

Tesis Doctoral

Papel del receptor RAGE en la determinación de la sobrevida neuronal en un modelo experimental de apnea del sueño por hipoxia intermitente

Angelo, María Florencia

2013

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Angelo, María Florencia. (2013). Papel del receptor RAGE en la determinación de la sobrevida neuronal en un modelo experimental de apnea del sueño por hipoxia intermitente. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Angelo, María Florencia. "Papel del receptor RAGE en la determinación de la sobrevida neuronal en un modelo experimental de apnea del sueño por hipoxia intermitente". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2013.

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Papel del receptor RAGE en la determinación de la sobrevivencia neuronal en un modelo experimental de apnea del sueño por hipoxia intermitente.

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área:
CIENCIAS BIOLÓGICAS

Lic. María Florencia Angelo

Director de tesis: Dr. Alberto Javier Ramos

Consejero de Estudios: Dra. Graciela Lidia Boccaccio

Lugar de trabajo: Instituto de Biología Celular y Neurociencias *Prof. Eduardo De Robertis*. Facultad de Medicina, UBA - CONICET

Buenos Aires, mayo de 2013

Papel del receptor RAGE en la determinación de la sobrevivencia neuronal en un modelo experimental de apnea del sueño por hipoxia intermitente.

Resumen

La Apnea del Sueño (AS) es un grave problema para la Salud Pública que afecta a una notable proporción de la población. En animales de laboratorio la AS se modela a través de la exposición a hipoxia intermitente (HI) que induce alteraciones neuronales, gliosis reactiva, expresión del receptor RAGE y de su ligando S100B en el SNC.

En esta tesis, desarrollamos un modelo de exposición a HI en cultivos primarios de hipocampo de roedores y ello nos ha permitido *diseñar* algunas de las rutas de señalización que serían responsables de la neurodegeneración y la gliosis reactiva que se observa en modelos experimentales de AS. Así, demostramos que la exposición a HI induce stress oxidativo, activación de HIF-1 y NF- κ B, un fenotipo reactivo en la astrogliosis y el acortamiento de las neuritas. Estas alteraciones, que correlacionan con los cambios observados en los animales expuestos al modelo de AS por HI, fueron prevenidos por la aplicación en el medio de cultivo de anticuerpos neutralizantes de RAGE así como por la sobreexpresión de un dominante negativo de RAGE entregado por un vector viral o el bloqueo farmacológico de NF- κ B y Akt. La manipulación experimental de los niveles de S100B no fue tan efectiva para reducir estas alteraciones.

Basándonos en estos resultados utilizamos el mismo enfoque para intentar disminuir las alteraciones neuro-gliales en el modelo experimental de AS por HI en roedores. Así, el bloqueo de RAGE con anticuerpos neutralizantes administrados intrahipocampalmente o la expresión del dominante negativo de RAGE entregado por un vector viral, tanto como el bloqueo farmacológico de NF- κ B fueron efectivos para disminuir la gliosis reactiva y la neurodegeneración.

Estos resultados indican que RAGE y NF- κ B estarían involucrados en las alteraciones neuronales y la gliosis reactiva inducidas por la AS. Estas rutas de señalización serían así interesantes blancos moleculares para el desarrollo de estrategias de neuroprotección útiles en la AS.

Palabras claves: Hipoxia Intermitente, gliosis reactiva, neurodegeneración, S100B, RAGE, NF- κ B.

The role of RAGE receptor in the determination of neuronal survival in a model of sleep apnea by intermittent hypoxia

Abstract

Sleep Apnea (SA) is a serious problem for Public Health that affects a prominent proportion of the population. In laboratory animals SA is mimicked by the exposition to Intermittent Hypoxia (IH) that induces neuronal alterations, reactive gliosis, RAGE receptor expression and its ligand S100B in the central nervous system (CNS).

In this Thesis, we developed a model of IH exposition in primary cultures from rodent hippocampus and this has allowed us to dissect some of the signaling pathways that would be responsible of the neurodegeneration and reactive gliosis that is observed in SA models. Thus, we showed IH exposition induces oxidative stress, HIF-1 and NF- κ B activation, astroglial reactive phenotype and neurite reduction. These alterations, that correlate with the observed changes in animals exposed to the AS model by IH, were prevented by culture medium application of RAGE neutralizing antibodies as well as RAGE dominant negative overexpression delivered by a viral vector or the NF- κ B and Akt pharmacological blockade. The manipulation of S100B levels was not so effective to reduce these alterations.

Attending these results, we used the same approach to diminish neuro-glial alterations in the SA experimental model by IH in rodents. Thus, RAGE blockade with hippocampal administered neutralizing antibodies or the RAGE dominant negative delivered by a viral vector, as well as the pharmacological blockade of NF- κ B were effective to diminish reactive gliosis and neuronal degeneration.

These results suggest that RAGE and NF- κ B would be involved in the neuronal alterations and reactive gliosis induced by SA. These signaling pathways would be interesting molecular targets for the development of neuroprotection strategies useful for SA treatment.

Keywords: Intermittent hypoxia, reactive gliosis, neurodegeneration, S100B, RAGE, NF- κ B.

Abreviaturas

AGE	Productos avanzados de glicosilación (del inglés <i>Advanced Glycation Endproducts</i>)
AHI	Índice de apnea-hipopnea (del inglés <i>Apnea-Hypopnea Index</i>)
Akt	Proteína kinasa B (PKB)
AS	Apnea del sueño
ATP	Adenosin trifosfato
BDNF	Factor neurotrófico derivado del cerebro (del inglés <i>Brain Derived Neurotrophic Factor</i>)
BHE	Barrera Hematoencefálica
BHT	Butilhidroxitolueno
CA1	Área I del <i>cornu ammonis</i> del hipocampo
cDNA	Ácido desoxi-ribonucleico copia
CICUAL	Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio
COX2	Ciclooxigenasa 2
Cx	Corteza cerebral
DAB	Diaminobencidina
DAMP	Patrones molecular asociado a daño (del inglés <i>Damage Associated Molecular Pattern</i>)
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium (medio para cultivo celular)
DNA	Ácido desoxi-ribonucleico
Erk1/2	Kinasas reguladas por señales extracelulares (del inglés <i>extracellular-signal-regulated kinases</i>)
GFAP	Proteína glial fibrilar ácida (del inglés <i>Glial Fibrillary Acidic Protein</i>)
GFP	Proteína fluorescente verde
GTP	Guanosin trifosfato
HI	Hipoxia intermitente
HIF-1	Factor inducible por hipoxia (del inglés <i>Hypoxia Inducible Factor</i>)
Hipp	Hipocampo
HMGB1	(del inglés <i>High Mobility Group Box 1</i>)
HRE	Elementos respondedores a hipoxia (del inglés <i>Hypoxia Responsive Elements</i>)
HSV	Virus <i>Herpes Simplex</i>
IF	Inmunofluorescencia
IFN γ	Interferón <i>Gamma</i> , Interferón tipo I
IHQ	Inmunohistoquímica
I κ B	Inhibidor <i>kappa</i> B
IKK	Kinasa de I κ B (del inglés <i>IκB Kinase</i>)
IL	Interleuquina
MAP-2	Proteína asociada a microtúbulos 2 (del inglés <i>microtubule associated protein 2</i>)
MAPK	Proteínas quinasas activadas por mitógenos (del inglés <i>Mitogen-Activated Protein Kinases</i>)
MDA	Malondialdehído
mRNA	Ácido ribonucleico mensajero

NEMO	Modificador esencial de NF-κB (del inglés <i>NF-κB Essential Modifier</i>)
NeuN	marcador de núcleos neuronales (del inglés <i>Neuronal Nuclei</i>)
Nf	Neurofilamento
NF-κB	Factor Nuclear kappaB (del inglés <i>Nuclear Factor kappaB</i>)
NIH	Institutos Nacionales de Salud (del inglés <i>National Instituto of Health EEUU</i>)
NMDA	Receptor ionotrópico de glutamato tipo procede de N-metil D-aspartato
NO	Óxido nítrico (del inglés <i>nitric oxide</i>)
Nox	Normoxia
ODI	Índice de des-saturación de oxígeno (del inglés <i>Oxygen Desaturation Index</i>)
PAMP	Patrones moleculares asociados a patógenos (del inglés <i>Pathogen Associated Molecular Pattern</i>)
PBS	<i>Buffer</i> fosfato salino (del inglés <i>Phosphate saline buffer</i>)
PRR	Receptores de reconocimiento de patrones moleculares (del inglés <i>Pattern Recognition Receptor</i>)
RAGE	Receptor para productos avanzados de glicosilación (del inglés <i>Receptor for Advanced Glycation Endproducts</i>)
RAGE-FL	Versión completa de RAGE (del inglés <i>RAGE Full Length</i>)
RAGE-ΔCyt	versión de RAGE sin la porción citoplasmática (del inglés <i>RAGE Δ Cytoplasmic</i>)
RDI	Índice de interrupción respiratoria (del inglés <i>Respiratory Disturbance Index</i>)
RNA	Ácido ribonucleico
ROS	Especies reactivas de oxígeno (del inglés <i>Reactive Oxygen Species</i>)
RT-PCR	Reacción de polimerasa en cadena en tiempo real (del inglés <i>Real Time-polimerase Chain Reaction</i>)
SEM	Error <i>standard</i> de la media (del inglés <i>standard Error Media</i>)
Sfz	Sulfasalzina
SNC	Sistema nervioso central
SNE	Suero normal equino
SNO	Suero normal ovino
SpO ₂	Saturación de oxígeno en la hemoglobina
TBARS	Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (del inglés <i>Thiobarbituric Acid Reactive Substances</i>)
TBE	Tris borato EDTA
TLR	Receptores tipo <i>Toll</i> (del inglés <i>Toll Like Receptors</i>)
TNF	Factor de necrosis tumoral (del inglés <i>Tumor Necrosis Factor</i>)
VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular (del inglés <i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>)

Agradecimientos

- ♥ **A la familia de siempre.** A la vieja, porque me acompañó, me ayudó y se llenó de orgullo siempre. Al viejo, porque mientras estuvo me “bancó” sin entender bien de qué se trataba esto. A mi hermana Lore, por su interés en la biología y por acompañarme siempre, especialmente en los tiempos difíciles. A mi hermano Leo, por enseñarme a ver la vida de otra manera. A mis sobris Rocco y Ambar, por aguantarse el tiempo de tía que les robó esta tesis y por llenarme de energía siempre. A Lalo, por la onda de siempre y por los dos sobrinos hermosos que me dio. A la Tibu, por darme el empujón que necesitaba para dedicarme a esto cuando tuve la duda. A Lucio, por bajarme a tierra y por cuidar la casa cada vez que la ciencia me llevó a otros lugares. A Aníbal, por las largas discusiones sobre evolución que me permitieron “bajar” al mundo todo lo que aprendí en estos años.
- ♥ **A Eze** por acompañarme en este camino y alentarme siempre a pesar de los vaivenes, y por permitirme armar nuestra familia.
- ♥ **A la familia nueva** por darme un lugar entre ellos.
- ♥ **Al laboratorio.** A Javier por darme la oportunidad de trabajar de esto, por apostar por mí, por estimularme a aprender y seguir formándome y por las tardes de charlas filosóficas. A Ale, el amigo que me dio el lab, por los consejos, la ayuda y sobre todo por la generosidad con su conocimiento. A Jero, por la ayuda en todo lo que necesité, por los trámites en Ciudad, por las charlas y también por “enseñarme a enseñar”. Al resto de la gente que me acompaña: Alicia, Gera y Moni por la ayuda de todos los días. También a los que pasaron por el lab y me ayudaron en su momento: Agustina, Rolo y Rocío.
- ♥ **Al IBCN.** Especialmente a toda toda su gente. A su directora Dra. Alicia Brusco. A los investigadores de los distintos laboratorios que me brindaron ayuda durante estos años, en especial a los Dres. Ledda, Paratcha, Falzone, Medina, Viola y Reinés. A los becarios del instituto que también me brindaron ayuda y con quienes compartimos tanto tiempo y charlas, especialmente a Gaby, Victorio, Paula, Lola, Fran, Fer, Cynthia, Caro, Micole, Fabricio, Ceci, Sabri, Diego, Lucho, Jennifer, Vero, Vicky, Maga y Marina. A los técnicos por facilitar mi trabajo, en especial a Andrea, Manuel, Charly y Lisandro. Al personal de apoyo del instituto, en especial a Caro, Silvia y Ceci.
- ♥ **Al LIA DEVENIR.** A la Dra. Diana Jerusalinsky que me “adoptó” entre sus becarias, por facilitar la producción de los vectores y por su eterna ayuda con todas las cartas de recomendación. Al Dr. Alberto Epstein por recibirme en su laboratorio y permitirme conocer como se trabaja en otras partes del mundo. A Aleia por ser mi guía en “biolmol” y una amiga en la vida Lyonesa.
- ♥ **A mi consejera de Estudios,** la Dra. Graciela Boccacio, por la buena predisposición y la ayuda de siempre.
- ♥ **Al Laboratorio Nacional de Radicales Libres,** Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA, especialmente a la Dras. Silvia Alvarez y Virginia Vanasco por su ayuda con la detección de TBARS.

- ♥ **A los amigos**, que aunque no los veamos siempre están. A Ana Paula, por fascinarse con la biología desde siempre, por las correcciones de la Tesis y por el aguante en tiempos difíciles. A las “pibas” por las mañanas, tardes y noches de estudio compartidas y por el apoyo de siempre. Al “Tupper” y anexos por todos los momentos vividos desde hace tantos años. A “Pies Atados FC”, que apareció en los últimos tiempos pero supo ganarse un lugar en mi corazón, por dejar el arco bajo mi responsabilidad y por “desenchufarme” los sábados.
- ♥ **A las organizaciones** que financiaron las necesidades de este trabajo con sus subsidios y becas: CONICET, ANPCyT, IBRO, Sociedad Argentina de Investigación en Neurociencias (SAN), Sociedad Francesa de Neurociencias, Sociedad Argentina de Investigación Clínica (SAIC), Fundación Crimson, Olympus-BioAnalítica.

Dedicatoria

- ♣ A la vieja
- ♣ A Lore y Leo
- ♣ A Rocco y Ambar
- ♣ A Eze

Índice

Introducción	10
LA APNEA DEL SUEÑO ES UNA PATOLOGÍA PREVALENTE EN LA SALUD PÚBLICA	11
BASES BIOLÓGICAS DE LAS ALTERACIONES EN LA AS: STRESS OXIDATIVO E INFLAMACIÓN.....	13
ALTERACIONES DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL PRODUCIDAS POR LA AS	17
LA ACTIVACIÓN DE LA INMUNIDAD INNATA GENERA INFLAMACIÓN	20
ACTIVACIÓN DE LA INMUNIDAD INNATA EN EL SNC.....	23
S100B Y SU RECEPTOR RAGE COMO ACTIVADORES DE LA INMUNIDAD INNATA.....	25
MODELOS EXPERIMENTALES DE AS.....	29
ALTERACIONES INDUCIDAS POR LA HI EN EL SNC.....	30
<i>La exposición a HI induce gliosis reactiva y alteraciones neuronales</i>	<i>30</i>
<i>La HI induce expresión de RAGE, sobreexpresión de S100B y activación de NF-κB.....</i>	<i>33</i>
Hipótesis y Objetivos	37
Materiales y Métodos	39
ANIMALES	40
EXPOSICIÓN DE LOS ANIMALES A HIPOXIA INTERMITENTE.....	40
IMPLANTACIÓN DE CÁNULAS INTRACEREBRALES.....	41
PÉRDIDAS DE FUNCIÓN <i>IN VIVO</i>	42
FIJACIÓN DE ANIMALES POR PERFUSIÓN INTRACARDÍACA Y OBTENCIÓN DE SECCIONES DE TEJIDO	43
PROCESAMIENTO DE CORTES HISTOLÓGICOS	43
<i>Inmunohistoquímica por flotación.....</i>	<i>43</i>
<i>Inmunofluorescencia por flotación</i>	<i>45</i>
OBTENCIÓN DE CULTIVOS PRIMARIOS MIXTOS (GLÍA Y NEURONAS)	46
EXPOSICIÓN DE CULTIVOS PRIMARIOS MIXTOS A HI	46
ENSAYOS DE PÉRDIDA Y GANANCIA DE FUNCIÓN <i>IN VITRO</i>	47
FIJACIÓN DE CULTIVOS MIXTOS PARA INMUNOFLUORESCENCIA	48
FOTOMICROGRAFÍAS.....	48
ESTUDIOS DE MORFOLOGÍA CELULAR.....	48
EXTRACCIÓN Y AISLAMIENTO DE RNA	49
RT-PCR (TRANSCRIPCIÓN REVERSA DE MRNA Y PCR DEL CDNA)	50
<i>INMUNOBLOTS</i> DE TEJIDOS	51
<i>Obtención de muestras.....</i>	<i>51</i>
<i>Determinación de proteínas</i>	<i>51</i>
<i>Corrida electroforética.....</i>	<i>51</i>
EVALUACIÓN DE DAÑO A LÍPIDOS: SUSTANCIAS REACTIVAS AL ÁCIDO TIOBARBITÚRICO (TBARS)	52
PRODUCCIÓN DE VECTORES VIRALES.....	53
<i>Clonado de plásmidos amplicón codificantes para las distintas versiones de RAGE (RAGE-FL y RAGE-Δcyt).....</i>	<i>53</i>
<i>Producción de vectores Amplicón</i>	<i>56</i>
MÉTODOS ESTADÍSTICOS	57
Resultados	58

ALTERACIONES PRODUCIDAS POR LOS MODELOS <i>IN VIVO</i> E <i>IN VITRO</i> DE APNEA DEL SUEÑO POR HIPOXIA INTERMITENTE..	59
<i>El modelo experimental de Hipoxia Intermitente (HI) in vivo reproduce los niveles de saturación de oxígeno en sangre de pacientes con AS.</i>	59
<i>El modelo de HI induce la expresión de GFAP y la activación transcripcional de NF-κB</i>	60
<i>La HI induce un aumento de ROS tanto in vivo como in vitro</i>	63
<i>Expresión de RAGE in vitro en cultivos hipocampales mixtos.</i>	64
<i>La HI induce activación de NF-κB in vitro en cultivos mixtos hipocampales.</i>	67
<i>La exposición a HI induce cambios en la morfología astrogliol in vitro.</i>	69
<i>La exposición a HI provoca cambios significativos en la longitud de las dendritas in vitro.</i>	71
<i>La exposición a HI induce un aumento en la abundancia del factor HIF-1α.</i>	72
ESTUDIOS FUNCIONALES <i>IN VITRO</i> SOBRE LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN S100B/RAGE/NF-κB	74
<i>El tratamiento con S100B in vitro previene parcialmente los cambios morfológicos inducidos por la HI en astrocitos de cultivos hipocampales mixtos.</i>	74
<i>La estimulación con S100B en cultivos primarios mixtos previene parcialmente el acortamiento de dendritas inducido por la HI in vitro.</i>	76
<i>El bloqueo de S100B previene la stellation inducida por la HI in vitro.</i>	77
<i>El bloqueo de RAGE previene la retracción de las prolongaciones neuronales inducida por la HI in vitro.</i>	78
<i>En astrocitos, el bloqueo de RAGE previene la stellation inducida por la HI in vitro.</i>	79
<i>La expresión del dominante negativo de RAGE (RAGEΔcyt) previene los cambios en la morfología glial inducidos por la HI.</i>	81
<i>El bloqueo de NF-κB in vitro previene los cambios morfológicos inducidos por la exposición a HI en astrocitos.</i>	82
ESTUDIOS DE GANANCIA Y PÉRDIDA DE FUNCIÓN <i>IN VIVO</i> SOBRE LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN S100B/RAGE/NF-κB.	85
<i>Participación de S100B en las alteraciones neuronales y gliales inducidas por la exposición a HI.</i>	85
<i>El bloqueo de S100B no previene las alteraciones neuronales inducidas por la HI in vivo.</i>	85
<i>El bloqueo de S100B previene la gliosis reactiva inducida por la HI in vivo.</i>	87
<i>Participación de RAGE en las alteraciones neuronales y gliales inducidas por la exposición a HI.</i>	89
<i>El bloqueo de RAGE previene las alteraciones neuronales inducidas por HI in vivo.</i>	89
<i>Anticuerpos anti-RAGE previenen la gliosis reactiva inducida por la HI in vivo.</i>	90
<i>La expresión de RAGE pero no de RAGE-Δcyt induce alteraciones neuronales en ausencia de injuria in vivo.</i>	92
<i>Modulación de NF-κB in vivo.</i>	94
<i>La Sulfasalazina inhibe la translocación nuclear de p65 in vivo.</i>	94
<i>El bloqueo de NF-κB previene las alteraciones neuronales inducidas por la HI in vivo.</i>	95
Discusión y Conclusiones	97
CARACTERIZACIÓN DE LOS MODELOS DE AS POR HI UTILIZADOS	98
PARTICIPACIÓN DE LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN S100B/RAGE/NF-κB EN LAS ALTERACIONES INDUCIDAS POR LA HI	105
<i>Exposición y bloqueo de S100B</i>	105
<i>Expresión y activación de RAGE</i>	108
<i>Estudio de la señalización intracelular: Akt y NF-κB</i>	110
CONCLUSIONES FINALES	112
Bibliografía	115

Introducción

La apnea del sueño es una patología prevalente en la Salud Pública

La apnea del sueño (AS) es un desorden respiratorio del sueño que tiene una gran importancia en la Salud Pública por su alta prevalencia e impacto en la salud y calidad de vida (Lavie, 2012). Estudios realizados en Estados Unidos, Australia, India, China y Corea han demostrado que la prevalencia de la AS alcanza entre el 4 y 7% en hombres y entre el 2 y 5% en mujeres (Young y cols., 1993; 2002; Punjabi, 2008). La AS se caracteriza por interrupciones de la respiración que se presentan reiteradas veces a lo largo del período de sueño (Simmons y Pruitt 2012). Según la definición clínica de este desorden, se considera que el diagnóstico de AS se alcanza cuando las interrupciones duran al menos 10 segundos (Campana y cols., 2010; Park y cols., 2011) y se presentan como mínimo 5 veces por hora (Simmons y Pruitt, 2012).

El tipo más común de AS es la apnea obstructiva, en la cual las vías respiratorias colapsan o se bloquean durante el sueño e impiden el paso normal del aire a pesar del esfuerzo respiratorio (Pack, 1994; Badr, 1999; Eckert y Malhotra, 2008; Campana y cols., 2010). Un tipo menos frecuente de AS es la apnea central, causada por irregularidades en las señales del centro respiratorio del cerebro y caracterizada por la ausencia de esfuerzo respiratorio (Eckert y cols., 2007). Sin embargo, algunos pacientes de AS presentan una combinación de ambos tipos a la que se denomina AS compuesta (Morgenthaler y cols., 2006; Javaheri y cols., 2009).

Características distintivas de la AS son los episodios de des-saturación de oxihemoglobina seguidos de la reoxigenación debida al restablecimiento del flujo de aire. Estos episodios generalmente inducen pequeños despertares que pueden conducir a la deprivación, fragmentación o alteración del sueño (Deegan y cols., 1995). Durante los episodios de apnea la saturación de oxígeno en la hemoglobina (SpO_2) puede descender a valores muy bajos. Esta secuencia de oscilaciones en la saturación de oxígeno se denomina hipoxia intermitente (HI) y conduce a *stress* oxidativo con producción de especies reactivas del oxígeno (ROS, del inglés *Reactive Oxygen Species*) (Lavie, 2003) y activación de distintas cascadas de señalización intracelulares (Semenza, 2000; Li y cols., 2006; Semenza y Prabhakar, 2007; Williams y Scharf, 2007; Prabhakar y cols., 2009; Lavie, 2012; Song y cols., 2012).

La gravedad de la AS se mide de acuerdo a la cantidad de episodios de apnea por hora denominando este factor como índice de apnea-hipopnea (AHI, del inglés *Apnea-Hypopnea Index*) o índice de interrupción respiratoria (RDI, del inglés *Respiratory Disturbance Index*) (Epstein y cols., 2009; Lavie, 2012; Simmons y Pruitt, 2012). Otro parámetro importante en la AS es el nivel de hipoxemia, que se determina por el índice de des-saturación de oxígeno (ODI, del inglés *Oxygen Desaturation Index*) calculado como el número de descensos en la saturación de este gas en la hemoglobina de, al menos, 3-4% por hora de sueño (Lavie, 2012). Una medida alternativa para este índice es el porcentaje de tiempo de sueño que el paciente pasa con una saturación de oxígeno arterial menor al 90% (Lavie, 2012).

