Res*. **705**, 315-324.
- Van Wart H.E and Birkedal-Hansen H. (1990). The cysteine switch: a principle of regulation of metalloproteinase activity with potencial applicability to the entire matrix metalloproteinase gene family. *Proc Natl Acad Sci USA*. **87**, 5578-5582.

- Vandenabeele P., Declereq W., Beyaert R. and Fiers W. (1995). Two tumor necrosis factor receptor: Structure and function. *Trends cell Biol.* **5**, 392-399.
- Verma IM, Stevenson J (1997) Ikappa B kinase: beginning, not the end. *Proc Natl Acad Sci USA.* **94**, 11758-11760.
- Vitkovic L., Bockaert J., Jacque C. (2000). "Inflammatory" cytokines: neuromodulators in normal brain?. *J Neurochem.* **74**, 457-471.
- Viviani B., Corsini E., Galli CL., Marinovich M. (1998) Glia increase degeneration of hippocampal neurons through release of tumor necrosis factor-alpha. *Toxicol Appl Pharmacol* **150**, 271-276.
- Wang XK., Li X., Erhardt JA., Barone FC., Feuerstein GZ. (2000). Detection of tumor necrosis factor-alpha mRNA induction in ischemic brain tolerance by mean real-time polymerase chain reaction. *J Cereb Blood Flow Metab.* **20**, 15-20.
- Wang XK, Siren AL., Yue TL., Barone FC., Feuerstein GZ. (1994). Upregulation of intracellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) on brain microvascular endothelial cells in rat ischemic cortex. *Mol Brain Res.* **26**, 61-68.
- Wang XK., Yue TL., Barone FC., Feuerstein GZ. (1995a). Demonstration of increased ELAM-1 mRNA expression in rat ischemic cortex. *Stroke.* **26**, 1665-1669.
- Wang XK., Yue TL., Young PR., White RF., Barone FC., Feuerstein GZ. (1995b) Transforming growth factor- β_1 exhibits delayed gene expression following focal ischaemia. *Brain Res Bull.* **36**, 607-609.
- Watanabe N., Nakada K., Kobayashi Y. (1998). Processing and release of tumor necrosis factor α . *Eur J Biochem.* **253**, 576-582.
- Weiss JH., Sensi SL., Koh JY. (2000). Zn^{2+} : a novel ionic mediator of neural injury in brain disease. *Trends Pharmacol Sci.* **21**, 395-401.
- Welsh FA., Moyer DJ., Hams VA. Regional expression of heat shock protein 70 mRNA and c-fos following focal ischaemia in rat brain. (1992) *J Cereb Blood Flow Metab.* **12**, 204-212.
- Wolfsberg TG. and White JM., (1998). ADAM metalloproteinases. *Academic Press.* 1310-1313.
- Wood ND., Aitken M., Durston S., Harris S., McClelland GR., Sharp S. (1998). Cartilago protective agent (CPA) Ro 32-3555, a new matrix metalloproteinase inhibitor for the treatment of rheumatoid arthritis. *Agents and Actions*, **49**, 49-55.
- Wright J.L., and Merchant R.E. (1992). Histopathological events of intracerebral injection of human tumor necrosis factor alpha in the rats. *Acta neuropathologica.* **85**, 93-100.
- Zask A., Levin JI., Killar LM., and Skotnicki JS. (1996). Inhibition of matrix metalloproteinases: structure based design. *Curr Pharm Des.* **2**, 624-661.

Zhang Z., Kolls J., Oliver P., Good D., Schwarzenberger P., Joshi M., Ponthier J., and Lancaster, Jr. (2000). Activation of Tumor Necrosis Factor- α -converting Enzyme-mediated Ectodomain Shedding by Nitric Oxide. *J Biol Chem.* **275**, 15839-15844.