Una gran variedad de patologías se asocian a la AS, incluyendo enfermedad cardiovascular, hipertensión, obesidad, dislipemia, resistencia a insulina, somnolencia y disfunciones neurocognitivas (Lavie, 2009; Levy y cols., 2009). Así, la AS se ha asociado a somnolencia diurna y fallas cognitivas como también a enfermedades cardiovasculares y metabólicas que llevan a un incremento en la mortalidad (Levy y cols., 2011). Gran cantidad de trabajos realizados tanto en el terreno clínico como en el experimental muestran que la AS es un factor de riesgo para hipertensión y accidentes cardiovasculares (Peppard y cols., 2000; Marin y cols., 2005; Park y cols., 2011). Se ha mostrado también una relación entre la AS y fibrilación arterial (Gami y cols., 2007; Park y cols., 2011), arritmias (Mehra y cols., 2006; Park y cols., 2011), alteraciones en los barorreflejos (Brooks y cols., 1999), hematocrito y presión arterial pulmonar aumentados (McGuire y cols., 2001), cambios en la estructura y función cardíacas (Kraiczi y cols., 1999), vasodilatación alterada en arterias musculares y cerebrales (Phillips y cols., 2004) y aumento en la respuesta a endotelina (Lefebvre y cols., 2006). Otras alteraciones no relacionadas al sistema cardiovascular fueron asociadas con la HI. Entre ellas se destacan la facilitación de largo término en los músculos geniogloso y diafragma (Baker y Mitchell, 2000; McKay y cols., 2004) y facilitación sensorial a nivel de los cuerpos carotídeos (Peng y cols., 2003).

La AS también se considera factor de riesgo para alteraciones metabólicas como diabetes y desarrollo de resistencia a insulina (Punjabi y cols., 2003; 2004; Park y cols., 2011). La AS afecta la cantidad y calidad del sueño, cuya restricción afecta las vías

metabólicas (Knutson y cols., 2007; Levy y cols., 2009). Por ejemplo, se ha demostrado que la restricción del sueño experimental causa resistencia a insulina con incremento de cortisol y de activación simpática nocturna (Spiegel y cols., 1999). Además, las alteraciones en la duración o continuidad del sueño se han asociado a reducción de leptina (Spiegel y cols., 2004; Taheri y cols., 2004; Chaput y cols., 2007) e incremento de ghrelina (Spiegel y cols., 2004, Taheri y cols., 2004) en plasma, aumento del apetito (Spiegel y cols., 2004), alteraciones en la tolerancia a glucosa (Tasali y cols., 2008) y aumento del índice de masa corporal (Taheri y cols., 2004; Chaput y cols., 2007). Así mismo se han reportado alteraciones en la capacidad antioxidante, con una reducción en el estado total antioxidante y descenso en los niveles de vitaminas A y E (Barceló y cols., 2006).

La AS también se asocia a complicaciones perioperatorias como dificultad de intubación (Siyam y Benhamou, 2002), incrementos en las depresiones respiratorias por anestésicos y analgésicos (Chung y cols., 2008), aumento de reintubaciones postoperatorias (Gupta y cols., 2001), arritmias cardíacas (Moore y cols., 1996) y mayores tiempos de internación (Gupta y cols., 2001).

La AS también ha sido relacionada con los episodios de isquemia cerebral, como patología subyacente previa (Valham y cols., 2008; Redline y cols., 2010; Park y cols., 2011). Por otro lado, la relación entre AS y epilepsia es reconocida desde los años ochenta (Wyler y Weymuller, 1981) y parece ser más importante en adultos mayores que nunca presentaron epilepsia previamente (Malow y cols., 2000; Manni y cols., 2003).

Bases biológicas de las alteraciones en la AS: stress oxidativo e inflamación

La HI es considerada como el aspecto fisiopatológico característico de la AS y ha sido estudiada considerablemente, tanto a nivel experimental como clínico, relacionándola con alteraciones secundarias cardiovasculares y metabólicas (Li y cols., 2005; Volgin y cols., 2006; Jun y Polotsky, 2007; Savransky y cols., 2007; Dematteis y cols., 2008; Levy y cols., 2008). Algunos autores proponen además que la fragmentación de sueño es otro factor fisiopatológico de la AS, especialmente en

cuanto a las deficiencias cognitivas que presentan los pacientes con AS (Knutson y cols., 2007; Levy y cols., 2009). Sin embargo, la mayoría de los autores acuerdan en que la activación del sistema nervioso simpático, el *stress* oxidativo y la inflamación sistémica son los principales mecanismos subyacentes de las alteraciones de la AS y la HI (Levy y cols., 2011).

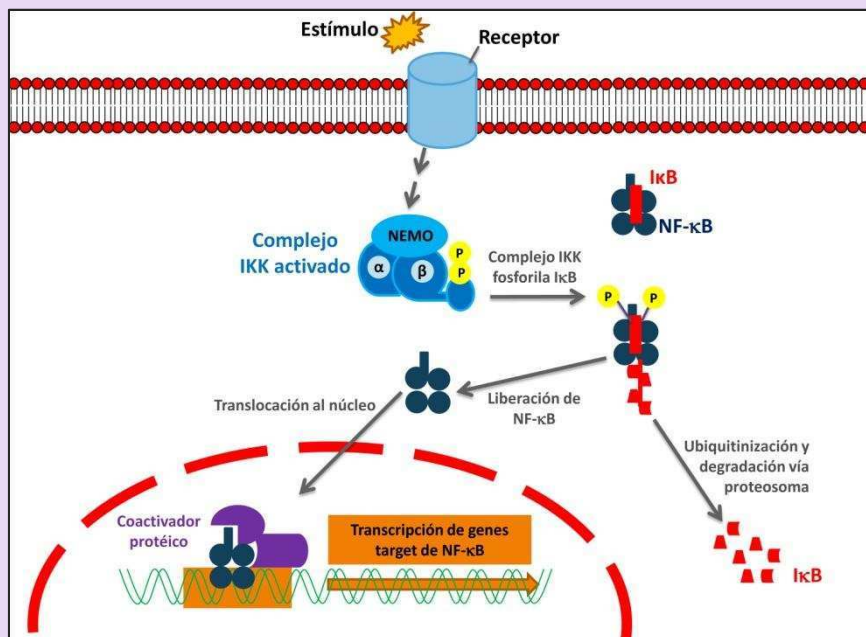
El *stress* oxidativo es definido como una disrupción en el balance de los sistemas productores de oxidantes y los mecanismos de defensa antioxidantes (Lavie, 2012). El *stress* oxidativo generado por la AS, se atribuye principalmente a la reducida disponibilidad de oxígeno seguida por un período de reoxigenación que genera una exacerbada producción de ROS (McCord, 2000; Valko y cols., 2007; Lavie, 2012). Así, distintos estudios mostraron un aumento de biomarcadores de *stress* oxidativo en pacientes de AS (Schulz y cols., 2000; Schulz y cols., 2000; Dyugovskaya y cols., 2002; Carpagnano y cols., 2003; Lavie y cols., 2004; Yamauchi y cols., 2005; Jordan y cols., 2006). A pesar de que las moléculas oxidadas son reguladores vitales de la función celular y actúan como segundos mensajeros en gran cantidad de vías de transducción de señales (Suzuki y cols., 1997), la producción aumentada de ROS afecta gran cantidad de funciones celulares por daño a biomoléculas como lípidos, proteínas, DNA y carbohidratos (Valko y cols., 2007).

El papel que se le atribuye a la inflamación en las alteraciones observadas en pacientes con AS es cada vez más importante ya que modelos animales y celulares expuestos a HI mostraron activación de vías inflamatorias (Ryan y cols., 2005; Greenberg y cols., 2006; McNicholas, 2009). Especialmente en este área es donde comienza a emerger el papel del factor de transcripción conocido como factor nuclear kappaB (NF- κ B, del inglés *Nuclear Factor kappaB*) (Ver Recuadro 1) en la patología de AS (Lavie, 2012). Otro reconocido factor de transcripción aumentado en la AS, tal como en otras situaciones de hipoxia, es el factor inducible por hipoxia 1 (HIF-1, del inglés *Hypoxia Inducible Factor 1*) (Ver Recuadro 2) (Garvey y cols., 2009).

NF- κ B juega un rol esencial en la respuesta inflamatoria y dirige la expresión de distintos factores que incluyen moléculas de adhesión, enzimas y citoquinas como TNF- α , IL-6 e IL-8 (Kletsas y cols., 2004; Greenberg y cols., 2006; Tsatsanis y cols., 2006). Distintos trabajos, tanto en modelos animales y celulares de HI como estudios

en pacientes de AS, mostraron una activación de NF- κ B y sus genes blanco, especialmente TNF- α (Ryan y cols., 2005; 2006; 2007; Greenberg y cols., 2006; Htoo y cols., 2006; Yamauchi y cols., 2006).

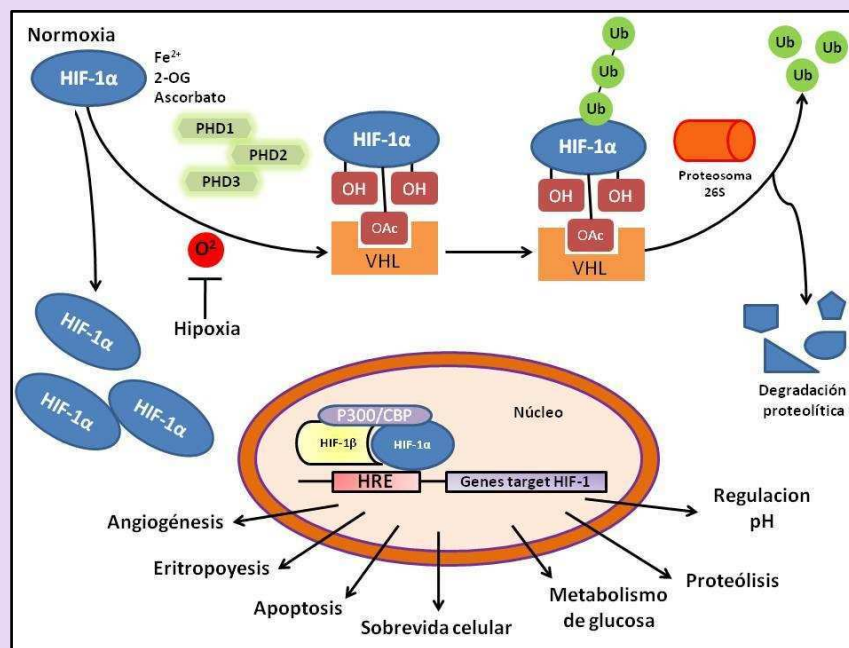
Recuadro 1: Regulación del factor de transcripción NF- κ B



Modificado de Alberts y cols., *Molecular Biology of the Cell* (2008) Garland.

En mamíferos existen 5 miembros de la familia de factores de transcripción Rel/NF- κ B (RelA, RelB, c-Rel, NF- κ B1 y NF- κ B2) que forman hetero- u homodímeros, siendo el más común de ellos el compuesto por las subunidades p50/RelA (p50/p65). Los dímeros se encuentran retenidos en el citoplasma, asociados a un inhibidor llamado I κ B que ocluye su secuencia de localización nuclear.

Distintos receptores de membrana pueden activar la vía de señalización de NF- κ B en células animales. Una vez activados, estos receptores inducen una cascada de fosforilación, ubiquitinización y consecuente degradación de I κ B (Mercurio y cols., 1997; Zandi y cols., 1997). La fosforilación de I κ B es mediada por la kinasa de I κ B (IKK, del inglés *I κ B Kinase*), que es un complejo multiprotéico que contiene dos proteínas kinasas serina/treonina (IKK α e IKK β) y una proteína reguladora llamada NEMO (del inglés *NF- κ B Essential Modifier*) o IKK γ . Una vez liberado de su complejo protéico inhibidor, NF- κ B puede translocar al núcleo e iniciar la transcripción de cientos de genes que participan en distintos procesos celulares. Entre los genes regulados por NF- κ B se encuentra el gen que codifica para I κ B α , estableciéndose así un *feedback* negativo sobre la propia regulación del factor de transcripción.

Recuadro 2: Regulación del factor de transcripción HIF-1 α 

Modificado de Carroll y Ashcroft, 2005

HIF es un factor de transcripción con un rol esencial en la respuesta intracelular a la hipoxia. HIF es un heterodímero compuesto por 2 subunidades: la subunidad HIF-1 α sensible a oxígeno y la subunidad HIF-1 β expresada constitutivamente (Wang y cols., 1995). HIF-1 α se sintetiza constitutivamente pero es rápidamente degradado en condiciones de normoxia (Sharp y Bernaudin, 2004; Semenza, 2004; 2007). La degradación ocurre vía prolin-4-hidroxilasas que utilizan O_2 y α -cetoglutarato como sustratos para hidroxilar dos residuos prolina de la subunidad α del factor de transcripción. HIF-1 α hidroxilado se une a la proteína von Hippel-Lindau (VHL) que recluta subunidades de la ubiquitin-ligasa E3, convirtiendo a HIF-1 α en blanco de ubiquitinación y degradación en el proteosoma 26S. En condiciones de hipoxia se reduce la actividad de la prolin-4-hidroxilasa, resultando en menor hidroxilación y degradación de HIF-1 α . Entonces esta subunidad es capaz de dimerizar con HIF-1 β para formar el complejo transcripcional HIF-1. Este complejo se une a elementos respondedores a hipoxia (HRE, del inglés *Hypoxia Responsive Elements*) en genes blanco y recluta proteínas co-activadoras induciendo la transcripción de genes codificantes para enzimas metabólicas y factores pro-angiogénicos (Cunningham y cols., 2012; Xia y cols., 2012).

HIF-1 es activado en respuesta a condiciones de hipoxia. En cultivos celulares y animales expuestos a HI se describió un aumento en la activación de este factor (Semenza y Prabhakar, 2007; Prabhakar y cols., 2009). A pesar de esto, no se ha demostrado un aumento en la abundancia de este factor de transcripción en pacientes, pero se encontraron incrementados algunos de sus genes blanco como la eritropoyetina y el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF, del inglés *Vascular*

Endothelial Growth Factor) (Lavie y cols., 2002; 2005; Valipour y cols., 2004; Winnicki y cols., 2004).

En diversos trabajos se ha evidenciado un *crossstalk* entre HIF-1 α y NF- κ B en condiciones de hipoxia continua. Se ha demostrado que existe un sitio de unión para NF- κ B en el promotor de HIF-1 α y que, en condiciones de hipoxia, NF- κ B controla la expresión del RNA mensajero de HIF-1 α (Belaiba y cols., 2007; Taylor, 2008; van Uden y cols., 2008). Igualmente, NF- κ B es afectado por la vía de HIF-1 α por sobre-regulación de p65 y de IKK α (Walmsley y cols., 2005; Belaiba y cols., 2007). Estos hallazgos aumentan el nivel de complejidad en las funciones de ambos factores de transcripción (Lavie y Lavie, 2009).

Tanto el *stress* oxidativo como la inflamación son reconocidos como mecanismos fundamentales para el desarrollo de diferentes alteraciones fisiopatológicas (Lavie, 2012). Una vez iniciado, el *stress* oxidativo promueve inflamación que, a su vez, causa *stress* oxidativo (Lavie, 2003; Ryan y cols., 2005). De esta manera se establece un circuito de retroalimentación positiva entre ambos mecanismos que promueven disfunción celular y alteraciones en el organismo.

Alteraciones del sistema nervioso central producidas por la AS

La AS no es solamente un trastorno respiratorio con consecuencias metabólicas y cardiovasculares. Como se comentó previamente, los ciclos de hipoxia y la fragmentación del sueño pueden provocar fallas en las funciones cerebrales que afectan el desempeño de la vida diaria y además son importantes causas de la somnolencia y la falta de atención que pueden ocasionar accidentes de tránsito. La mayoría de los pacientes de AS no diagnosticados presentan dificultades conductuales, que incluyen somnolencia, fatiga, fallas en la memoria, falta de concentración y, en menor medida, problemas sensoriales o motores. A pesar de la clara asociación patológica observada en el ambiente clínico, es difícil discernir si la AS contribuye directamente a las fallas neurocognitivas ya que generalmente los pacientes padecen otras enfermedades como diabetes, hipertensión y enfermedad cerebrovascular.

La idea de que la AS induce el daño neuronal surge a partir de la experiencia de tratamientos efectivos para la AS, que muestran mejoría en los problemas neurológicos, aunque resultan incapaces de revertirlos completamente (Dempsey y cols., 2010). Recién en los últimos años se comenzaron a conocer algunos de los eventos que ocurren en el sistema nervioso central (SNC) de los pacientes de AS y de la relación que éstos pueden tener con la fragmentación del sueño y con la HI (Xie y cols., 2012). Se han realizado numerosos estudios de neuroimágenes en pacientes con AS y algunos de ellos han descrito cambios notables de la arquitectura cerebral. Los cambios estructurales muestran esencialmente inflamación, atrofia y muerte celular (O'Donoghue y cols., 2012). Así mismo, se ha demostrado una disminución en la sustancia gris del hipocampo, corteza cingulada anterior, cerebelo, lóbulos temporales y frontales de pacientes con AS (Macey y cols., 2002; Morrell y cols., 2010; Gale y Hopkins, 2004; Lal y cols., 2012). Estos estudios atribuyen las alteraciones cognitivas que ocurren en pacientes con AS a los cambios funcionales y anatómicos descritos a nivel cerebral, especialmente en la corteza prefrontal y el hipocampo (Naëgele y cols., 1995; 1998; 2006; Macey y cols., 2002; Bartlett y cols., 2004; Rae y cols., 2009).

En los últimos años, también han resultado fundamentales los estudios basados en modelos animales, que permitieron realizar un gran avance en la disección y el entendimiento de los mecanismos subyacentes de las alteraciones neurocognitivas de la AS (Xie y cols., 2012). Análogamente a lo que ocurre en pacientes, se ha descrito que la exposición de animales a HI durante el sueño se asocia con déficit en el aprendizaje espacial, como también con pérdida neuronal en corteza e hipocampo (Gozal y cols., 2001; Row y cols., 2002). Distintos factores y vías de señalización fueron propuestos como efectores de la HI y de la fragmentación del sueño (Xie y cols., 2012). Uno de los mecanismos propuestos es la apoptosis neuronal, que puede ser inducida por los episodios de hipoxia y causar una desorganización de la citoarquitectura hipocampal (Gozal y cols., 2001; Goldbart y cols., 2003). Esta hipótesis es respaldada por la detección de apoptosis en el área CA1 del hipocampo luego de la exposición a HI y precediendo la aparición de fallas en la memoria (Gozal y cols., 2001; Avilés Reyes, Angelo y cols., 2010).

Otro factor implicado en las alteraciones de la AS sobre el SNC es el *stress* oxidativo (Wang y cols., 2010). El cerebro es uno de los órganos más sensibles al daño oxidativo por la presencia de gran cantidad de ácidos grasos insaturados, el gran consumo de oxígeno y la escasez de mecanismos de defensa antioxidantes (Butterfield y cols., 2002; Wang y cols., 2010). Dado que el *stress* oxidativo está implicado en el deterioro cognitivo que ocurre durante el envejecimiento y las enfermedades neurodegenerativas (Beal y cols., 1995), también se le asigna un papel importante en las alteraciones neurocognitivas de la AS. Se ha demostrado que la HI induce aumentos en los niveles de peroxidación de lípidos y oxidación de proteínas y ácidos nucleicos en la corteza cerebral, que conducen a apoptosis (Gozal y cols., 2001; Row y cols., 2003; Veasey y cols., 2004; Xu y cols., 2004; Zhan y cols., 2005a; 2005b; Fung y cols., 2007). Las alteraciones cognitivas se asocian al incremento de apoptosis y *stress* oxidativo en el área CA1 del hipocampo y la corteza cerebral (Veasey y cols., 2004; Zhan y cols., 2005a; 2005b). Apoyando esta hipótesis, se realizaron distintos trabajos donde se demostró la capacidad de algunos antioxidantes para revertir las fallas cognitivas y los niveles de apoptosis y producción de ROS (Row y cols., 2003; Kheirandish y cols., 2005; Zhan y cols., 2005a; 2005b).

La HI inducida por la AS también puede comprometer la fosforilación oxidativa generando una menor disponibilidad de ATP para mantener el gradiente iónico en las neuronas, lo que sería la base de la disfunción neuronal previa a la apoptosis (Xie y cols., 2012). Esta hipótesis es respaldada por estudios de imágenes por resonancia magnética en pacientes sometidos a tareas de atención sostenida que mostraron actividad disminuida en regiones frontales, parietales y del cíngulo (Ayalon y cols., 2009). Sólo algunos estudios investigaron los efectos de la HI sobre la excitabilidad neuronal y la transmisión sináptica, demostrando que la HI disminuye la excitabilidad de las neuronas hipocámpales (Xie y cols., 2010). La potenciación de largo término, propuesta como uno de los mecanismos celulares de la formación de las memorias de largo término, también es afectada por la HI (Xie y cols., 2010), convirtiéndose en otro probable factor involucrado en los déficits de la memoria observados tanto en pacientes como en modelos animales. Otros estudios electrofisiológicos revelaron que la AS experimental produce un aumento en los niveles de glutamato, que conducen a

excitotoxicidad en el hipocampo con la consecuente apoptosis de las neuronas del área CA1 del hipocampo (Fung y cols., 2007). Adicionalmente, se observó una disminución en el receptor de NMDA en la corteza y área CA1 luego de la HI (Gozal y cols., 2001). Este resultado respalda la hipótesis de que la excitotoxicidad por glutamato subyace las consecuencias estructurales y comportamentales de la HI (Albin y Greenamyre, 1992). El factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF, del inglés *Brain Derived Neurotrophic Factor*), que es expresado y liberado de manera dependiente de la actividad en el SNC, puede modular la plasticidad y transmisión sináptica (Poo, 2001; Lu, 2004; Lu y cols., 2008; Rose y cols., 2004). Este factor está reducido luego de exposición a HI (Xie y cols., 2010), constituyendo así otro probable factor implicado con las fallas en la plasticidad hipocampal y en la memoria.

Como se comentó anteriormente, la respuesta hipóxica activa el factor de transcripción HIF-1 α , lo que se evidencia en el aumento de HIF-1 activo en el SNC de animales de experimentación (Peng y cols., 2006) e *in vitro* en células PC12 expuestas a HI (Yuan y cols., 2005). Los ROS generados y los cambios intracelulares de Ca²⁺ cooperarían en la inducción de la acumulación de HIF-1 α en la HI (Yuan y cols., 2008). Estudios de pérdida de función utilizando quelantes de Ca²⁺ demostraron que la ausencia de este ion induce una disminución en la activación de HIF-1 inducida por la HI (Yuan y cols., 2005). Otros estudios agregan como responsables de las consecuencias de la AS en el SNC a la disfunción mitocondrial, inducción de mediadores inflamatorios y regulación alterada de cascadas de genes pro- y anti-apoptóticos (Gozal y cols., 2001; 2002; 2003; Goldbart y cols., 2003; Li y cols., 2003).

La activación de la inmunidad innata genera inflamación

La respuesta de los mamíferos a los patógenos tiene esencialmente dos niveles conocidos como inmunidad innata e inmunidad adaptativa. La respuesta inmune innata es una respuesta genérica, no específica para un patógeno particular y tiene tres líneas de defensa que pueden prevenir o detener una infección. La primera de estas líneas está compuesta por barreras físicas y químicas que previenen el ingreso de

microorganismos al cuerpo. Ejemplos de esta estrategia son la piel y el pH estomacal. La segunda línea de defensa comprende las respuestas intrínsecas de las células, por las cuales una célula individual reconoce que ha sido infectada y reacciona eliminando o dañando al patógeno, como por ejemplo la fagocitosis de una bacteria y su posterior digestión en los lisosomas. La tercera línea de la inmunidad innata depende de un grupo de receptores expresados en células inmunocompetentes que reconocen moléculas conservadas de los patógenos y se activan rápidamente para montar una respuesta celular con el objetivo de eliminarlos. Estas moléculas reciben el nombre de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP, del inglés *Pathogen Associated Molecular Pattern*). Los receptores encargados de reconocer PAMP están altamente conservados en la evolución y se denominan receptores de reconocimiento de patrones moleculares (PRR, del inglés *Pattern Recognition Receptor*) (Kumar y cols., 2009; Olive, 2012).

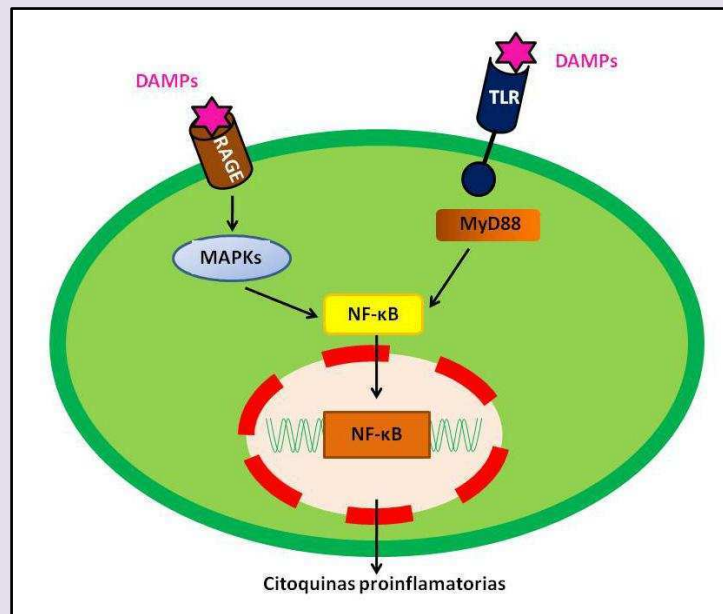
Más recientemente, se pudo observar que la inmunidad innata también se activa en ausencia de patógenos por el daño tisular inespecífico, por ejemplo el derivado de la necrosis. Para ello, los PRR no responden sólo a PAMP sino también a señales de daño o alarma generadas por células afectadas o que están sufriendo *stress* metabólico. Estas moléculas endógenas capaces de activar la inmunidad innata, son conocidas como patrones moleculares asociados a daño (DAMP, del inglés *Damage Associated Molecular Pattern*) (Matzinger, 1994; 2002). Los DAMP, una vez expuestos al espacio extracelular, interaccionan con receptores PRR presentes en células inmunocompetentes y activan la inmunidad innata produciendo inflamación (Medzhitov y Janeway, 2000; Mollen y cols., 2006). Las células afectadas o en vías de muerte también pueden generar signos de daño por clivaje de moléculas que forman parte de los componentes estructurales de la matriz extracelular, constituyendo así DAMP de origen extracelular (Rosin y Okusa, 2011). Los DAMP incluyen moléculas como las *heat shock proteins*, HMGB1 (del inglés *High Mobility Group Box 1*), S100/calgranulinas, DNA doble cadena, ácido úrico, ATP, adenosina, tiorredoxina, ROS, heparan sulfato, fibronectina, fibrinógeno, ácido hialurónico y productos de glicosilación/oxidación de proteínas y lípidos formados durante el *stress* oxidativo (Schenk y cols., 1996; Bertini y cols., 1999; Bours y cols., 2006; Bianchi, 2007; Di

Virgilio, 2007; Fredholm, 2007; Blackburn y cols., 2009; Trautman, 2009; Piccinini y Midwood, 2010; Rosin y Okusa, 2011).

Los PRR pueden clasificarse en receptores asociados a célula o secretados (Sirisinha, 2011). Los PRR asociados a células se encuentran en la membrana plasmática o en membranas intracelulares como las de endosomas, del retículo endoplasmático o de lisosomas (Kawai y Akira, 2010; Kumagai y Akira, 2010). También existen PRR citoplasmáticos y otros que, como consecuencia de *splicing* alternativo, pierden su dominio de anclaje a membrana y son secretados al espacio extracelular, probablemente con un rol modulador de la respuesta inmune innata que aun no se comprende totalmente.

Los PRR de membrana, luego de la activación por los ligandos correspondientes, se oligomerizan y forman grandes complejos que reclutan adaptadores intracelulares para activar diferentes cascadas de señalización intracelular (Newton y Dixit, 2012). Genéricamente los PRR activados envían señales a moléculas adaptadoras que, a su vez, actúan como mensajeros para activar kinasas y factores de transcripción que translocan al núcleo para inducir la expresión de genes involucrados en la defensa del hospedador y en inflamación (Beutler, 2009; Blasius y Beutler, 2010; Kawai y Akira, 2010; Kumagai y Akira, 2010; Takeuchi y Akira, 2010). Si bien los PRR activan varios factores de transcripción, la mayoría de las rutas de señalización conducen a la activación de NF- κ B (Ver Recuadro 3) (van Beijnum y cols., 2008; Hansen y cols., 2011). Esencialmente las moléculas efectoras (citoquinas, quimoquinas, enzimas inflamatorias, IFN γ , entre otras) determinan la activación de la inflamación y reclutan las células de la inmunidad adaptativa (Jeong y Lee, 2011; Newton y Dixit, 2012). Dado que los PRR juegan un rol primordial en la iniciación y mantenimiento de la respuesta inmune (Janeway, 1992; Medzhitov y Janeway, 1997; 2002), su regulación por diversos factores es muy importante en el desarrollo de enfermedades inflamatorias crónicas y en la neuroinflamación (Jeong y Lee, 2011).

Recuadro 3: Esquema simplificado de las vías de señalización de los PRR como RAGE y TLR



Modificado de <http://www.invivogen.com>

Existen distintos PRR descritos en la bibliografía. Entre los más comunes se encuentran los receptores tipo *Toll* (TLR, del inglés *Toll Like Receptors*) y RAGE. La estimulación de RAGE induce la activación de NF-κB por activación de MAPK (Erk1/2 y p38). Así RAGE puede tanto iniciar como perpetuar la respuesta inflamatoria (van Beijnum y cols., 2008).

Los receptores TLR, a excepción del TLR3, señalizan en una forma común que involucra el reclutamiento del adaptador MyD88, para luego activar miembros de la familia IRAK que, después de sucesivas fosforilaciones, activan el complejo IKK encargado de la fosforilación de IκB que permite su degradación proteosomal y la activación de NF-κB (Marsh y cols., 2009).

Activación de la inmunidad innata en el SNC

Históricamente el SNC fue considerado un sitio *inmunoprivilegiado* por encontrarse detrás de la barrera hematoencefálica (BHE) y relativamente poco expuesto a patógenos. Sin embargo en los últimos años, distintos trabajos mostraron que el SNC también puede montar una respuesta inmune innata a DAMP en ausencia de infección (Nguyen y cols., 2002; Galea y cols., 2007). Los PRR se expresan en células inmunes y no inmunes del SNC (Gasque y cols., 2000), especialmente en la microglía y los astrocitos. Las células de la glía responden a la injuria con un fenómeno conocido como gliosis reactiva, que puede contribuir a la sobrevida neuronal secretando factores neurotróficos o bien inducir muerte neuronal por la liberación de moléculas

proinflamatorias. Si bien no están claros los mecanismos que determinan la prevalencia de las funciones benéficas o perjudiciales para la supervivencia neuronal, se ha planteado la participación de los PRR en el establecimiento de la respuesta inicial de gliosis reactiva que promueve la inflamación capaz de cambiar el perfil protector de la astrogliosis hacia un perfil proinflamatorio inductor de neurodegeneración (Zamanian y cols., 2012).

Si bien la microglía es el tipo celular fundamental para la respuesta inmune del SNC, los astrocitos podrían ser las células más estratégicas para la iniciación y progresión de las funciones inmunes innatas en el SNC debido a su rápida respuesta luego del daño tisular y su capacidad de participar de las respuestas inmunitarias en forma facultativa de acuerdo al nivel de la lesión (Dong y Benveniste, 2001; Elward y Gasque, 2003). Muchos estudios indican que los astrocitos reactivos (junto con la microglía activada) y sus productos de secreción pueden tener acciones neuroprotectoras (Farina y cols., 2007) o bien inducir neuroinflamación y neurodegeneración (Zamanian y cols., 2012). Además, los astrocitos expresan algunos PRR fundamentales en el reconocimiento de agentes infecciosos y señales de daño endógenas. Por otra parte, se ha demostrado que el rol de los astrocitos en la regulación de la neuroinflamación depende de la vía de señalización de NF- κ B (Brambilla y cols., 2005; van Loo y cols., 2006).

Está claro que la activación de la inmunidad innata en el SNC induce neuroinflamación luego de lesiones agudas como la isquemia cerebral, la lesión traumática, convulsiones epilépticas, entre otras. Sin embargo, es poco lo que se conoce acerca de la activación de estas respuestas en patologías crónicas del SNC como la AS, aunque es probable que la activación de la inmunidad innata en forma crónica induzca un estado proinflamatorio en el SNC que induce secundariamente una mayor neurodegeneración. Precisamente esta tesis versará sobre el estudio de la activación de la inmunidad innata en la AS y las posibilidades de controlar esta respuesta para mejorar la supervivencia neuronal en estas condiciones.

S100B y su receptor RAGE como activadores de la inmunidad innata

S100B fue el primer miembro de la familia de proteínas S100 que se identificó. Esta proteína es abundante en el cerebro donde se localiza especialmente en los astrocitos (Donato, 2001; Donato y cols., 2009). S100B tiene múltiples funciones regulatorias intracelulares fundamentalmente por su capacidad de unir Ca^{2+} y así contribuir a regular sus concentraciones intracelulares. Algunas de las funciones de la S100B intracelular incluyen además de la participación en la homeostasis de Ca^{2+} , la regulación de la actividad enzimática, la fosforilación de proteínas, el metabolismo energético, la dinámica de los componentes del citoesqueleto y la morfología, migración, proliferación y diferenciación celular, (Donato y cols., 2009; Sorci y cols., 2010).

La expresión y secreción de S100B aumentan significativamente en la gliosis reactiva (Donato, 2003; Ramos y cols., 2004). La liberación de S100B ocurre por una vía no clásica de secreción y es controlada por los niveles de Ca^{2+} , pudiendo ser regulada por diversos factores y condiciones incluyendo el *stress* celular, exposición a glutamato o $\text{TNF-}\alpha$ (Donato y cols., 2009). La presencia de S100B en el líquido cefalorraquídeo y sangre periférica es utilizada con fines diagnósticos y pronósticos de daño cerebral luego de la isquemia o injuria traumática cerebral (Sen y Belli, 2007). En los últimos años se comenzó a aceptar que la secreción aumentada de S100B luego de la injuria le permitiría actuar como DAMP (Sorci y cols., 2010). En ese marco, la secreción activa por parte de astrocitos reactivos o la secreción pasiva desde astrocitos en necrosis en las áreas de lesión cerebral le permitirían a S100B convertirse en una señal activadora de la inmunidad innata.

La concentración extracelular de S100B en el tejido sano, en ausencia de lesión, se estima del orden nanomolar. Frente al daño o necrosis de astrocitos, la concentración de S100B puede ser de varios órdenes de magnitud mayor debido a una combinación dada por liberación pasiva de la proteína intracelular, *clearance* defectuoso de la proteína extracelular como consecuencia de inflamación, formación de oligómeros de S100B inducida por Ca^{2+} y adhesión de los oligómeros a la matriz extracelular (Ma y cols., 2007; Ostendorp y cols., 2007). En estas condiciones S100B se comportaría como DAMP (Sorci y cols., 2010).

S100B, luego de ser secretada al espacio extracelular, también actúa como señal de comunicación entre células de la glía y neuronas. Ensayos *in vitro* realizados por diferentes grupos de trabajo, incluyendo el nuestro, han demostrado que S100B tiene efectos duales como factor neurotrófico o neurotóxico dependiendo de la concentración alcanzada en el medio extracelular. Mientras dosis del orden nanomolar (nM) son neurotróficas, dosis mayores de orden micromolar (μM) tienen efectos neurotóxicos (Van Eldik y Wainwright, 2003; Villarreal y cols., 2011). S100B en altas dosis causa apoptosis neuronal tanto por vía de acción directa sobre las neuronas (Hu y cols., 1997; Villarreal y cols., 2011) como por estimulación de la liberación de óxido nítrico (NO, del inglés *nitric oxide*) desde los astrocitos (Fanò y cols., 1993). Por otro lado, bajas dosis de S100B (del orden nM) protegen las neuronas de estímulos apoptóticos (Huttunen y cols., 2000; Businaro y cols., 2006) y de la excitotoxicidad por glutamato (Ahlemeyer y cols., 2000; Villarreal y cols., 2011), como también aumentan la extensión de neuritas (Winningham-Major y cols., 1989; Van Eldik y cols., 1991; Bhattacharyya y cols., 1992; Ueda y cols., 1995; Nishi y cols., 1996; Haglid y cols., 1997), estimulan la proliferación astrocitaria (Selinfreud y cols., 1991) e inducen neurogénesis (Kleindienst y cols., 2005; Kleindienst y Bullock, 2006). Se ha propuesto que el efecto protector de S100B sobre las neuronas podría ser indirecto, por estimulación de astrocitos a captar glutamato (Tramontina y cols., 2006) y reducción de la activación por neurotoxinas de astrocitos y microglía (Reali y cols., 2005). Sin embargo, nuestro laboratorio demostró en cultivos puros de neuronas corticales que S100B facilita la supervivencia neuronal frente al *stress* excitotóxico por una vía dependiente del receptor para productos avanzados de glicosilación (RAGE, del inglés *Receptor for Advanced Glycation Endproducts*) y su efector NF- κ B (Villarreal y cols., 2011). La exposición a niveles altos de S100B induce la activación de astrocitos y microglía hacia un perfil proinflamatorio con aumento de la actividad de iNOS y secreción de interleuquinas proinflamatorias, lo que muestra su participación en la neuroinflamación (Hu y cols., 1996; Lam y cols., 2001; Bianchi y cols., 2007; 2008; Ponath y cols., 2007).

Una vez en el espacio extracelular, S100B interacciona con el receptor RAGE para transducir sus efectos (Huttunen y cols., 2002; Donato, 2007). Este receptor es un

PRR ampliamente conocido por su papel en la propagación de la inflamación en la diabetes donde se lo ha señalado como el principal responsable de la neuropatía diabética y otras complicaciones vasculares asociadas a esta enfermedad (Yonekura y cols., 2005; Soro-Paavonen y cols., 2008) debido a su capacidad de ser activado por los productos avanzados de glicosilación (AGEs, del inglés *Advanced Glycation Endproducts*). Sin embargo, gracias a su capacidad multiligando, RAGE es un PRR que no sólo interacciona con S100B, sino también con otras moléculas que incluyen anfoterina o HMGB1, y péptido β -amiloide (Hori y cols., 1995; Yan y cols., 1996; Hofmann y cols., 1999).

La activación de RAGE promueve su propia expresión, sugiriendo una función del receptor como factor de propagación y perpetuación de una señal de liberación de DAMP local (Chavakis y cols., 2004; Bopp y cols., 2008; Villarreal y cols., 2011). En el cerebro RAGE se expresa constitutivamente durante el desarrollo para luego volverse indetectable en el cerebro adulto (Rong y cols., 2005). La injuria cerebral induce la reexpresión de RAGE, especialmente en neuronas y en menor medida en células de la glía (Ma y cols., 2003; Ponath y cols., 2007; Villarreal y cols., 2010). En nuestro laboratorio hemos obtenido resultados que demuestran que la reexpresión de este receptor en neuronas se induce por excitotoxicidad por glutamato, por la exposición a un medio hipoosmolar o por la exposición a niveles aumentados de su ligando S100B en concentraciones compatibles con su rol como DAMP (Villarreal y cols., 2011). Las neuronas que expresan RAGE se vuelven más sensibles al efecto dual de las diferentes concentraciones de S100B adicionada al medio de cultivo (Villarreal y cols., 2011). Los efectos duales de S100B (pro-sobrevida y extensión de neuritas o inducción de muerte neuronal) son dosis dependiente y resultan bloqueados por anticuerpos neutralizantes de RAGE (Villarreal y cols., 2011).

En resumen, los efectos de S100B la señalan como DAMP, ésto es, un factor liberado desde células necróticas o dañadas capaz de activar células de respuesta inmune innata (como astrocitos y microglía), que participan en la respuesta inflamatoria. Así, S100B puede ser considerada como DAMP teniendo en cuenta que su acumulación en el espacio extracelular contribuye a la respuesta inflamatoria como ligando activador del PRR RAGE y como factor capaz de sobre-regular la expresión de

este mismo receptor en las células reactivas (Sorci y cols., 2010; Villarreal y cols., 2013). Por otro lado, la proteína S100B se secreta activamente por un mecanismo independiente de la vía clásica del aparato de Golgi (Rammes y cols., 1997). Este modo de secreción es típico de los factores DAMP que poseen un rol en la homeostasis, como moléculas intracelulares, pero que pueden convertirse en señales proinflamatorias luego de su liberación al espacio extracelular dada por daño, infección o inflamación (Yang y cols., 2005).

La activación de RAGE por sus ligandos estimula la señalización mediada por el factor de transcripción NF- κ B (Bierhaus y cols., 2005; Wang y cols., 2008; Villarreal y cols., 2011), involucrado en la activación de genes asociados a sobrevida o muerte celular y genes relacionados a la respuesta inflamatoria (Chen y Greene, 2003). A nivel del sistema nervioso, la activación de NF- κ B por diferentes cascadas de señalización ha sido implicada en la regulación de diversas funciones celulares y aun no está claro la prevalencia de efectos de inducción de sobrevida o muerte neuronal (Gutierrez y cols., 2005; Mémet, 2006). Se ha propuesto que la sobreexpresión de COX-2, IL-1 β y TNF- α inducidos por el sistema S100B-RAGE requieren la activación de NF- κ B (Bianchi y cols., 2010), en concordancia con sus roles como DAMP-PRR. En nuestro laboratorio hemos demostrado que la sobreactivación de RAGE por niveles tipo DAMP de S100B modifica el estado de fosforilación de la subunidad p65 NF- κ B y ello es fundamental para controlar la activación de NF- κ B, lo que en definitiva determina la sobrevida o muerte neuronal (Villarreal y cols., 2011). Por otra parte, en astrocitos la interacción de RAGE con S100B induce la activación de NF- κ B que tiene, en este tipo celular, un papel importante en la conversión hacia el fenotipo proinflamatorio que induce secundariamente neurodegeneración (Villarreal y cols., 2013; Zamanian y cols., 2012). Así mismo, los astrocitos se vuelven reactivos *in vitro* cuando son expuestos a niveles de S100B compatibles con su rol como DAMP, un efecto que requiere RAGE y diferentes rutas de señalización incluyendo NF- κ B, Erk1/2, Akt y pequeñas RhoGTPasas (Villarreal y cols., 2013).

Modelos experimentales de AS

Hasta la actualidad no se han identificado animales que desarrollen AS espontáneamente. La gran mayoría de los modelos animales de AS se basan en la HI. En estos modelos, los animales de experimentación son sometidos durante el período de sueño a atmósferas con concentraciones de oxígeno oscilantes. Estas oscilaciones pueden tener una duración desde segundos hasta minutos y las concentraciones de oxígeno del período hipóxico pueden descender hasta valores de entre el 4% y el 10%. Los animales usualmente son expuestos a la HI por 6-12 horas diarias durante varios días (Gozal y cols., 2001; Avilés Reyes, Angelo y cols., 2010; Reinke y cols., 2011; Wang y cols., 2011). Otros modelos utilizan máscaras nasales para lograr que el animal respire la concentración de oxígeno deseada, una estrategia más controlada pero altamente invasiva (Almendros y cols., 2011). Unos pocos autores han utilizado dispositivos que sujetan la cabeza del animal en posiciones que dificultan la respiración y benefician la apnea (Neuzeret y cols., 2011). Existen también modelos de AS que se basan en la fragmentación de sueño donde la base de la jaula del animal es movida periódicamente con el objetivo de evitar el sueño continuo (Mc Kenna y cols., 2007; Ward y cols., 2009; Nair y cols., 2011).

Los modelos celulares de HI aún no se han desarrollado ampliamente. La dificultad para establecer este tipo de modelos radica en la obtención de ciclos intracelulares de oxígeno rápidos teniendo en cuenta la inercia dada por la disolución de los gases en el medio de cultivo, la ausencia prácticamente de matriz extracelular y de hemoglobina como transportador de los gases (Baumgardner y Otto, 2003). Sin embargo, algunos grupos han desarrollado modelos *in vitro* que consisten en exponer cultivos celulares, que pueden ser de distintos tipos, a ciclos de HI que duran desde segundos hasta varios minutos y durante los cuales la concentración de oxígeno del período hipóxico desciende hasta 0,1-1,5% (Kumar y cols., 2003; Yuan y cols., 2004; Ryan y cols., 2005; Shan y cols., 2007).

Dada la gran variedad de modelos animales de AS por HI, durante el desarrollo de esta tesis se trabajó con 5 ciclos por hora ya que este número es el mínimo de eventos que requiere la definición clínica de AS. Durante la caracterización y puesta a punto del modelo se probaron distintos tiempos de exposición a HI (1, 3, 5 y 10 días)

(Avilés Reyes, Angelo y cols., 2010). Luego, para los estudios de la vía de señalización implicada en las alteraciones observadas se optó por trabajar con 3 días de exposición, ya que en este período se observó el mayor daño neuronal (ver secciones Materiales y métodos y Resultados).

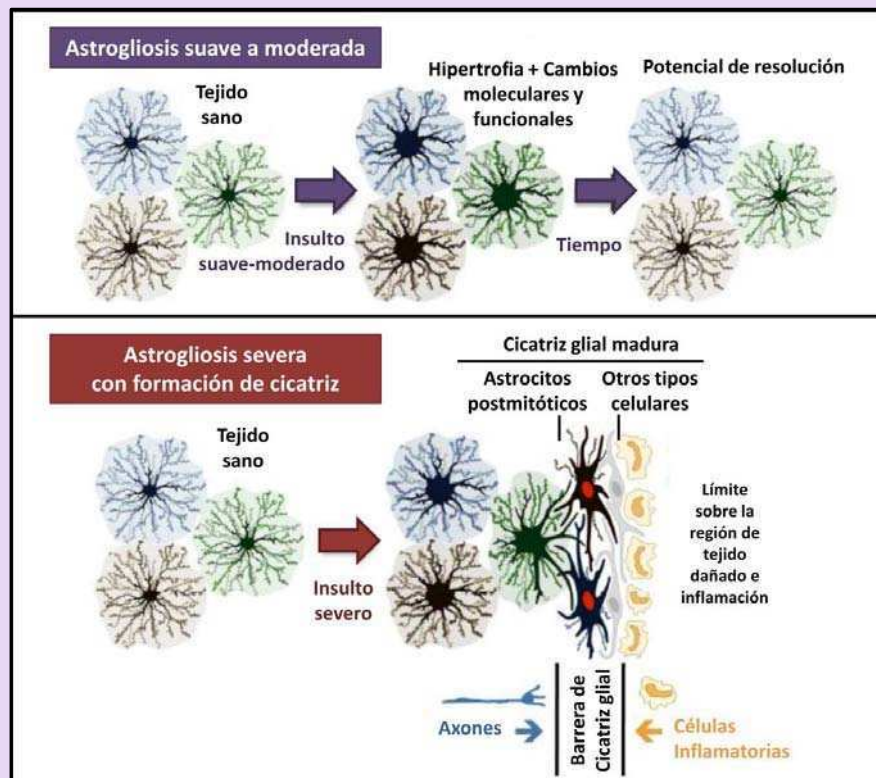
En el caso de la exposición a HI de cultivos celulares se ha trabajado siguiendo el modelo utilizado en la literatura para investigar los efectos de la HI sobre las células del sistema nervioso (Shan y cols., 2007). Se ha optado por trabajar con 8 horas de HI ya que en este tiempo de exposición se evidenció un aumento de marcadores de *stress* oxidativo comparable al de 3 días de HI *in vivo* (ver secciones Materiales y Métodos y Resultados).

Alteraciones inducidas por la HI en el SNC

Los resultados descriptos a continuación fueron obtenidos en el laboratorio utilizando el modelo de AS por HI y se publicaron parcialmente en Avilés Reyes, Angelo y cols. (2010).

- **La exposición a HI induce gliosis reactiva y alteraciones neuronales**

Se ha descrito que en la hipoxia, la alteración en la provisión de oxígeno afecta a astrocitos y neuronas por igual. Esta situación de *stress* celular induce en los astrocitos una gliosis reactiva, con pérdida de dominios astrocitarios (Ver recuadro 4) y secreción de citoquinas y moléculas solubles como S100B entre otras (Donato, 2007; Sofroniew, 2009). De acuerdo a resultados de nuestro laboratorio, la HI también induce gliosis reactiva, entendida como aumento en el número de astrocitos, en la longitud de las prolongaciones y tamaño de los somas (Avilés Reyes, Angelo y cols., 2010).

Recuadro 4: **Dominios astrocitarios y gliosis reactiva**

Modificado de Sofroniew, 2009

Los astrocitos responden a todas las formas de injuria mediante un proceso característico denominado gliosis reactiva. Este proceso involucra cambios en la expresión de un gran número de genes y altera la morfología (Eddleston y Mucke, 1993; Correa-Cerro y Mandell, 2007; Sofroniew, 2009). Los astrocitos reactivos ejercen efectos beneficiosos y tienen un amplio espectro de respuestas a los insultos al SNC, de las cuales la formación de la cicatriz glial es sólo una opción que se encuentra en el extremo del espectro (Sofroniew, 2009). Así, la gliosis reactiva no es un proceso “todo o nada”, sino que es un proceso gradual que en sus formas leve y moderada tiene un potencial de resolución por el cual las células vuelven a la apariencia del tejido sano (Sofroniew, 2009).

En el tejido sano las prolongaciones de los astrocitos ocupan dominios contiguos no superpuestos (Bushong y cols., 2002; Sofroniew, 2009). En la gliosis reactiva de suave a moderada, los dominios se conservan a pesar de la hipertrofia astrocitaria (Wilhelmsson y cols., 2006; Sofroniew, 2009). En el caso extremo de activación la gliosis involucra formación de cicatriz glial incorporando células recién divididas y los astrocitos superponen sus dominios (Bush y cols., 1999; Faulkner y cols., 2004; Hermann y cols., 2008; Sofroniew, 2009).

En cuanto a las alteraciones neuronales, el modelo de HI utilizado en nuestro laboratorio induce marcación anormal para NeuN con redistribución de esta proteína al citoplasma en las neuronas de la corteza cerebral y en el área CA1 del hipocampo (Figura 1a). Estas alteraciones resultan más importantes luego de 3 días de exposición a HI y luego (5 y 10 días) decaen (Avilés Reyes, Angelo y cols., 2010). La sensibilidad de

las dendritas al *stress* neuronal ha sido descrita previamente y se reportaron alteraciones morfológicas inducidas por condiciones hipóxicas subletales (Park y cols., 1996). Nuestro modelo de HI, luego de 3 días de exposición, induce un acortamiento de las dendritas MAP-2+ de las neuronas del área CA1 del hipocampo acompañado por la presencia de unas estructuras redondeadas en las mismas que se han descrito como cuentas de collar (Park y cols., 1996). Sin embargo, al aumentar los días de exposición a HI también las dendritas recuperan su morfología e incluso superan la longitud normal (Figura 1b). Las alteraciones morfológicas en los neurofilamentos de 200 kDa (Nf200) también se relacionan a procesos neurodegenerativos (Julien y Mushynski, 1998; Ramos y cols., 2000). En nuestro modelo de HI se inducen alteraciones similares a las que presenta MAP-2, mostrando en los animales expuestos a 3 y 5 días de HI, un aumento en el número de alteraciones del citoesqueleto neuronal y una reducción en la longitud de las prolongaciones, especialmente en las dendritas apicales de las neuronas piramidales de la corteza y en las dendritas del *stratum radiatum* del área CA1 del hipocampo (Avilés Reyes, Angelo y cols., 2010). Por otra parte, la expresión de los neurofilamentos livianos de 68 kDa (Nf68) es baja pero puede ser aumentada en procesos que involucran remodelado y plasticidad (Ramos y cols., 2000; Craveiro y cols., 2008). Nuestro modelo de HI, induce expresión de Nf68 solamente en los animales expuestos a 5 días de HI (Avilés Reyes, Angelo y cols., 2010).

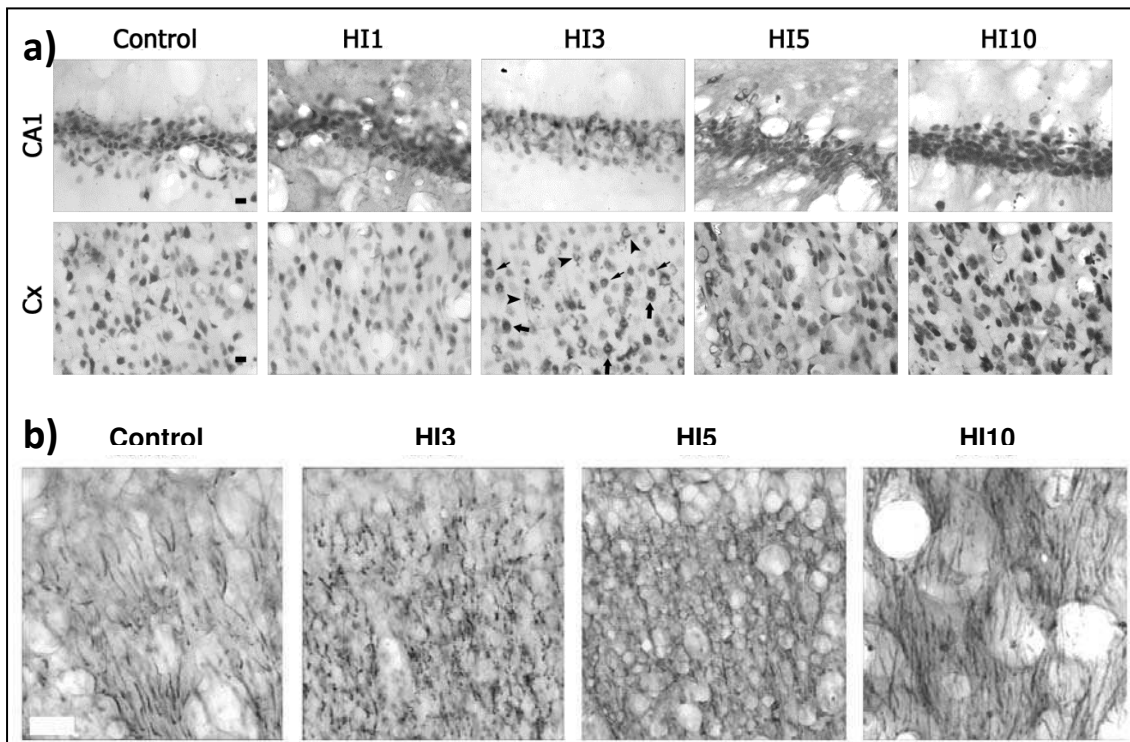


Figura 1: a) Las imágenes muestran la inmunomarcación para NeuN de núcleos normales (flechas finas) en el área CA1 del hipocampo y la corteza (Cx). Especialmente en animales expuestos a HI se observa marcación de NeuN citoplasmática (flechas gruesas) y esponjiforme atípicas (cabeza de flechas). Barra de escala = 10 μ m. **b)** Inmunohistoquímica para MAP-2 en el área CA1 del hipocampo (*stratum radiatum*) mostrando la disminución en la longitud dendrítica en el grupo HI3 y la recuperación en HI5 y HI10. Barra de escala = 10 μ m. Modificado de Avilés Reyes, Angelo y cols., 2010.

- **La HI induce expresión de RAGE, sobreexpresión de S100B y activación de NF- κ B.**

La secreción de S100B en condiciones de hipoxia ha sido descrita ampliamente (Donato, 2007; Sofroniew, 2009). La HI en todos los tiempos estudiados en nuestro laboratorio (1, 3, 5 y 10 días) induce una sobreexpresión de este DAMP en astrocitos tanto corticales como hipocampales (Figura 2) (Avilés Reyes, Angelo y cols., 2010). Hasta la actualidad, el único receptor identificado para S100B es RAGE cuya expresión no es detectable en el SNC adulto pero puede reinducirse frente una injuria. Esta reinducción ocurre en corteza e hipocampo luego de 1 y 3 días de exposición al modelo de HI (Figura 3) utilizado en nuestro laboratorio (Avilés Reyes, Angelo y cols., 2010). A tiempos mayores de exposición a HI la reexpresión de RAGE persiste aunque en niveles significativamente menores. De la misma manera, la exposición a 3 días de HI induce activación de NF- κ B en ratones reportadores de la actividad de este factor de transcripción, pero a tiempos mayores de exposición esta activación vuelve a su nivel basal (Figura 4).

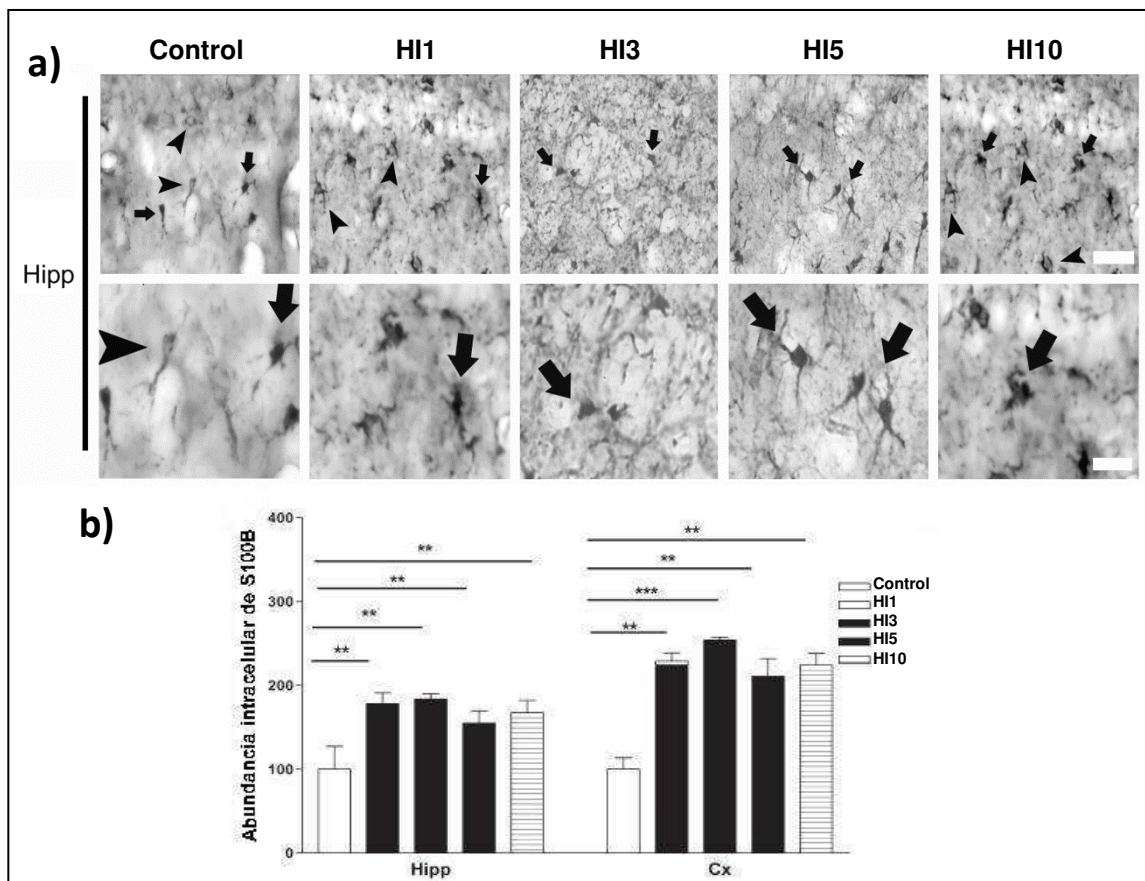


Figura 2: a) Fotografías representativas de la inmunomarcación para S100B en hipocampo mostrando las diferentes poblaciones de astrocitos presentes en los animales expuestos a HI con citoplasma S100B+ claro (punta de flecha) y oscuro (flecha). Barra de escala = 20µm (primera y última fila); = 10µm (fila media). b) Análisis cuantitativo de la intensidad de la inmunomarcación para S100B expresada como porcentaje de densidad óptica con respecto al grupo control en hipocampo (Hipp) y corteza cerebral (Cx). Los gráficos representan la media y la SEM del parámetro indicado. La significancia entre tratamientos fue evaluada por ANOVA de una vía y post-test de Student-Newman-Keuls, ***p<0,001; **p<0,01. Modificado de Avilés Reyes, Angelo y cols., 2010.

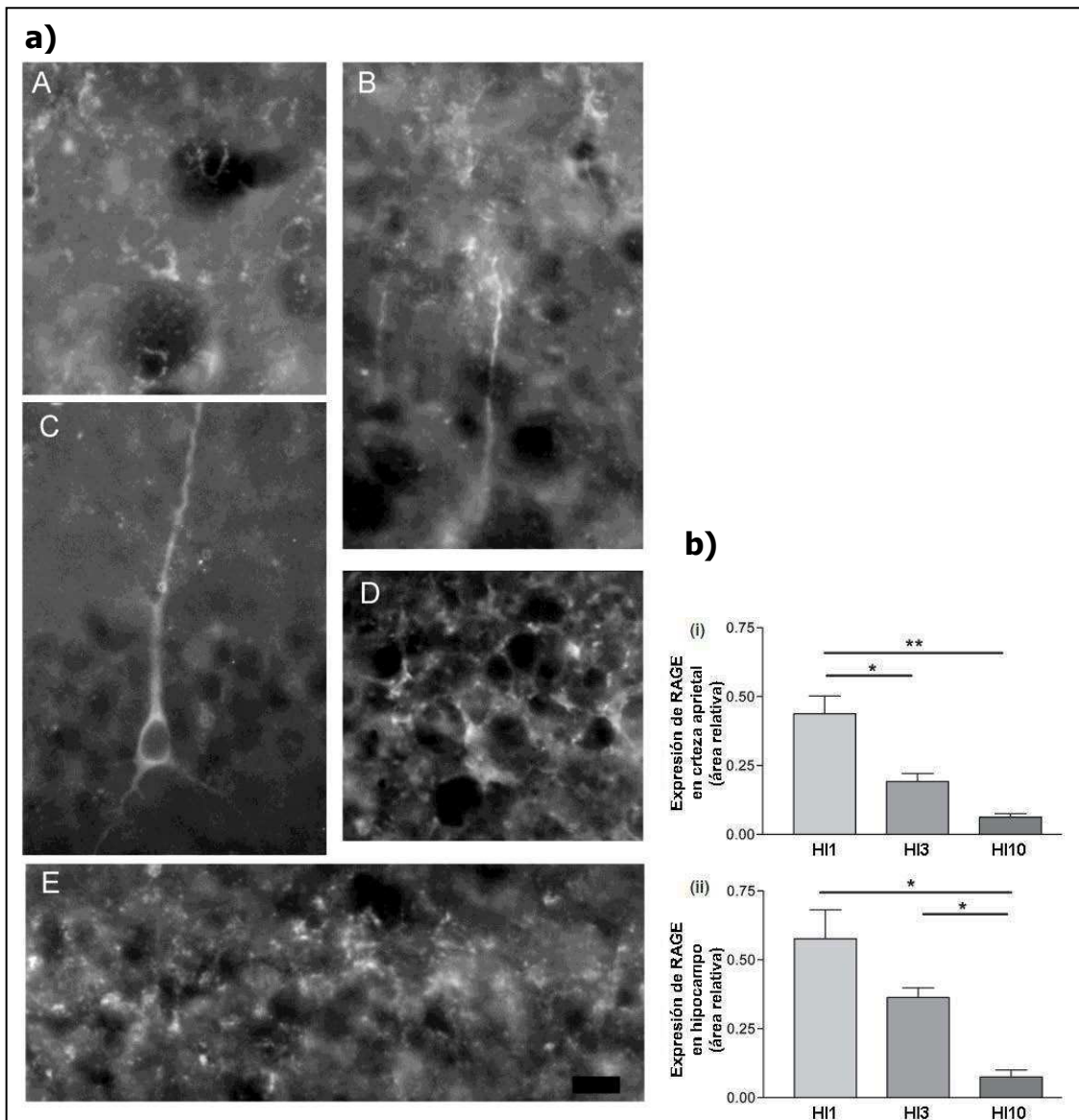


Figura 3: **a)** La expresión de RAGE fue detectada en neuronas corticales (A, B) y del área CA1 del hipocampo (C, D, E) en animales expuestos a HI pero no en animales del grupo control. Barra de escala=10 μ m. **b)** Análisis cuantitativo de la expresión de RAGE en corteza y área CA1 del hipocampo mostrando el área relativa ocupada por cuerpos y proyecciones neuronales RAGE+. El área RAGE+ fue relativizada al área total del campo en las secciones corticales y al área total de la capa de células piramidales de la región CA1 del hipocampo. Los gráficos representan la media del parámetro indicado, las barras de error representan la SEM. La significancia entre tratamientos fue evaluada por ANOVA de una vía y se realizó el post-test de Student-Newman-Keuls, ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$. Modificado de Avilés Reyes, Angelo y cols., 2010.

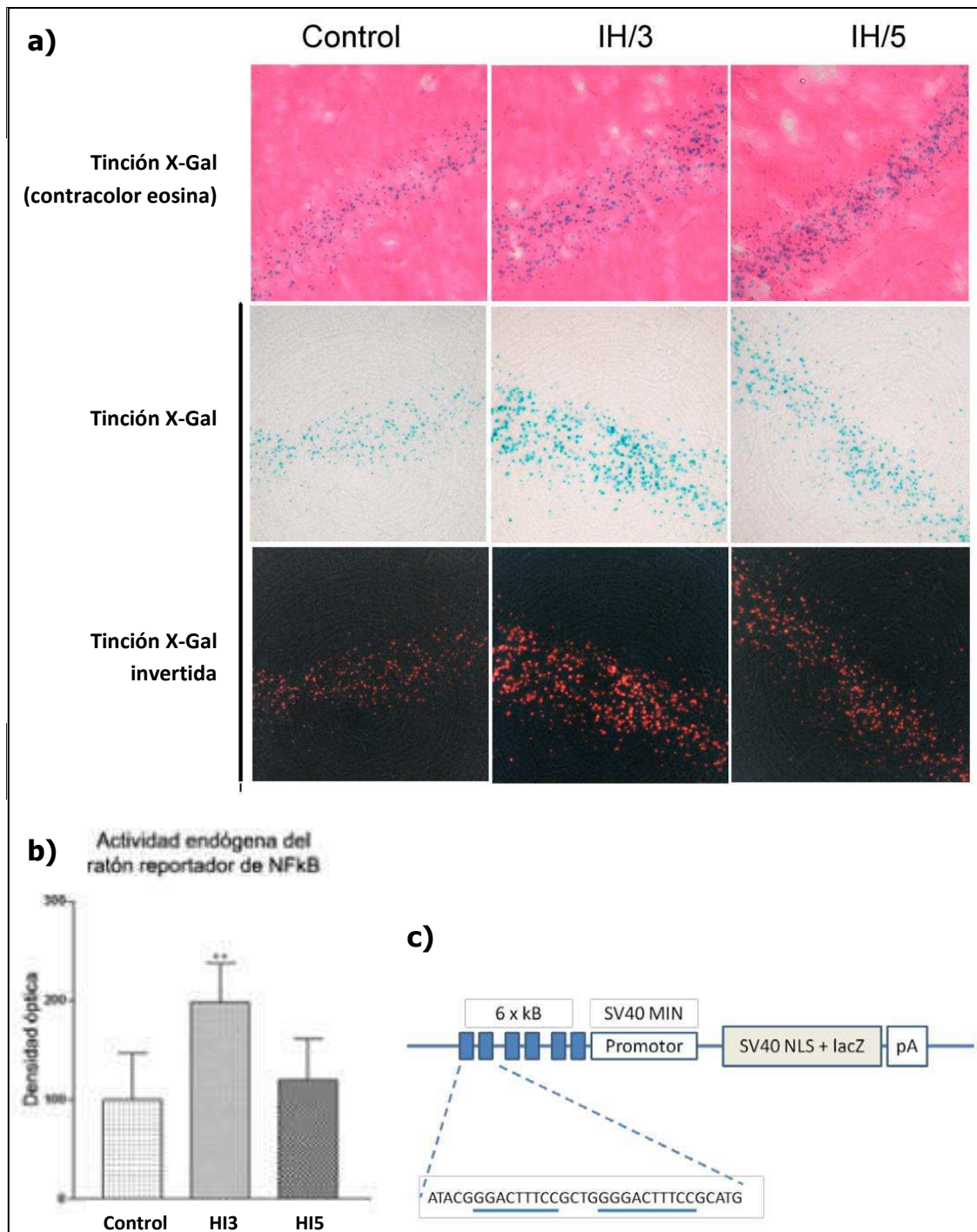


Figura 4: **a)** Las fotomicrografías muestran la tinción histoquímica para la enzima β -galactosidasa (LacZ) en los animales transgénicos reportadores de la actividad endógena del factor de transcripción NF- κ B. **b)** El gráfico de barras representa la medición de la densidad óptica relativa de la tinción en la región CA-1 del hipocampo. Magnificación primaria 20x. Los datos de los gráficos representan la media de este parámetro en cada condición, las barras de error representan el SEM; la significancia entre los tratamientos fue evaluada por el test de ANOVA de una vía y el post test de Student Newman-Keuls. ** $p < 0,01$. **c)** Construcción utilizada por Bhakar y cols. (2002), para la producción del ratón transgénico de NF- κ B de alta fidelidad; que es reportador de la actividad endógena de este factor de transcripción.

Hipótesis y Objetivos

El objetivo general de este plan de trabajo es estudiar los mecanismos que controlan la sobrevida neuronal en un modelo experimental de Apnea del Sueño (AS). En particular nos enfocamos en la participación del receptor de RAGE en la interacción neuro-glial (*crosstalk*) que tiene lugar entre astrocitos y neuronas en estas condiciones patológicas.

Nuestra hipótesis de trabajo propone que la interacción entre el receptor RAGE y su ligando S100B tendría un papel fundamental en la determinación de la sobrevida neuronal en el modelo experimental de AS por hipoxia intermitente (HI). Probablemente la interacción RAGE-S100B induciría, a través de cascadas intracelulares, la activación del factor de transcripción NF- κ B, ampliamente reconocido por su capacidad de inducir sobrevida o muerte celular de acuerdo a los genes blanco que activa.

En el presente trabajo se propusieron los siguientes objetivos específicos:

- Estudiar la expresión de RAGE y activación de su efector NF- κ B en el modelo de AS por HI *in vivo* desarrollado en el laboratorio.
- Desarrollar un modelo de HI *in vitro* en cultivos celulares primarios de hipocampo, conteniendo células de la glía y neuronas, que correlacione con el modelo *in vivo* de AS por HI en animales de experimentación que ha sido utilizado en el laboratorio.
- Evaluar la producción de ROS en los modelos experimentales tanto *in vivo* como *in vitro*.
- Describir las alteraciones morfológicas en neuronas y células de la glía inducidas por la exposición de los cultivos celulares al modelo de HI.
- Evaluar la expresión de RAGE, activación de NF- κ B y de HIF-1 en el modelo experimental de HI *in vitro*.
- Estudiar, con paradigmas de ganancia y pérdida de función, la participación de la vía de señalización S100B/RAGE/NF- κ B en las alteraciones inducidas por el modelo de HI *in vitro* y el modelo en animales de experimentación de AS por HI. Establecer algunos posibles blancos moleculares para estrategias terapéuticas.

Materiales y Métodos

Animales

Se utilizaron ratas machos de la cepa Wistar (250-300g) del Bioterio de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad de Buenos Aires. Los animales fueron mantenidos en un ambiente de humedad y temperaturas controladas. Su manejo y exposición al protocolo experimental fue realizado bajo las normas y protocolos aprobados por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL) de la Facultad de Medicina de la Universidad de Buenos Aires. Estos protocolos se desarrollan de acuerdo a las normas para uso y cuidado de animales de experimentación de los Institutos Nacionales de Salud de los Estados Unidos de Norteamérica (NIH) y a las recomendaciones de la *Society for Neuroscience* (SfN).

Exposición de los animales a hipoxia intermitente

Durante su fase de sueño, los animales fueron expuestos a hipoxia intermitente (HI) en una cámara conectada a un sistema de doble válvula para poder alternar la provisión de gas desde una bomba que inyecta aire normal (21% O_2 ; 79% N_2) y desde un tubo de nitrógeno (N_2). La concentración de oxígeno (O_2) en la cámara se midió continuamente con un oxímetro electrónico en tiempo real (Oxym) y se regularon manualmente los flujos de aire y N_2 para mantener una concentración normal de O_2 (21%) o hipóxica (10%). Los ciclos de HI fueron compuestos por 6 minutos de hipoxia alternados con igual tiempo de normoxia por 8 horas diarias durante 1, 3, 5, y 10 días (Figura 5). Las ratas del grupo control fueron expuestas a una concentración de O_2 normal durante el mismo tiempo. Para los ensayos de pérdida de función *in vivo* se expusieron los animales a 3 días de HI, ya que a ese tiempo se detectaron los mayores niveles de neurodegeneración y una importante gliosis reactiva (Avilés Reyes, Angelo y cols., 2010).

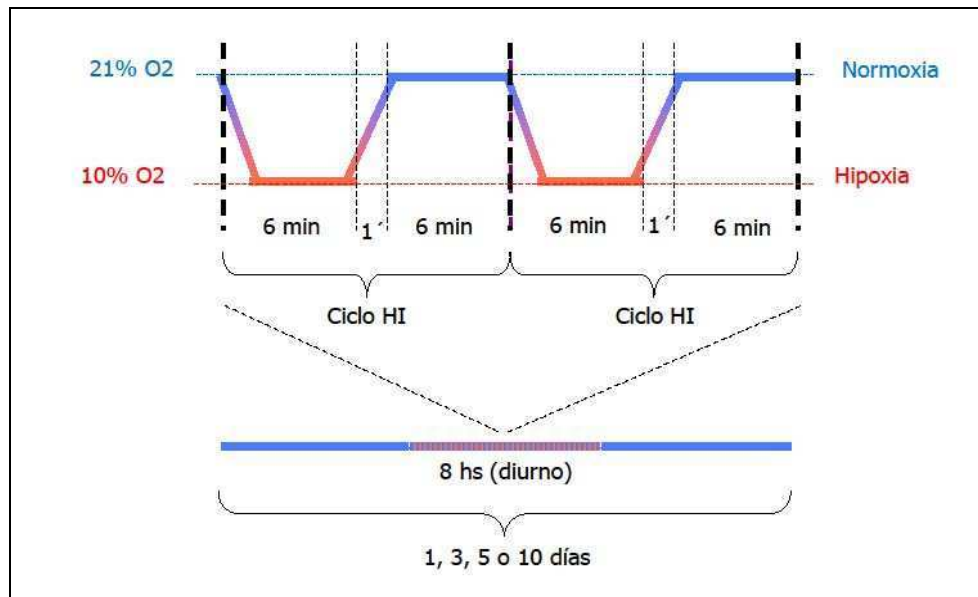


Figura 5: Esquema representativo de la exposición *in vivo* a ciclos de HI.

Para verificar la efectividad del modelo, la saturación de oxígeno en la hemoglobina (SpO_2) de las ratas fue monitoreada *in vivo* con un oxímetro de pulso adaptado para la medición en ratas.

El modelo desarrollado en el laboratorio brinda el mínimo de ciclos por hora necesarios para ser considerado una Apnea del Sueño de acuerdo a su definición clínica (Basner, 2007; Lavie, 2012).

Implantación de cánulas intracerebrales

Con el objeto de realizar los ensayos de pérdida de función bloqueando la vía de señalización S100B/RAGE/NF- κ B *in vivo* en las zonas cerebrales más afectadas por la HI (Xu y cols., 2004; Maiti y cols., 2007), los animales fueron sometidos a cirugía estereotáxica. Para ello, cada animal fue anestesiado con ketamina-xilazina (90mg/kg-10mg/kg) y posteriormente colocado en un marco estereotáxico para inmovilizar la cabeza. La piel, el músculo y la fascia fueron cortados con bisturí hasta exponer el cráneo. Se trepanó una abertura (2mm x 2mm aproximadamente) en el hueso parietal según las coordenadas AP: -4.3 y LL: ± 3.0 del atlas de Paxinos y Watson (2007), a través de la cual se colocó una cánula intracerebral hasta la región dorsal del hipocampo (coordenada DV: -1.4 atlas de Paxinos y Watson, 2007, respectivamente)

(Slipczuk y cols., 2009). Una vez colocadas las cánulas fueron fijadas con acrílico autocurable (Subiton, Laboratorios SL S.A.) y los animales retirados del marco estereotáxico para su recuperación. Estos animales se dejaron recuperar en jaulas individuales durante las primeras 24h post-cirugía.

Pérdidas de función *in vivo*

Los animales fueron inyectados diariamente, a través de las cánulas implantadas, 15 minutos antes de comenzar la exposición a los ciclos de HI con anticuerpos neutralizantes anti-RAGE o anti-S100B o bien con el bloqueante de la IKK Sulfasalazina (Sfz) que impide la activación de NF- κ B (Ver Figura 6). Los animales del grupo control fueron inyectados con anticuerpos inespecíficos del mismo isotipo o vehículo (para la Sfz). En todos los casos el volumen de inyección fue de 1 μ l. Las dosis de los distintos tratamientos se detallan en la Tabla 1: Dosis de los tratamientos utilizados en animales para los ensayos de pérdida de función *in vivo*.

Protocolo pérdida de función por inyección de bloqueantes							
Día	1	2	3	4	5	6	7
	Canulación	Recuperación		Inyección/HI			Fijación

Figura 6: Cuadro explicativo del protocolo de ensayos de pérdida de función por inyección de bloqueantes de la vía de señalización S100B/RAGE/NF- κ B.

Tratamiento	Dosis
anti-S100B	0,5 μ g/ μ l
anti-RAGE	0,5 μ g/ μ l
Sfz	1,25 mM

Tabla 1: Dosis de los tratamientos utilizados en animales para los ensayos de pérdida de función *in vivo*.

Otro grupo de animales fue inyectado intrahipocampalmente por única vez, 1 o 3 días antes de su fijación o del inicio de la HI (Ver Figura 7) con vectores virales que fueron desarrolladas en el laboratorio para inducir la expresión del receptor RAGE

funcional, una variante deficiente del mismo o una proteína control. A cada animal se le administró un 1µl de la producción conteniendo los vectores virales (Ver Producción de vectores virales en esta misma sección).

Protocolo de Infección						
Día	1	2	3	4	5	6
	Infección	Recuperación	HI			Fijación

Figura 7: Cuadro explicativo del protocolo de infección con vectores virales derivados de HSV.

Fijación de animales por perfusión intracardíaca y obtención de secciones de tejido

Al día siguiente de finalizada la HI, los animales fueron anestesiados con ketamina-xilazina (90mg/kg-10mg/kg). Con el objeto de lavar el sistema circulatorio los animales fueron perfundidos a través del ventrículo izquierdo con 50ml de solución salina conteniendo 5000UI/litro de heparina y luego se perfundieron con solución fijadora de 4% (p/v) de paraformaldehído en *buffer* fosfato 0,1M; pH 7,4. Una vez finalizada la perfusión se disecaron los cerebros y se post-fijaron por inmersión en la misma solución fijadora durante 2-4 hs a 4°C. Pasado ese tiempo, los cerebros se mantuvieron en una solución de 5% (p/v) de sacarosa en *buffer* fosfato 0,1M, pH 7,4 por 18-24 hs para luego ser transferidos a una solución de 30% (p/v) de sacarosa en *buffer* fosfato 0,1M, pH 7,4. Transcurridas 48 hs en esta solución, los cerebros fueron rápidamente congelados a -80°C por 3 hs y luego almacenados a -20°C. Se realizaron cortes de 50µm de espesor en crióstato que fueron preservados a -20°C en solución de fosfato de sodio 0,05M, 30% (v/v) de etilen glicol y 20% (v/v) de glicerol hasta su procesamiento por las técnicas de inmunohistoquímica o inmunofluorescencia.

Procesamiento de cortes histológicos

- **Inmunohistoquímica por flotación**

Las secciones de tejido obtenidas en crióstato a partir de los distintos grupos experimentales fueron procesadas simultáneamente bajo las mismas condiciones. Una

vez seleccionados bajo lupa, los cortes fueron lavados con PBS y luego con agua destilada. Las secciones fueron deshidratadas por pasajes sucesivos en alcoholes de graduación creciente (25°, 50°, 70°, 96° y 100°). Posteriormente la reacción de peroxidasa endógena fue inhibida por incubación en una solución 0,5/ de H₂O₂ en metanol durante 30 minutos en agitación a temperatura ambiente. Las secciones fueron rehidratadas en alcoholes de graduación decreciente (100°, 96°, 70°, 50° y 25°) y agua, y luego fueron permeabilizadas con una solución de Tritón 1/ en PBS durante 30-60 minutos en agitación a temperatura ambiente.

Posteriormente, los cortes fueron incubados para bloquear los sitios inespecíficos durante 30-60 minutos en agitación a temperatura ambiente con una solución conteniendo 3/ (v/v) de suero normal equino u ovino (SNE, SNO) y 0,5/ (v/v) de Tritón en PBS. Luego las secciones fueron incubadas con los anticuerpos primarios diluidos en una solución de 1/ (v/v) de SNE o SNO y 0,3/ (v/v) de tritón en PBS por 5 hs a temperatura ambiente y posteriormente 40-44 hs a 4°C. Los anticuerpos primarios se utilizaron en las concentraciones indicadas en la Tabla 2.

Luego los cortes fueron lavados 3 veces con una solución de 0,025/ (v/v) de Tritón en PBS (PBS-X) e incubados durante 1 hora en agitación a temperatura ambiente con anticuerpos secundarios específicos diluidos 1:500 en solución de 1/ (v/v) de SNE o SNO y 0,3/ (v/v) de tritón en PBS. Luego las secciones fueron lavadas 3 veces con PBS-X e incubadas en agitación por 1 hora a temperatura ambiente con complejo extravidina-peroxidasa diluido 1:500 en una solución de 1/ (v/v) de SNE o SNO y 0,3/ (v/v) de tritón en PBS. Se lavaron los cortes 3 veces con PBS-X y una vez con *buffer* acetato 0,1M pH 5,5.

El revelado de las secciones se llevó a cabo por incubación de las mismas con una solución de diaminobencidina (DAB) 0,035/ (p/v) y sulfato de níquel (II)-amonio 2,5/ (p/v) en *buffer* acetato 0,1M pH 5,5 (solución de DAB-níquel). En cada pocillo de placa *multiwell* donde se incubaron las secciones se agregó 1ml de la solución de DAB-níquel a la que se hizo reaccionar con 3,5 µl de H₂O₂. Luego de reveladas las secciones se detuvo la reacción extrayendo la solución de revelado y por dilución en *buffer* acetato. Posteriormente los cortes fueron montados en portaobjetos de vidrio

previamente gelatinizados y secados a temperatura ambiente hasta el día siguiente que fueron cubiertos con Permout (Bálsamo de Canadá sintético) y cubreobjetos.

Antígeno	Origen	Dilución utilizada	Marca
NeuN	Monoclonal de ratón	1:1000	Chemicon
GFAP	Policlonal de conejo	1:1000 (IHQ); 1:3000 (IF)	DAKO
RAGE	Monoclonal de ratón	1:1000	Chemicon
S100B	Monoclonal de ratón	1:800	Sigma
MAP-2	Policlonal de conejo	1:1000	Millipore
β III-Tubulina	Monoclonal de ratón	1:5000	marca
p65	Policlonal de conejo	1:1000	Santa Cruz
p65 NLS	Monoclonal de ratón	1:1000	Millipore
GFP	Monoclonal de conejo	1:1000	Chemicon
HIF-1 α	Policlonal de ratón	1:1000	Novus Biological

Tabla 2: Origen, dilución empleada y marca de los anticuerpos primarios utilizados para inmunohistoquímica. IHQ: Inmunohistoquímica; IF: Inmunofluorescencia.

- **Inmunofluorescencia por flotación**

Una vez seleccionados como se describió para la técnica de inmunohistoquímica, los cortes de tejido fueron lavados con PBS. Luego, las secciones fueron permeabilizadas en agitación a temperatura ambiente durante 30-60 minutos incubándolas con una solución de 1% (v/v) de tritón en PBS. El bloqueo de los sitios inespecíficos se realizó por incubación en agitación a temperatura ambiente durante 1 hora con una solución de SNE o SNO 10% (v/v) y tritón 0,3% (v/v) en PBS. Posteriormente los cortes fueron incubados en agitación con los anticuerpos primarios diluidos en una solución de 3% (v/v) de SNE o SNO y 0,3% (v/v) de tritón en PBS durante 5-6hs a temperatura ambiente y posteriormente 16-20hs a 4°C. Los anticuerpos primarios fueron utilizados según concentraciones de la Tabla 2.

Luego los cortes fueron lavados 3 veces con PBS-X e incubados durante 4hs a temperatura ambiente con anticuerpos secundarios específicos conjugados con fluoróforos (rodamina o FITC). Los anticuerpos secundarios fueron diluidos 1:800 en

una solución de Tritón 0,3% (v/v) y SNO o SNE 3% (v/v) en PBS. Posteriormente los cortes fueron lavados 3 veces con PBS-X e incubados con una solución 2 µg/ml del colorante fluorescente para DNA Hoechst 33342 durante 30 minutos a temperatura ambiente. Finalmente los cortes fueron lavados 2 veces con PBS, montados en portaobjetos de vidrios y cubiertos con glicerol 30% (v/v) en PBS sellando los cubreobjetos.

Obtención de cultivos primarios mixtos (glía y neuronas)

Los cultivos primarios mixtos fueron obtenidos a partir de ratas cepa Wistar de 3 días postnatal. Se decapitaron los animales y se lavaron las cabezas en alcohol etílico. Inmediatamente se disecaron los cerebros y se los lavó en medio de cultivo DMEM donde los hipocampos fueron disecados. Posteriormente los hipocampos fueron lavados 2 veces con DMEM e incubados por una hora en una solución de 20UI/ml de papaína a 37°C con CO₂ 5%. Luego se reemplazó el medio por DMEM con 1% glutamina, 1% penicilina-estreptomicina y 10% suero fetal bovino (medio completo) y se incubó por 5 minutos para detener la reacción de la papaína y se realizó un lavado con medio completo. A continuación los hipocampos fueron disgregados delicadamente con pipeta tipo Pasteur de vidrio. Una vez disgregadas las células, éstas fueron plaqueadas en placas *multiwell* con abundante medio de cultivo completo y colocadas en estufa por 3 hs. Pasado ese tiempo, el medio de cultivo fue completamente reemplazado por medio fresco. Este proceso se repitió al día siguiente y en lo sucesivo sólo se reemplazó la mitad del medio cada 2-3 días.

Exposición de cultivos primarios mixtos a HI

Luego de 10-11 días *in vitro*, los cultivos primarios mixtos fueron expuestos a HI durante 2, 5, u 8 hs (Figura 8). Los ciclos de HI se realizaron alternando 25 minutos de normoxia (5% CO₂ y 95% aire) y 35 minutos de hipoxia (0.1% O₂, 5% CO₂, nivelado con nitrógeno) (Shan y cols., 2007). Durante los ciclos de normoxia las placas de cultivo fueron ubicadas directamente en la estufa de cultivo celular mientras que para la fase

de hipoxia los cultivos se colocaron en una cámara hipóxica conectada a un tubo de mezcla de gases especial (0.1% O₂, 5% CO₂, nivelado con nitrógeno).

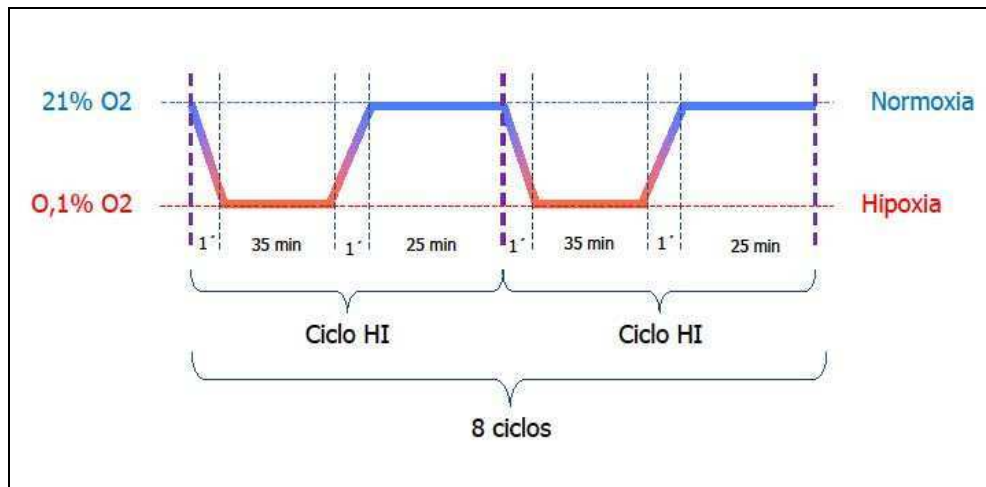


Figura 8: Esquema representativo de la exposición de cultivos primarios mixtos a HI.

Ensayos de pérdida y ganancia de función *in vitro*

Con el objetivo de interferir a distintos niveles la cascada de señalización intracelular de RAGE, los cultivos primarios mixtos recibieron distintos tratamientos durante la HI según se indica en la Tabla 3.

Tratamiento	Concentración utilizada	Observaciones
anti-RAGE	1 µg/ml	Anticuerpo
anti-S100B	1 µg/ml	Anticuerpo
S100B	1 µM	Proteína endógena
LY294002	10 µM	Inhibidor de la vía PI3K/ Akt
PD98059	10 µM	Inhibidor de MEK1 y 2 (MAPK/Erk kinasas 1/2)
BAY117082	2 µM	Inhibidor de NF-κB
anti-IgG (conejo)	1/1000	Control
DMSO	0,02 / v/v	Control

Tabla 3: Dosis de los tratamientos utilizados para los ensayos de pérdida y ganancia de función *in vitro*.

Fijación de cultivos mixtos para inmunofluorescencia

Luego de 24 hs de finalizada la exposición a HI, los cultivos fueron lavados con PBS y posteriormente fijados por incubación durante 15 minutos a temperatura ambiente en una solución fijadora de paraformaldehído al 4% y sacarosa al 4%. Finalizado ese tiempo se realizaron 3 lavados con PBS y se conservaron los cultivos en una solución de 0,3% (v/v) de Kathon en PBS a 4°C hasta realizar la técnica de inmunocitoquímica.

Fotomicrografías

A través de una cámara conectada a un microscopio Zeiss AxioPhot, se tomaron fotografías digitales del área CA1 del hipocampo en cada sección de tejido tratada para inmunohistoquímica. Por medio de un programa de edición de imágenes (Adobe PhotoShop) se realizó una fotocomposición que permitió observar toda el área de estudio. Luego, utilizando un programa de análisis de imágenes (ImageJ, NIH, EEUU), se colocó digitalmente una grilla sobre la fotocomposición, para analizar los parámetros observados sobre la totalidad del área CA1 de hipocampo.

Estudios de morfología celular

Para realizar el análisis de las secciones de tejido, se obtuvieron imágenes digitalizadas desde una cámara Olympus Q-color 5 conectada a un microscopio AxioPhot (Zeiss). Para el estudio de la morfología celular de los cultivos primarios mixtos se tomaron fotografías de los cultivos fijados en un microscopio de fluorescencia Olympus IX81.

A partir de estas imágenes se realizaron estudios morfométricos por medio de los programas de análisis de imágenes ImageJ (NIH) y Optimas 6.2. A través de estos programas se analizaron distintos parámetros de las marcaciones según se indica en la sección de resultados.

Los estudios de la distribución del marcador nuclear neuronal NeuN en secciones de tejido inmunomarcadas con un anticuerpo contra este marcador se llevaron a cabo para detectar signos tempranos de degeneración. Mientras típicamente NeuN muestra una marcación nuclear intensa, los animales expuestos a HI presentan un gran número de neuronas con marcación de NeuN esponjiforme o ausente y redistribución de esta proteína al citoplasma, previamente descrita como indicio de neurodegeneración (Robertson y cols., 2006). Teniendo en cuenta estas alteraciones, se realizaron cuantificaciones dividiendo la población celular NeuN+ en 2 subpoblaciones: 1) neuronas normales, con tinción nuclear típica; y 2) neuronas anormales, que incluye núcleos con tinción esponjiforme y tinción citoplasmática (Avilés Reyes, Angelo y cols., 2010).

Los cambios morfológicos en los astrocitos primarios en cultivo se utilizan como marcadores de la respuesta astrocitaria a una injuria o noxa. En cultivo, los astrocitos muestran diferentes morfologías que van desde una forma plana poligonal hasta una forma filamentosa o estrellada. Generalmente el paso de la población de astrocitos hacia una forma predominante estrellada (*stellation*) se considera como un correlato *in vitro* de la gliosis reactiva *in vivo* (Ramakers y Moolenaar, 1998; Abe y Saito, 1999; Schmidt-Ott y cols., 2001; Abe y Misawa, 2003; Frizzo y cols., 2004; Koh y cols., 2005; Park y cols., 2006). En este trabajo, los estudios de morfología astrocitaria en cultivos primarios se realizaron clasificando los astrocitos GFAP+ en 3 subpoblaciones. 1) Astrocitos filamentosos, con largas prolongaciones y somas pequeños prácticamente confinados al espacio perinuclear; 2) astrocitos poligonales, con somas grandes y sin prolongaciones; y 3) astrocitos intermedios, con combinación de las morfologías anteriores.

Extracción y aislamiento de RNA

Se extrajo y aisló RNA de las muestras del tejido cerebral de los animales sometidos al modelo experimental de HI. Se utilizó el kit RNAeasy Mini (Qiagen) para aislar el RNA de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El kit produce una lisis fenol/guanidina y una purificación de la membrana del RNA total en sílica-gel. El tejido

cerebral se disecó rápidamente y se homogenizó con Qiazol Lysis Reagent, y después de añadir cloroformo, el homogenato se separó en fase orgánica y acuosa por centrifugación a 4°C. La fase acuosa fue extraída y se agregó etanol 70% en iguales proporciones. Seguidamente, la muestra fue colocada en una columna que presenta afinidad por RNA, permitiendo que los contaminantes sean eficientemente lavados. Finalmente el RNA se eluyó de la columna con 30 µl de agua libre de RNAsas y luego se cuantificó la concentración final de la muestra utilizando el sistema óptico de lectura NanoDrop (Thermo Scientific) (Ramos y cols., 2007).

RT-PCR (Transcripción Reversa de mRNA y PCR del cDNA)

Se obtuvo cDNA a partir del RNA aislado previamente. La reacción se llevó a cabo utilizando el kit Omniscript Reverse Transcription (Qiagen) con *random hexamers* (Roche Products), según las instrucciones del fabricante. La PCR fue desarrollada utilizando los *primers* (cebadores) que se detallan en la Tabla 4. Estos *primers* fueron diseñados con el software MacVector (Apple OS) y los datos de las secuencias de los RNA de interés se obtuvieron de diferentes sitios con acceso abierto *on line*.

Gen	Forward	Reverse
IkBα	GCAATCATCCACGAAGAGAAGCC	TTACCCTGTTGACATCAGCCCC
XIAP	TGGTCAGAACACAGGAGACACTTTC	CACTTCACTTTATCGCCTTCACC
CIAP-2	ACTGGTGAGAACTACAGGACCGTC	AGG GAA TGA ACA CGA TGG ATA CC

Tabla 4: Secuencias *primers* utilizadas para los ensayos de RT-PCR.

El procedimiento experimental se desarrolló retro-transcribiendo 2 µg del RNA total a cDNA usando el kit antes mencionado. Posteriormente se amplificó 1,5 µl de cada muestra de cDNA usando un termociclador (Mastercycler Eppendorf Gradient 5345). Los productos del PCR generados a partir del cDNA del mensajero específico fueron sometidos a una corrida electroforética en geles de agarosa al 1,5% disueltos en *buffer* TBE pH 8.3 (Tris-borato-EDTA) y teñidos con 5 µl de bromuro de etidio, permitiendo la visualización por medio del transiluminador de luz ultravioleta

VersaDoc 4000 (Bio-Rad- imaging system, Hercules, CA). Para cada RT-PCR fue se realizaron dos controles negativos de la reacción, en los cuales la reacción con Omniscript fue desarrollada en i) ausencia de la transcriptasa reversa y ii) agua libre de RNasas (Ramos y cols., 2007; Paul y cols., 2004).

Immunoblots de tejidos

- **Obtención de muestras**

Las ratas se anestesiaron y se decapitaron para luego disecar el cerebro y las áreas de interés. Esas fracciones de tejido se homogeneizaron en un *buffer* (Ph 7,4) conteniendo sacarosa 0,32M, EGTA 1mM TRIS 20mM, NaF 20mM, O-Vanadato de Na 1mM y adicionado con inhibidores de proteasas utilizando un homogeneizador de tejidos equipado con un vástago de teflón (Angelo y cols., 2009; Villarreal y cols., 2010). Luego se realizó una centrifugación a 900 g por 10 minutos a 4°C que separó la fracción nuclear en el *pellet*, mientras el sobrenadante fue centrifugado nuevamente a 16000 g por 20 minutos a 4°C para separar la fracción citoplasmática (sobrenadante) de las membranas (*pellet*).

- **Determinación de proteínas**

Los *pellets* obtenidos fueron resuspendidos en *buffer* y se evaluaron las 3 fracciones obtenidas (2 *pellets* y sobrenadante) por la técnica de Lowry (y cols., 1951) para conocer la concentración de proteínas.

- **Corrida electroforética**

Luego las muestras se procesaron para realizar la corrida electroforética en SDS-PAGE y la transferencia de acuerdo con la técnica de *Immunoblot*. Se detectaron las bandas en placas radiográficas (AGFA) con anticuerpos secundarios contra la especie en la que fue desarrollado el primario, marcados con peroxidasa, utilizando sustrato quimioluminiscente de alta sensibilidad (ECL, Pierce) (Angelo y cols., 2009).

Las placas radiográficas fueron digitalizadas y la imagen obtenida fue analizada con el *software* específico Gelpro.

Evaluación de daño a lípidos: Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS)

El ensayo de TBARS (del inglés *Thiobarbituric Acid Reactive Substances*) es un método ampliamente utilizado para cuantificar la ocurrencia de peroxidación de lípidos durante eventos de *stress* oxidativo. Durante las reacciones en cadena que llevan a la oxidación de lípidos se forman hidroperóxidos, los que a su vez se descomponen en varios productos secundarios como aldehídos y cetonas. La técnica de TBARS consiste en la reacción del ácido con varios de esos productos, principalmente la cetona malondialdehído (MDA), para formar un producto que puede ser cuantificado fluorométricamente (Yagi, 1976).

Luego de la HI las células o los hipocampos de los animales fueron homogeneizados en un *buffer* conteniendo K_2HPO_4/KH_2PO_4 30 mM, KCl 120 mM, pH 7,4 adicionado con el antioxidante butilhidroxitolueno (BHT) al 4% en etanol, en una relación de 1:10 (BHT: muestra), y se guardaron a -20°C hasta su análisis. La mezcla de reacción se realizó en tubos de ensayo, donde se agregó una alícuota de muestra a un medio conteniendo 2 ml de HCl 0,1 N; 0,3 ml de ácido fosfotúngstico 10% (w/v) y 1 ml de ácido 2-tiobarbitúrico 0,7% (p/v). Se los incubó a 100°C durante 60 minutos protegiéndolos de la luz. Los TBARS fueron extraídos en 4 ml de n-butanol. Luego de una centrifugación de 10 min a 1000 g, se midió la fluorescencia de la fracción butanólica en un espectrofluorómetro Hitachi F-3010 a $\lambda_{\text{ex}} = 515 \text{ nm}$ y $\lambda_{\text{em}} = 553 \text{ nm}$. Se realizó una curva de calibración a partir de distintas concentraciones de 1,1,3,3-tetrametoxipropano como estándar. Los resultados se expresaron como pmol TBARS/mg. prot. (Fraga y cols., 1988) y posteriormente fueron relativizados con los valores del grupo control.

Producción de vectores virales

- **Clonado de plásmidos amplicón codificantes para las distintas versiones de RAGE (RAGE-FL y RAGE- Δ cyt)**

A partir de plásmidos pcDNA3 conteniendo las secuencias codificantes para las versiones completa (RAGE-FL) (Figura 9a) y sin la porción intracelular (RAGE- Δ cyt) (Figura 9b) del receptor RAGE se obtuvieron fragmentos conteniendo las secuencias de interés. Dichos fragmentos fueron insertados en el plásmido pA-EUA2 (Figura 10), obteniéndose así los plásmidos amplicón pA-EUA2-RAGE-FL y pA-EUA2-RAGE- Δ cyt. Los plásmidos pcDNA3 utilizados fueron cedidos por el Dr. Henry Huttunen (Neuroscience Center, University of Helsinki).

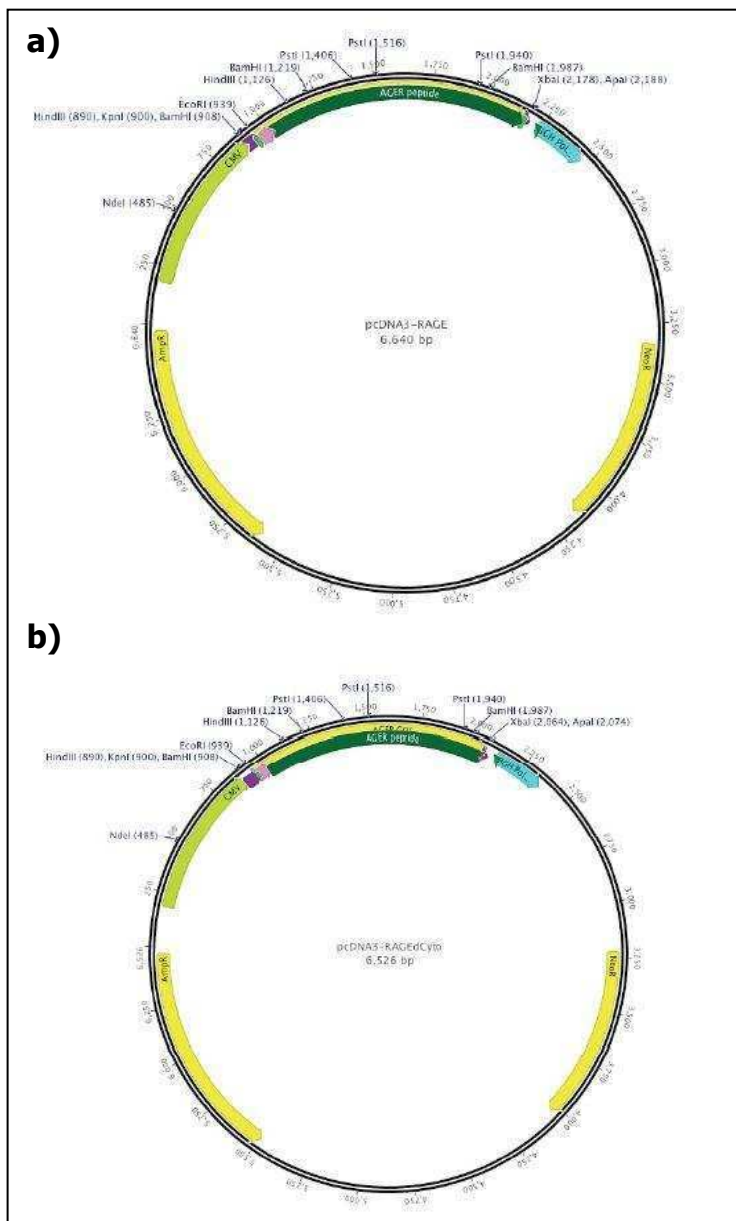


Figura 9. Mapas de los plásmidos conteniendo las secuencias codificantes para a) el receptor RAGE completo (FL) y b) su variedad sin porción citoplasmática (Δ cyt).

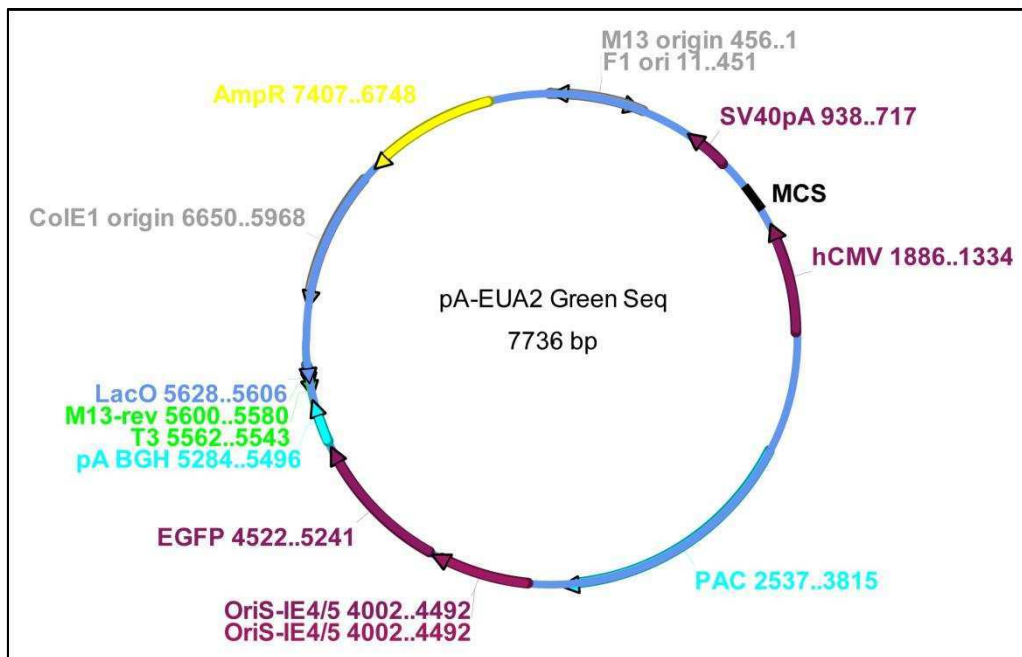


Figura 10: Mapa del plásmido amplicón pA-EUA2.

Los clonados se realizaron de la siguiente manera: 5 μg del plásmido pA-EUA2 fueron tratados inicialmente con 10 UI de la enzima de restricción NheI y posteriormente se purificó el plásmido linearizado con el kit de purificación NucleoSpin® Extract II (Macherey-Nagel). Luego se trató el producto de la purificación con el fragmento Klenow de la enzima DNA polimerasa I para hacer romos los extremos del plásmido linearizado (*blunt-end*) y se purificó nuevamente con el mismo kit. Finalmente se realizó una digestión del plásmido con la enzima de restricción XbaI y el producto de digestión fue purificado por corrida electroforética en gel de agarosa 1% en *buffer* TAE y posterior purificación con el kit NucleoSpin® Extract II. De esta manera el plásmido purificado quedó linearizado con uno de sus extremos romo y el otro cohesivo.

Los insertos correspondientes a las secuencias codificantes para las distintas versiones del receptor (RAGE-FL y RAGE- Δcyt) fueron obtenidos a partir de los plásmidos pcDNA3 que las contenían (Figura 11) por incubación con la enzima de restricción KpnI y posterior purificación con el kit mencionado previamente. Los eluidos de la purificación se procesaron con el fragmento Klenow de la enzima DNA polimerasa I para hacer romos sus extremos (*blunt-end*) y se purificaron nuevamente con el mismo kit. Finalmente se digirieron los productos de la purificación con la

enzima de restricción XbaI y los fragmentos de interés fueron purificados por corrida electroforética en gel de agarosa 1% en *buffer* TAE y posterior utilización del kit.

Una vez linearizado el plásmido pA-EUA2 y aislados los fragmentos codificantes para las distintas isoformas del receptor estos fueron incubados en relación 1:3 con la enzima T4 DNA-ligasa a 37°C por 16 hs.

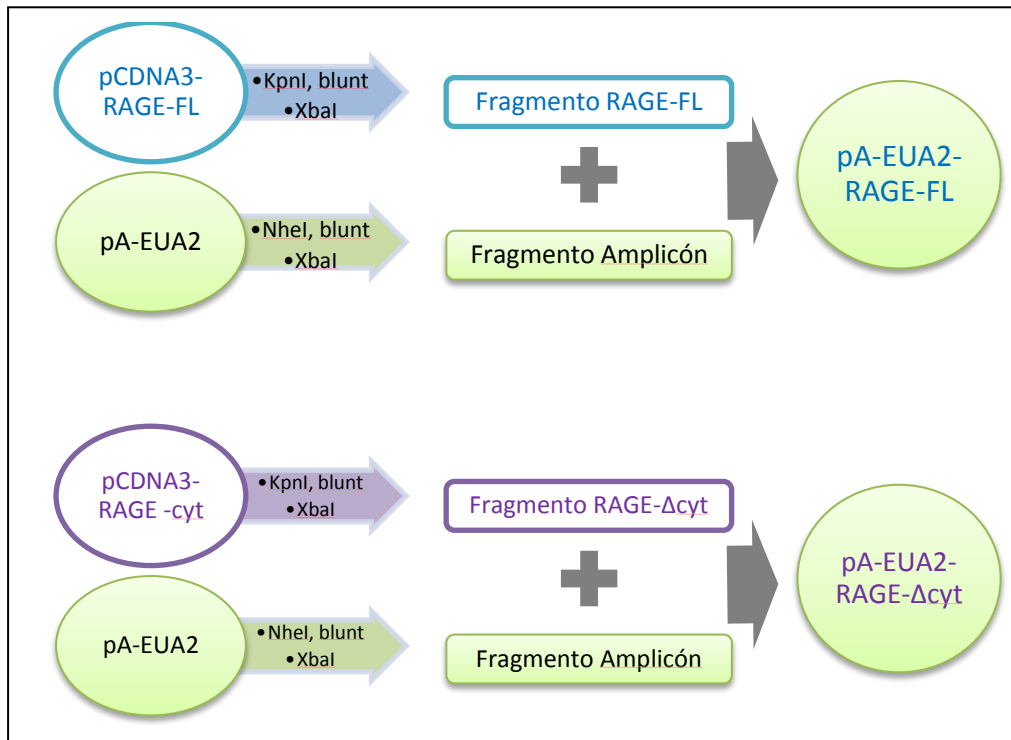


Figura 11: Esquema de las estrategias de clonado utilizadas.

Para verificar que las secuencias obtenidas fueran las deseadas, los productos de ligación fueron secuenciados (Eurofins). Estos plásmidos fueron utilizados para transformar bacterias *E.coli*. Las bacterias que incorporaron el plásmido fueron seleccionadas por resistencia al antibiótico ampicilina, cuya secuencia codificante es parte del plásmido pA-EUA2 y, por lo tanto, de los derivados pA-EUA2-RAGE-FL y pA-EUA2-RAGE- Δ cyt.

El plásmido amplicón pA-EUA2 posee una secuencia codificante para la proteína verde fluorescente (GFP) que permite evidenciar la incorporación del mismo en células vivas. La capacidad de expresión de la GFP y de las distintas variantes de RAGE de los plásmidos construidos fue evaluada por transfección de los mismos a células COS-7 y posterior inmunofluorescencia con un anticuerpo primario contra la

porción extracelular de RAGE y un anticuerpo secundario conjugado con rodamina. La colocalización de rodamina y de GFP fue verificada por microscopía (Figura 12).

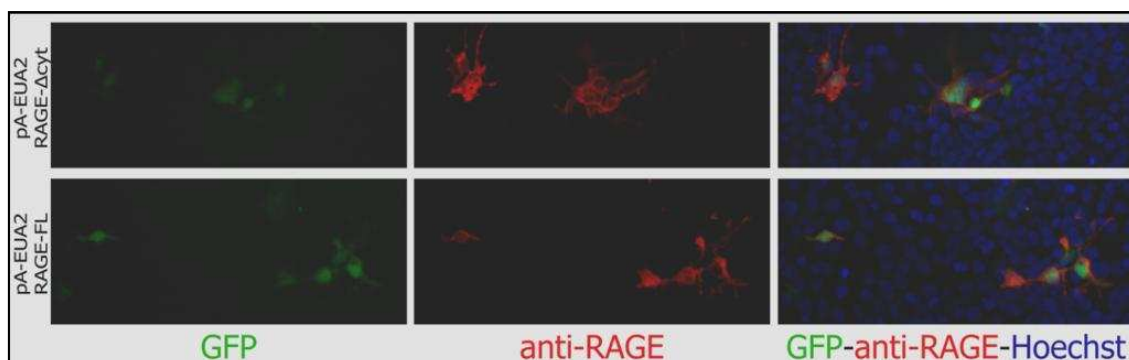


Figura 12: Fotomicrografías de inmunofluorescencia contra RAGE sobre células COS-7 transfectadas con los plásmidos construídos. Obsérvese la colocalización de GFP y RAGE.

Luego de la verificación se procedió a la producción de los vectores virales a partir de los plásmidos construídos y a su posterior titulación.

- **Producción de vectores Amplicón**

Las producciones de los vectores Amplicón se prepararon usando los plásmidos Amplicón construídos y el virus auxiliar HSV-1 LaL ΔJ (*helper*), defectivo para su replicación y neuroatenuado (Logvinoff & Epstein 2000; Adrover y cols., 2003). Para producir vectores Amplicón control se utilizó una construcción del plásmido pAEUA2 conteniendo la secuencia que codifica para la enzima β -galactosidasa (A2Z) (Adrover y cols., 2003). Células 7b (células Vero que expresan la proteína ICP4) fueron transfectadas con 5 mg de cada plásmido Amplicón. Al día siguiente, las células fueron superinfectadas con el virus auxiliar HSV-1 LaL ΔJ , con una multiplicidad de infección de 1 unidad formadora de placa por célula. Cuando el efecto citopático fue máximo, las células fueron recogidas por centrifugación y fragmentadas por 3 ciclos de congelación-descongelación para liberar los vectores. Luego se centrifugó a 1000 g por 10 minutos para separar en el *pellet* los restos celulares. Las partículas virales del sobrenadante fueron tituladas por ensayos de plaqueo sobre células 7b y células Gli 36 independientemente (Machuca y cols., 1986). Para ello, ambos tipos celulares fueron infectados con diluciones seriadas de la producción de vectores correspondiente. Al

día siguiente se contaron bajo microscopio de fluorescencia las células Gli 36 que expresaban GFP para estimar el título de vectores como unidades transductoras por mililitro (TU/ml). La contaminación con virus *auxiliar* fue evaluada un día más tarde por la presencia de unidades formadoras de placas (UFP) en el cultivo de células 7b, y se relativizó al título de vectores amplicón. Los títulos obtenidos se muestran en la Tabla 5.

Plásmido	Título	Contaminación <i>Helper</i>
pAEUA2-RAGE-FL	$3,95 \times 10^7$ TU/ml	2/
pAEUA2-RAGE- Δ cyt	$4,45 \times 10^7$ TU/ml	2/
pAEUA2-A2Z	$1,48 \times 10^6$ TU/ml	10/

Tabla 5: Títulos y contaminación con virus auxiliar de las producciones de vectores virales.

Métodos estadísticos

Los datos de los gráficos representan el promedio del parámetro analizado en cada condición, las barras de error representan el SEM. La significancia entre los tratamientos fue evaluada por distintas pruebas y *postests* según se indica en cada caso y se definió en $p < 0,05$, siendo la simbología la detallada en la Tabla 6.

Símbolo	Significancia
***	$p < 0,001$
**	$p < 0,01$
*	$p < 0,05$

Tabla 6: Significancia estadística de la simbología utilizada en la sección Resultados.

Resultados

Alteraciones producidas por los modelos *in vivo* e *in vitro* de Apnea del Sueño por Hipoxia Intermitente.

El modelo experimental de Hipoxia Intermitente (HI) *in vivo* reproduce los niveles de saturación de oxígeno en sangre de pacientes con AS.

Las pausas recurrentes en la respiración durante el sueño constituyen una característica distintiva de la AS (Lavie, 2012). Estas interrupciones causan descensos cíclicos en la saturación de oxígeno en la hemoglobina (SpO_2). La severidad de la AS se determina a través de la evaluación del número de apneas-hipopneas por hora de sueño, con un mínimo de 5 eventos por hora (Basner, 2007; Lavie, 2012); el nivel de hipoxemia, que se determina por el índice de des-saturación de oxígeno expresado como el número de descensos en la saturación de oxígeno de al menos 3-4%, normalizado por las horas de sueño o el porcentaje de tiempo de sueño que los pacientes pasan con una SpO_2 arterial por debajo del 90% (Lavie, 2012).

Para imitar estos parámetros en el modelo experimental de AS por HI se trabajó con distintos tiempos de duración en los ciclos de hipoxia (90 segundos, 6 minutos o 30 minutos) verificando en cada uno de ellos la SpO_2 y controlando el porcentaje de oxígeno en la cámara de hipoxia en tiempo real. Así establecimos que el paradigma de 6 min de hipoxia alternados con 6 min de normoxia reproducía varias condiciones de los pacientes con AS incluyendo la disminución de la SpO_2 del 20-25% y nos permitía alcanzar el mínimo de 5 eventos hipóxicos por hora de acuerdo a la definición clínica de AS (Figura 13) (Basner, 2007; Lavie, 2012).

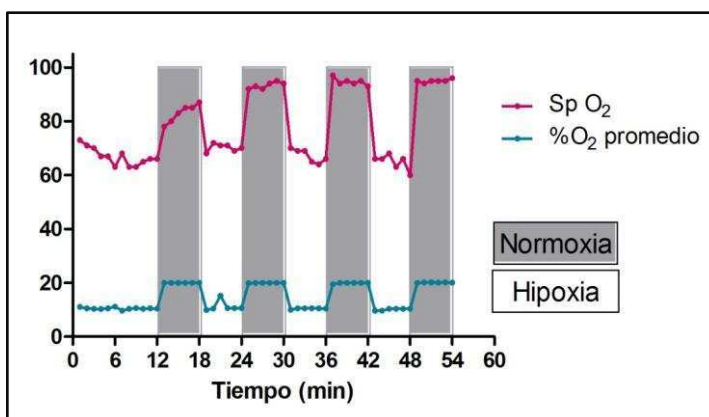


Figura 13: Correlación entre el porcentaje de SpO_2 y el porcentaje de oxígeno de la cámara durante los ciclos de hipoxia.

El modelo de HI induce la expresión de GFAP y la activación transcripcional de NF- κ B

Tal como se comentó en la sección de introducción el modelo experimental de AS por HI induce una profusa gliosis reactiva que se evaluó por parámetros morfométricos (Avilés Reyes, Angelo y cols., 2010). Uno de los parámetros más aceptados para evaluar la gliosis reactiva es la hipertrofia astrogial que cursa con un aumento en la expresión de GFAP. Por ello, evaluamos la expresión de GFAP a nivel de ARNm por RT-PCR semicuantitativa y a nivel de proteína por *immunoblots* en el hipocampo de animales de 3 y 5 días de exposición a los ciclos de HI (HI3 y HI5 respectivamente). Los resultados mostraron que la HI induce un aumento en la transcripción y traducción de GFAP que concuerda con la idea de un fenómeno de gliosis reactiva con aumento de expresión de GFAP e hipertrofia astrogial. En el caso de la abundancia de ARNm, el aumento es dependiente de la cantidad de días de exposición a HI y la diferencia resulta estadísticamente significativa tanto para 3 como para 5 días de exposición (Figuras 14a y 14b). El análisis por *immunoblot* mostró un aumento en la expresión de GFAP que se mantiene constante para HI3 y HI5 alcanzando diferencias estadísticamente significativas para ambos tiempos de exposición a HI (Figuras 14c y 14d).

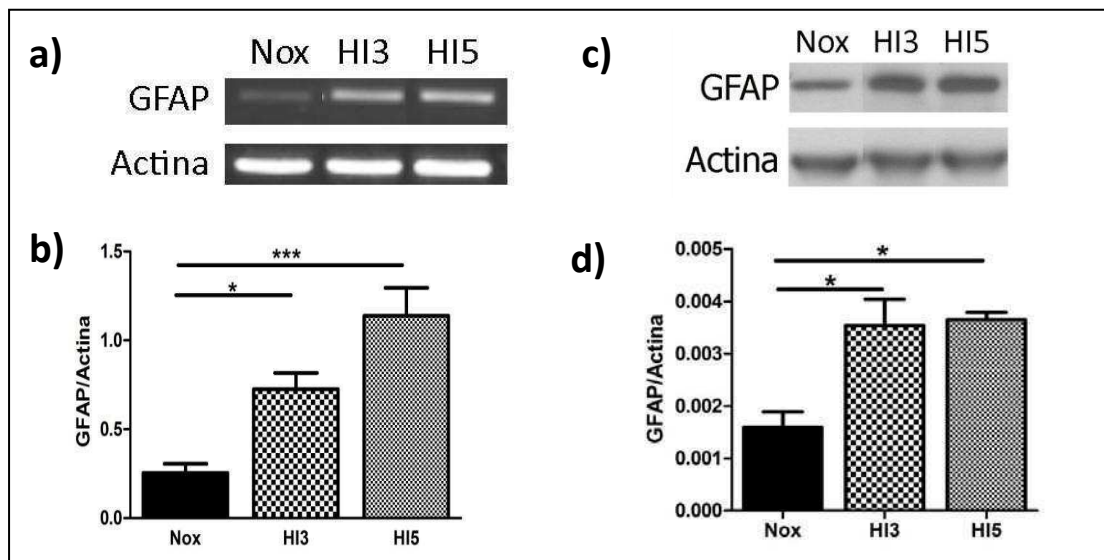


Figura 14: **a)** RT-PCR mostrando la expresión de los ARNm de GFAP y de actina (como control) en animales expuestos a HI. **b)** Análisis cuantitativo de la abundancia de mRNA de GFAP relativizado al mRNA de actina para cada grupo experimental. **c)** *Immunoblot* mostrando la abundancia de GFAP y de actina (como control de carga) en los animales sometidos a HI. **d)** Análisis cuantitativo de la abundancia de GFAP con respecto a actina para cada grupo experimental. **b y d)** Los gráficos representan la media del parámetro indicado \pm SEM. La significancia entre tratamientos fue evaluada por ANOVA de una vía y se realizó el post-test de Student-Newman-Keuls: ***p<0,001; *p<0,05.

En la sección de Introducción comentamos resultados de nuestro laboratorio que mostraban un aumento en la actividad transcripcional de NF- κ B en ratones reportadores de este factor de transcripción expuestos a HI. Con el objeto de evitar problemas debidos a la aproximación utilizando diferentes especies, expusimos ratas cepa Wistar al paradigma de HI y analizamos la expresión de varios genes dependientes de NF- κ B. Así, el modelo de AS por HI indujo un aumento en la expresión de I κ B, XIAP y BclXL, todos genes cuya expresión se induce por un aumento de la actividad transcripcional de NF- κ B. En el caso de I κ B, la HI indujo un aumento estadísticamente significativo en su expresión a 3 días de exposición a HI que luego de 5 días de HI disminuye pero se mantiene en valores mayores que el control, aunque esta diferencia no es estadísticamente significativa. El mRNA de XIAP muestra un aumento significativo estadísticamente luego de HI3, que decae casi a niveles control luego de HI5. BclXL aumenta de manera dependiente de la exposición a HI y muestra diferencias estadísticamente significativas tanto a 3 como a 5 días de exposición (Figura 15).

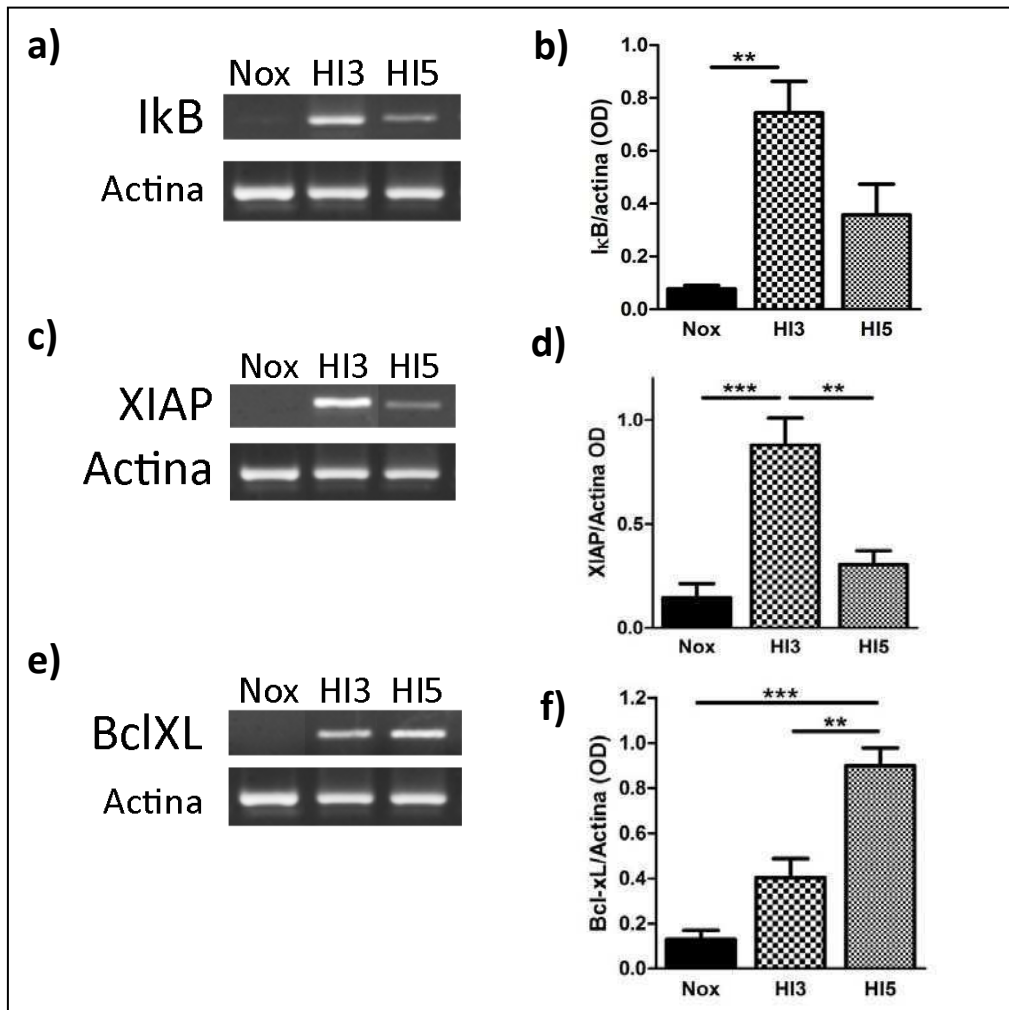


Figura 15: RT-PCR de distintos genes cuya expresión depende de NF- κ B indicando el probable aumento de la actividad transcripcional de este factor de transcripción en animales expuestos a HI. **a)** RT-PCR de I κ B y de actina (como control). **b)** Análisis cuantitativo de la abundancia de mRNA de I κ B relativizado al mRNA de actina para cada grupo experimental. **c)** RT-PCR mostrando la expresión de mRNA de XIAP y actina. **d)** Análisis cuantitativo de la abundancia de mRNA de XIAP relativizado al mRNA de actina para cada grupo experimental. **e)** RT-PCR mostrando la abundancia de mRNA de BclXL y de actina. **f)** Análisis cuantitativo de la abundancia de mRNA de Bcl-xL relativizado al mRNA de actina para cada grupo experimental. **b, c y d)** Los gráficos representan la media del parámetro indicado, obtenido de tres animales sometidos a HI por el tiempo indicado. Las barras de error representan el SEM. La significancia entre tratamientos fue evaluada por ANOVA de una vía y se realizó el post-test de Student-Newman-Keuls: ***p<0,001; **p<0,01.

La HI induce un aumento de ROS tanto *in vivo* como *in vitro*.

A pesar de que la generación de ROS no puede ser medida directamente en los sistemas biológicos, se han identificado diferentes biomarcadores que sirven como medida de *stress* oxidativo (Jordan y cols., 2006). Existen varios marcadores que miden en forma indirecta el nivel de oxidación en diferentes componentes celulares inducidos por los ROS. Ejemplo de esos marcadores es la medición del producto de la oxidación de lípidos MDA. El ensayo del ácido tiobarbitúrico (TBAR) detecta MDA. Distintos estudios mostraron el aumento de ROS en la AS, tanto en modelos experimentales como en pacientes (Saarelainen y cols., 1999; Schulz y cols., 2000; Carpagnano y cols., 2003; Christou y cols., 2003; Lavie, 2003; 2012; Jordan y cols., 2004; Tan y cols., 2006; Kizawa y cols., 2009).

En nuestras manos, el estudio de estos parámetros mostró un aumento en el nivel de TBARS en el hipocampo de animales expuestos al paradigma de HI en una forma dosis dependiente con respecto a los ciclos de hipoxia. En animales, el aumento de TBARS fue significativamente diferente para todos los tiempos de exposición, alcanzando el máximo a los 5 días de exposición (HI5) y manteniéndose constante hasta los 10 días de HI (HI10), que fue el mayor periodo de HI estudiado (Figura 16a).

Con el objetivo de trabajar con un modelo *in vitro* que nos permitiera diseccionar los mecanismos fisiopatológicos de la AS en una forma más conveniente, comenzamos a utilizar el modelo de HI *in vitro* descrito previamente (Shan y cols., 2007), que consta de 35 minutos de hipoxia (0.1% O₂, 5% CO₂, nitrógeno balance) intercalados con 25 minutos de normoxia (5% CO₂ y 95% aire) (Ver sección Materiales y Métodos). Estos ciclos fueron repetidos por 2, 5 y 8 horas (HI2, HI5 y HI8 respectivamente). Utilizamos en estos experimentos cultivos celulares mixtos (neuronales-gliales) obtenidos de hipocampos de ratas Wistar de 3 días de edad. La exposición a HI indujo en los cultivos celulares, tal como en los animales, un aumento en el nivel de TBARS que alcanzó significancia estadística luego de 8 ciclos de exposición a HI (HI8) (Figura 16b).

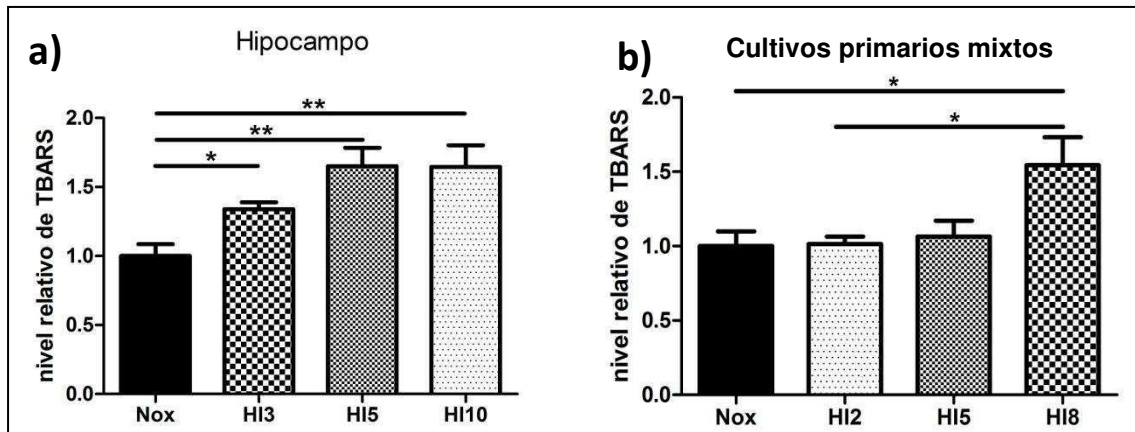


Figura 16: Análisis cuantitativo de la abundancia de TBARS con respecto al grupo normóxico en animales (a) y cultivos primarios mixtos (b) expuestos a HI. En a), HI3, HI5 y HI10 corresponden respectivamente a 3, 5, y 10 días de exposición a HI. En b), HI2, HI5 y HI8 corresponden a 2, 5, y 8 ciclos de HI respectivamente. Los gráficos representan la media del parámetro indicado, las barras de error representan la SEM. La significancia entre tratamientos fue evaluada por ANOVA de una vía y se realizó el post-test de Student-Newman-Keuls: ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$.

Tanto en hipocampo de animales expuestos a 3 días de HI, como en cultivos mixtos expuestos a 8 ciclos de HI, el aumento en la cantidad de TBARS fue cercano al 50% con respecto al control. Esta similitud nos permite hacer un paralelismo entre ambos modelos de AS por HI *in vitro* e *in vivo*, y es por esto que hemos elegido dichos tiempos de exposición (3 días *in vivo* y 8 horas *in vitro*) para los experimentos subsiguientes. Así, en este trabajo de tesis comenzamos a utilizar el paradigma *in vitro* para estudiar algunas cascadas de señalización que podrían ser moduladas con diferentes estrategias que podrían ser de utilidad para mejorar la supervivencia neuronal y disminuir la gliosis reactiva en la AS.

Expresión de RAGE *in vitro* en cultivos hipocampales mixtos.

Teniendo en cuenta los resultados previos de nuestro laboratorio sobre la inducción de la expresión de RAGE en animales expuestos a HI (Avilés Reyes, Angelo y cols., 2010), decidimos evaluar la expresión de este receptor en neuronas y astrocitos de cultivos primarios mixtos hipocampales. Para ello, expusimos cultivos mixtos a HI o normoxia y realizamos ensayos de inmunofluorescencia de doble marcado con anticuerpos anti-RAGE y anti-MAP2 como marcador de neuronas o anti-GFAP como marcador de astrocitos. Sorprendentemente, los cultivos del grupo control expuesto a un nivel normal de oxígeno mostraron un alto nivel de expresión basal de RAGE tanto

en astrocitos como en neuronas (Figuras 17a y 18a). Para ambos tipos celulares el estudio cuantitativo del porcentaje de células que expresa RAGE no mostró diferencias en los cultivos expuestos a HI con respecto a los cultivos del grupo control (Figuras 17b y 18b).

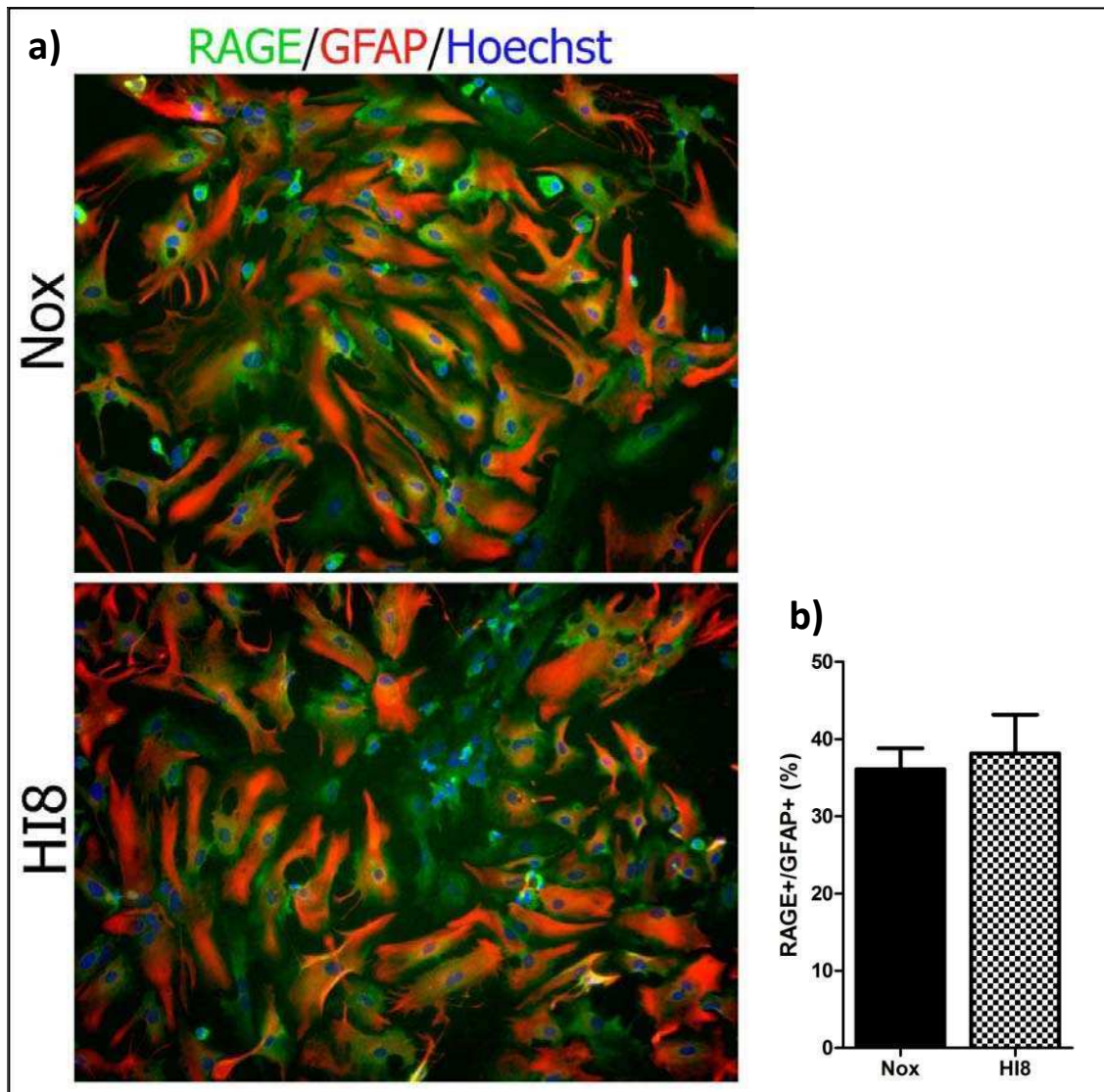


Figura 17: a) Inmunofluorescencia de doble marcado con los anticuerpos anti-GFAP y anti-RAGE y contracolor con el marcador de DNA Hoechst 33342 que permite observar el alto nivel de expresión de RAGE en los astrocitos de los cultivos primarios mixtos. Magnificación primaria 200x. b) Cuantificación del porcentaje de astrocitos GFAP+ que expresan RAGE. Las barras del gráfico representan la media del parámetro indicado \pm SEM. La significancia entre tratamientos fue evaluada por el test de Student.

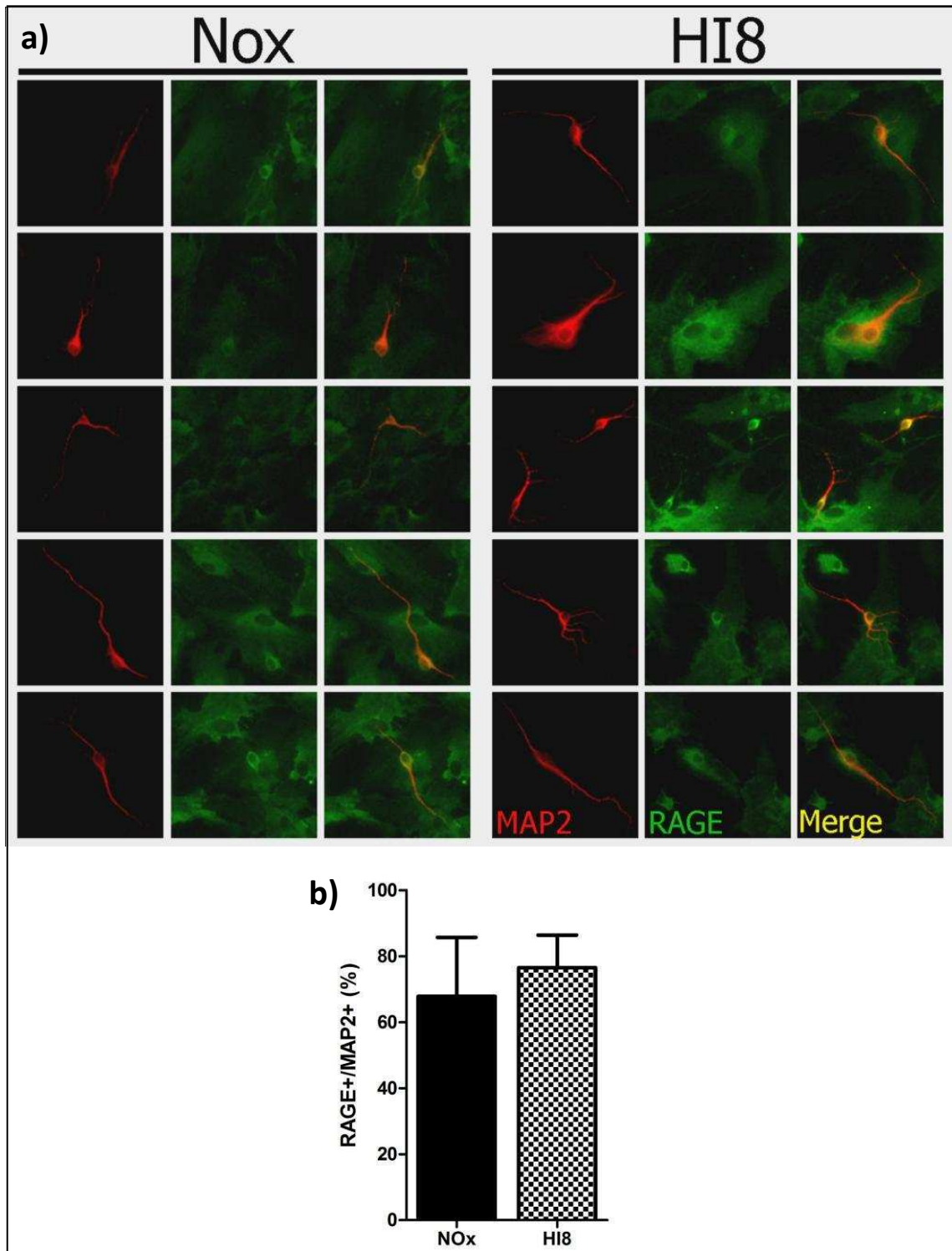


Figura 18: **a)** Inmunofluorescencia de doble marcado con los anticuerpos anti-MAP2 y anti-RAGE que permite observar el alto nivel de expresión de RAGE en las neuronas MAP2+ de los cultivos primarios mixtos. Magnificación primaria 200x. **b)** Cuantificación del porcentaje de neuronas MAP2+ que expresan RAGE. Las barras del gráfico representan la media del parámetro indicado \pm SEM. La significancia entre tratamientos fue evaluada por el test de Student.

La HI induce activación de NF- κ B *in vitro* en cultivos mixtos hipocampales.

Los dímeros de NF- κ B se encuentran retenidos en el citoplasma, asociados al inhibidor I κ B que bloquea su señal de localización nuclear. Frente a ciertos estímulos, I κ B es fosforilado, lo que permite su degradación por el proteosoma y se libera así la señal de localización nuclear, permitiendo que NF- κ B transloque al núcleo para iniciar la transcripción de sus genes blanco (DiDonato y cols., 1997; Mercurio y cols., 1997; Zandi y cols., 1997). Por lo tanto, la activación de NF- κ B puede seguirse por diferentes parámetros, incluyendo la degradación de I κ B y la translocación nuclear de las subunidades de NF- κ B, de las cuales p65 es la más abundante en neuronas y células de la glía.

Continuando con la caracterización de la respuesta a la HI en cultivos mixtos hipocampales y su comparación con los cambios observados *in vivo*, sometimos los cultivos primarios mixtos a HI y luego se analizó la localización subcelular de la subunidad p65 en astrocitos. Esta detección se realizó por inmunofluorescencia con doble marcado de GFAP y un anticuerpo que reconoce la señal de localización nuclear de p65 (p65NLS, del inglés *nuclear localization signal*) sólo cuando ésta se encuentra liberada del inhibidor I κ B. El análisis cuantitativo de los astrocitos GFAP+ con p65NLS localizado en el núcleo celular mostró un aumento significativo para el grupo HI8 con respecto al control (Figura 19).

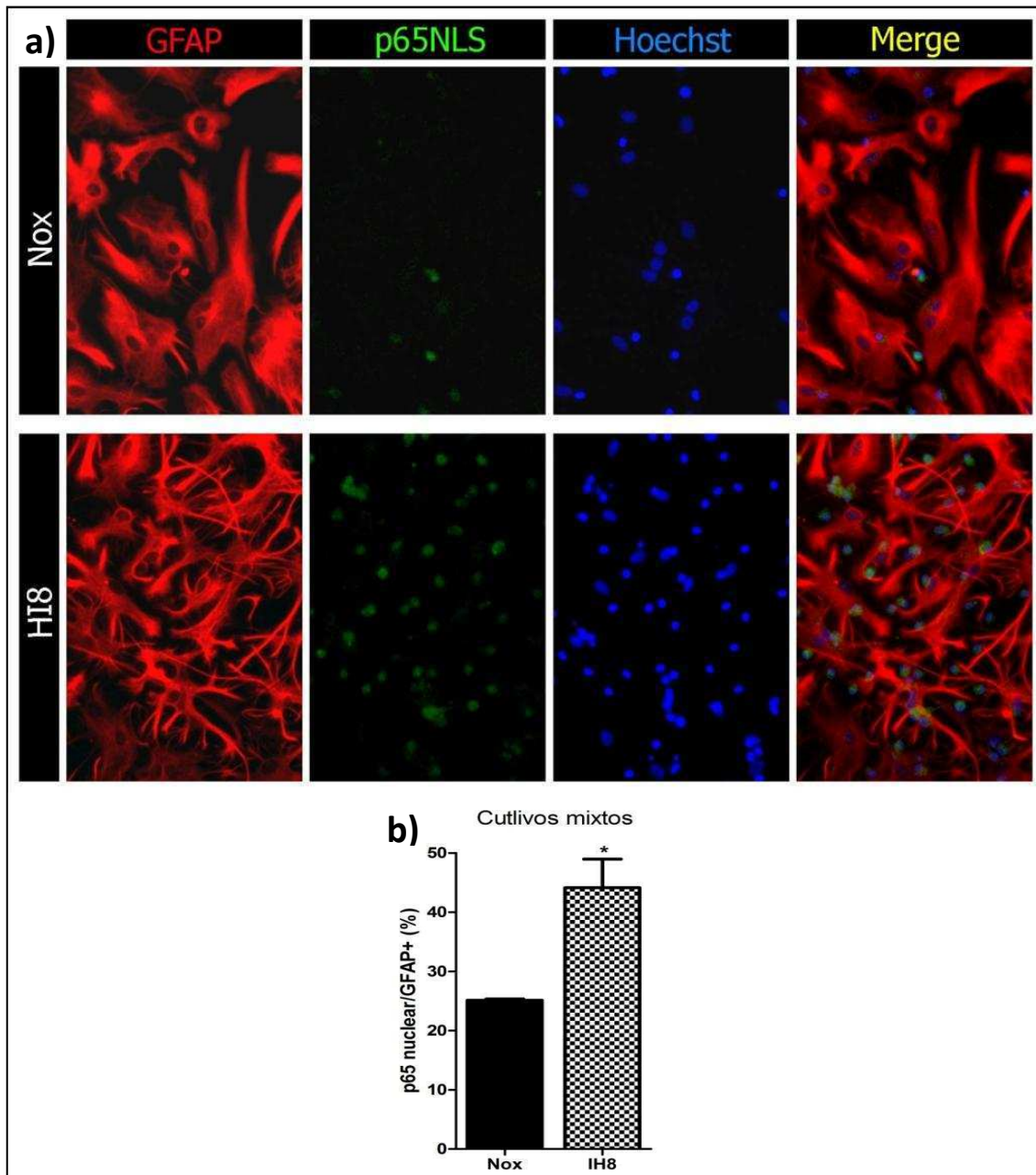


Figura 19: a) Fotografías representativas de la inmunomarcación para GFAP y la subunidad p65 activa que muestran la localización del factor de transcripción NF- κ B en cultivos primarios de astrocitos. Nótese el aumento en la inmunomarcación de p65NLS en las células expuestas a HI. Magnificación primaria 200x. **b)** Análisis cuantitativo de la activación de p65 en astrocitos. Los gráficos representan la media del porcentaje de células GFAP+ con marcación p65NLS+, \pm SEM. La significancia entre tratamientos fue evaluada por el test de Student: * $p < 0,05$.

Para analizar la activación de NF- κ B en las neuronas de los cultivos primarios mixtos sometidos a HI, éstos fueron fijados y luego se realizó inmunofluorescencia de doble marcado con los anticuerpos anti-p65NLS y anti-MAP2 de igual manera que se hizo para el estudio de la activación de este factor de transcripción en astrocitos. El

análisis cuantitativo del porcentaje de neuronas MAP2+ que tienen NF-κB activado mostró un aumento en los cultivos del grupo HI8 con respecto al control (Figura 20).

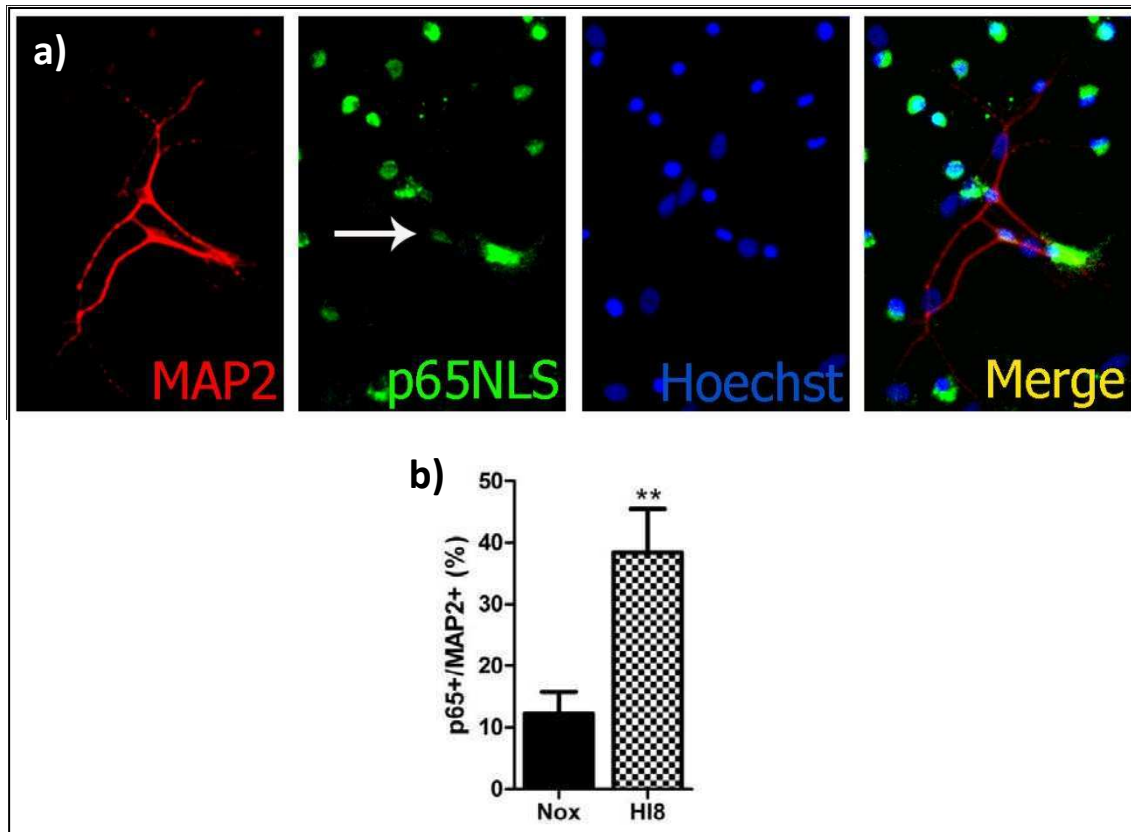


Figura 20: a) Fotografías mostrando la marcación de p65NLS en neuronas MAP2+ de cultivos primarios mixtos expuestos a HI8. Magnificación primaria 200x. b) Cuantificación del porcentaje de neuronas MAP2+ con marcación para el anticuerpo anti-p65NLS. Los gráficos muestran la media de este parámetro \pm SEM. La significancia entre tratamientos fue evaluada por el test de Student: ** $p < 0,01$.

La exposición a HI induce cambios en la morfología astrogial *in vitro*.

Los astrocitos en cultivo presentan una variedad de fenotipos desde una morfología aplanada y poligonal hasta una morfología fibrilar, pasando por estadios intermedios. Frente a *stress* celular, los astrocitos tienden a tomar una morfología fibrilar que se acepta como una reacción similar a la gliosis reactiva *in vivo*. Este cambio en la morfología se denomina *stellation* y ha sido ampliamente estudiado para determinar los mecanismos que lo regulan (Abe y cols., 1999; 2003; Frizzo y cols., 2004; Koh y cols., 2005; Park y cols., 2006).

Con el objetivo de analizar los cambios en los astrocitos inducidos por la HI *in vitro*, se estudió la morfología de los astrocitos clasificándolos en tres categorías morfológicas: i) Poligonales; ii) Filamentosos; y iii) Intermedios. Para cada uno de los tratamientos se contabilizó el porcentaje de astrocitos correspondientes a cada morfología. Los cultivos expuestos a HI8 mostraron un aumento significativo en el porcentaje de astrocitos filamentosos, característica del proceso de *stellation* (Figura 21).

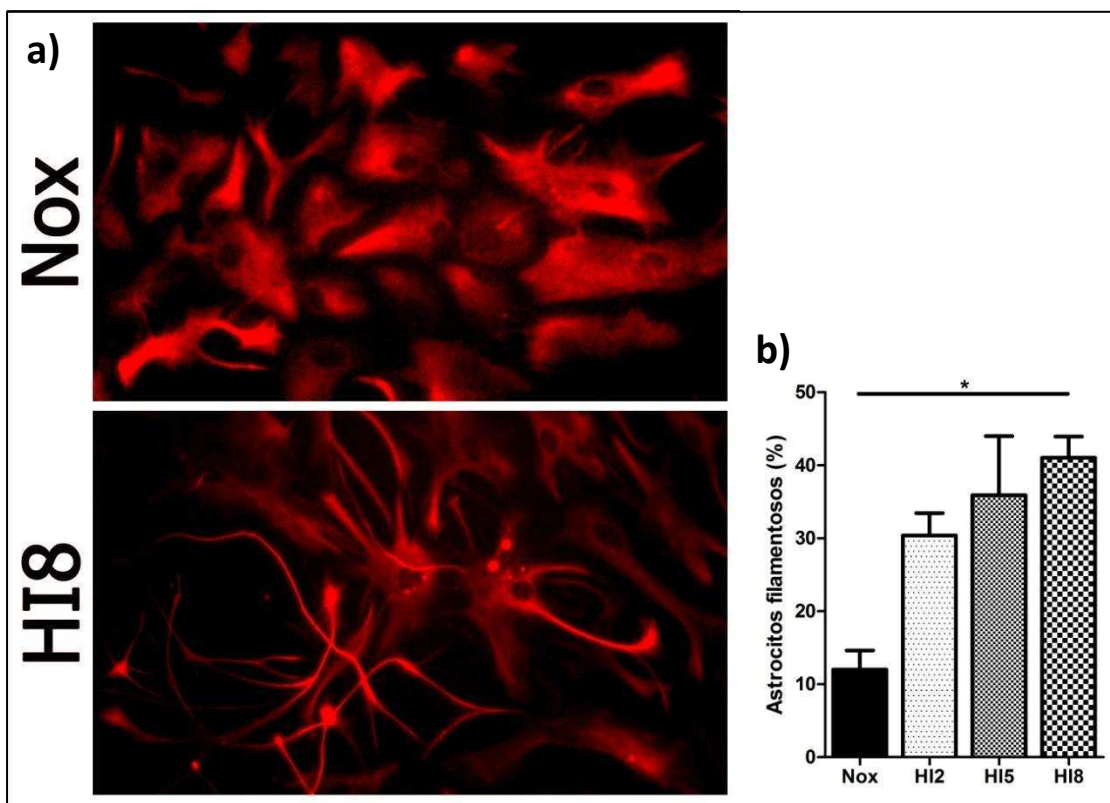


Figura 21: a) Fotomicrografías de inmunofluorescencia con anticuerpos anti-GFAP sobre cultivos primarios mixtos mostrando la morfología astrogliar en células expuestas a HI. Magnificación primaria 200x. b) Análisis cuantitativo del porcentaje de astrocitos filamentosos por campo mostrando un aumento en los cultivos sometidos HI. Las barras del gráfico representan la media \pm SEM del parámetro indicado en cada condición. La significancia entre tratamientos fue evaluada por ANOVA de una vía y post-test de Student-Newman-Keuls: * $p < 0,05$.

La exposición a HI provoca cambios significativos en la longitud de las dendritas *in vitro*.

Se ha reportado que la privación de oxígeno y glucosa (OGD, del inglés *Oxygen and Glucose Deprivation*) como modelo *in vitro* de isquemia, induce un aumento en la longitud dendrítica mientras otros autores han mostrado una disminución de este parámetro en cultivos expuestos a hipoxia (Genetos y cols., 2010; Lei y cols., 2006). Nuestro modelo de AS por HI *in vivo* mostró un acortamiento temprano de las dendritas seguido de una recuperación en la longitud de las mismas (Avilés Reyes, Angelo y cols., 2010). Para estudiar los efectos de la HI *in vitro* sobre la longitud de las neuritas, realizamos en estos cultivos la técnica de inmunofluorescencia con el anticuerpo anti- β III-tubulina. Mediante la utilización de la aplicación NeuronJ del software ImageJ (NIH) se cuantificó la longitud total de las dendritas relativizándola al número de neuronas por campo (Genetos y cols., 2010). Luego de este análisis, se observó una disminución del parámetro estudiado en las dendritas β III-tubulina+ de los cultivos expuestos a 8 ciclos de HI (HI8) (Figura 22).

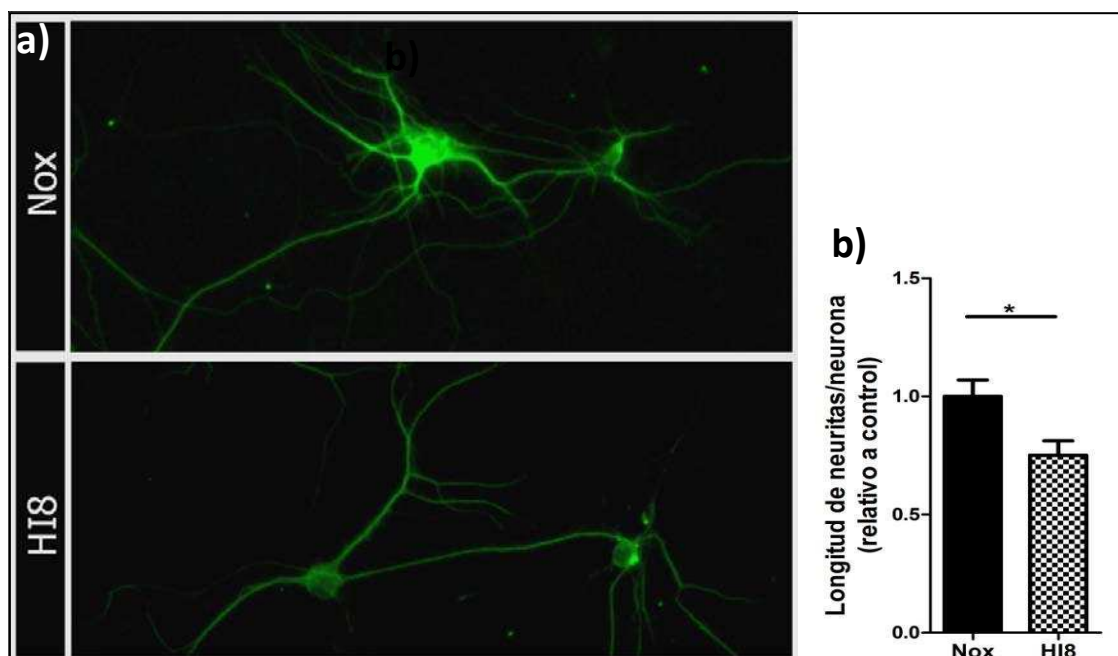


Figura 22: a) Fotomicrografías de inmunofluorescencia con anticuerpos anti- β III-tubulina sobre cultivos primarios mixtos mostrando la morfología neuronal de células expuestas a HI. Magnificación primaria 200x. b) Análisis cuantitativo del porcentaje de la longitud dendrítica por neurona por campo. Las barras del gráfico representan la media \pm SEM del parámetro indicado en cada condición. La significancia entre tratamientos fue evaluada por test de Student: * $p < 0,05$.

La exposición a HI induce un aumento en la abundancia del factor HIF-1 α .

El factor inducible por hipoxia (HIF, del inglés *Hypoxia Inducible Factor*) juega un rol esencial en la respuesta a hipoxia. La subunidad HIF-1 α se sintetiza constitutivamente, pero se degrada en condiciones de normoxia impidiendo su detección (Semenza, 2004; 2007; Sharp y Bernaudin, 2004). En condiciones de hipoxia, la menor disponibilidad de oxígeno reduce la degradación de HIF-1 α y éste puede dimerizar con la subunidad HIF-1 β , expresada constitutivamente, para formar el complejo transcripcional HIF-1 que induce la expresión de los genes blanco. Como consecuencia de la regulación de HIF-1 α , su inmunomarcación es mínima o indetectable en condiciones de normoxia y se incrementa en hipoxia localizándose en el núcleo.

En el modelo de AS por HI *in vivo* habíamos detectado un aumento de HIF-1 y algunos de sus genes blanco como MDR-1 (del inglés *MultiDrug Resistance protein*) (Avilés Reyes, Angelo y cols., 2010). Para confirmar la activación de HIF-1 en el modelo *in vitro* realizamos ensayos de inmunocitoquímica de doble marcado en cultivos primarios mixtos expuestos a HI, combinando el anticuerpo anti-HIF-1 α con anti-GFAP o con anti-MAP2 para verificar el tipo celular que activa HIF-1. El análisis cuantitativo de la inmunomarcación para HIF-1 α en las células GFAP+ de los cultivos expuestos a HI mostró un aumento significativo con respecto al control (Figura 23), mientras que en neuronas MAP2+ no se evidenció un aumento en la abundancia de HIF-1 α (Figura 24). Estos resultados indican que el factor de transcripción HIF-1 es activado en los astrocitos de los cultivos primarios mixtos expuestos a HI.

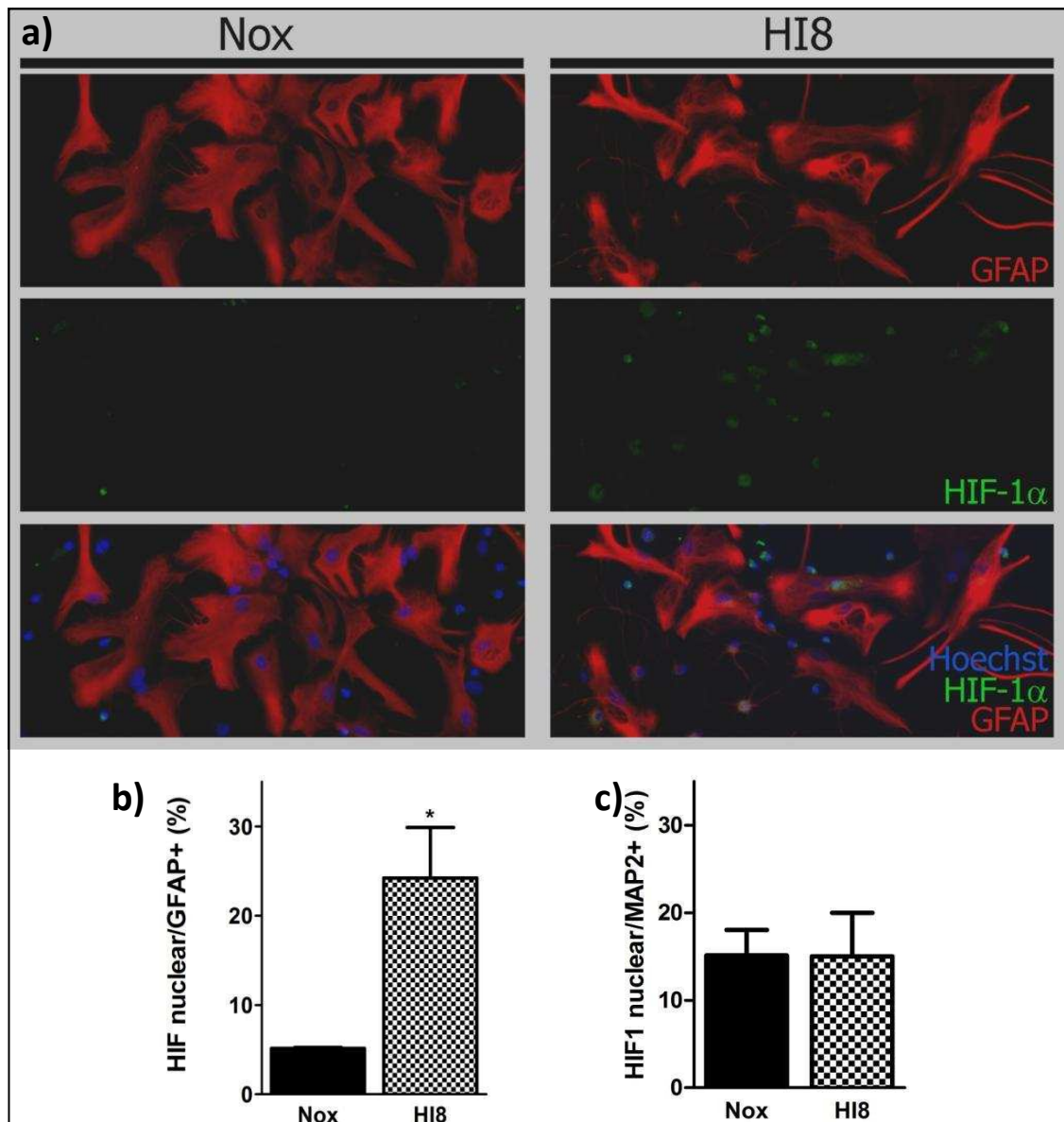


Figura 23: a) Fotografías de inmunofluorescencia de doble marcado HIF-1 α /GFAP en cultivos primarios mixtos. Magnificación primaria 200x. b) Cuantificación del porcentaje de células GFAP+ con marcación nuclear de HIF-1 α . c) Cuantificación del porcentaje de células MAP2+ con marcación de HIF-1 α . b y c) Los gráficos representan la media \pm SEM del parámetro indicado para cada grupo experimental. La significancia entre tratamientos fue evaluada por test de Student: * $p < 0,05$.

Hasta aquí nuestros resultados indican que los cultivos mixtos hipocampales expuestos a una cantidad de ciclos de HI que induce un aumento del stress oxidativo similar al de los animales expuestos a HI3, reproducen la mayoría de los parámetros estudiados *in vivo*. En la siguiente sección de esta tesis avanzamos hacia los ensayos de pérdida de función tratando de bloquear algunas rutas que parecen controlar la gliosis reactiva y la sobrevida neuronal luego de la exposición a HI.

Estudios funcionales *in vitro* sobre la vía de señalización S100B/RAGE/NF- κ B

En los resultados expuestos hasta aquí describimos que el modelo *in vivo* de AS por HI reproduce las alteraciones en la saturación de O₂ en sangre y aumenta los niveles de ROS, efectos que se han observado en pacientes con diagnóstico de AS. En el modelo *in vitro* de exposición a HI describimos un aumento en los niveles de ROS, que se correlaciona con los observados en animales expuestos a HI, así como una activación de NF- κ B, aumento en la abundancia de HIF-1 α y el fenómeno de gliosis reactiva *in vitro* (*stellation*). Teniendo en cuenta estos resultados y los obtenidos previamente en el laboratorio, decidimos realizar estudios funcionales de pérdida o ganancia de función bloqueando o activando la vía de señalización S100B/RAGE/NF- κ B para determinar si esta ruta es un posible responsable de las alteraciones observadas. Estos estudios se realizaron en animales y en cultivos primarios mixtos expuestos a HI. Para ello se trabajó en cultivos primarios hipocampales mixtos con 8 horas de exposición a HI (HI8), que por los resultados obtenidos en el estudio de *stress* oxidativo, conocemos que ese tiempo de exposición correlaciona con 3 días de exposición a HI *in vivo*.

El tratamiento con S100B *in vitro* previene parcialmente los cambios morfológicos inducidos por la HI en astrocitos de cultivos hipocampales mixtos.

Teniendo en cuenta que previamente en nuestro laboratorio habíamos demostrado que la HI en animales induce un aumento en la expresión de S100B (Avilés Reyes, Angelo y cols., 2010), decidimos estudiar si esta molécula, ahora reconocida como DAMP capaz de activar la respuesta inmune innata y promover la inflamación, está involucrada en las alteraciones en neuronas y astrocitos que se describieron en los animales hipóxicos. Para ello, cultivos primarios mixtos fueron tratados con 1 μ M de S100B previamente a la exposición a HI. Este tratamiento con S100B interfirió con la filamentación de los astrocitos inducida por la HI, dando como resultado una

morfología astrocitaria que no fue significativamente diferente de los controles normóxicos, aunque retenía una tendencia hacia la conversión al fenotipo filamentososo. Estos resultados sugieren que el pretratamiento con niveles altos de S100B podría activar una vía de señalización que interfiere con los cambios inducidos por la HI en astrocitos.

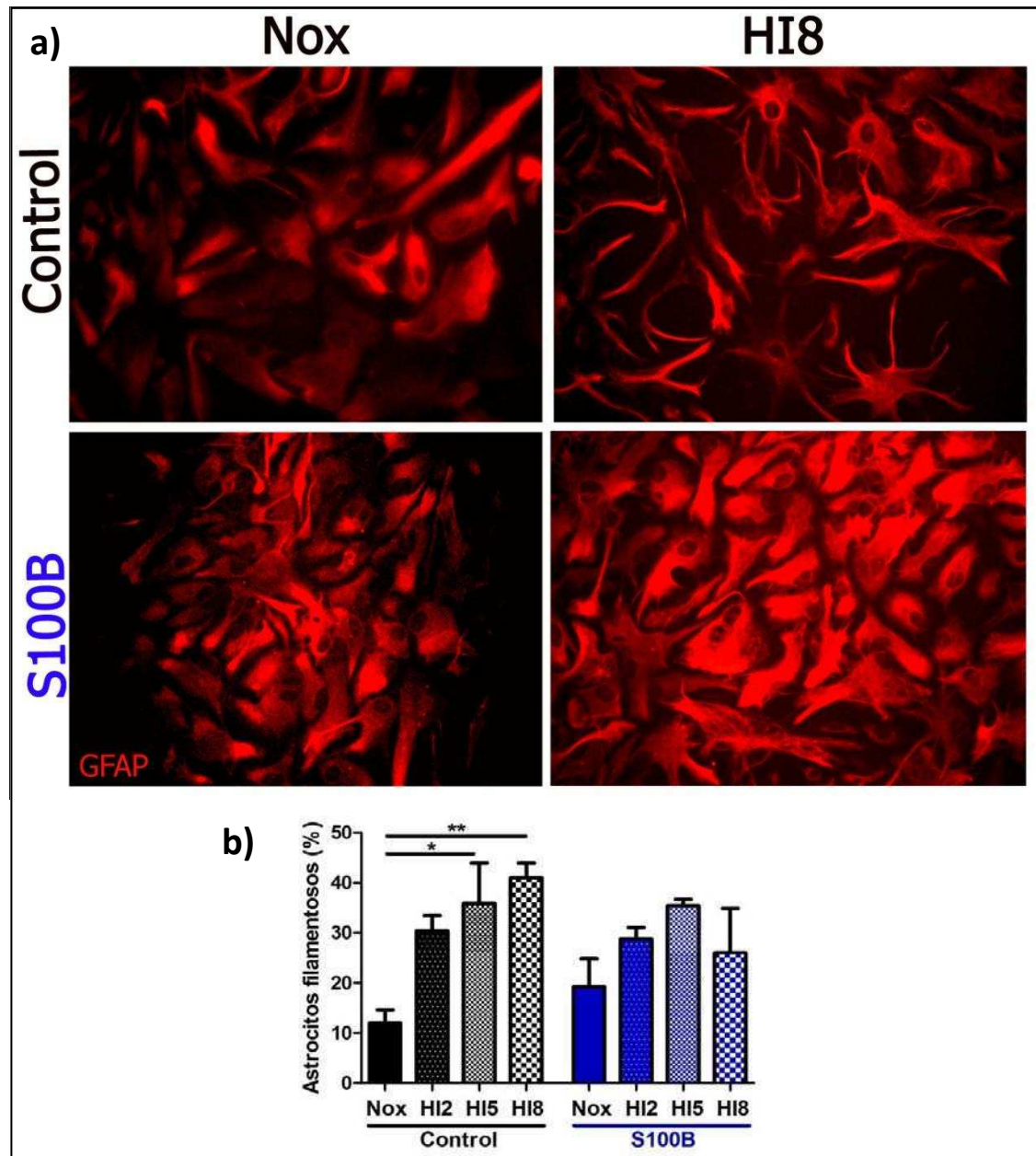


Figura 24: **a)** Fotomicrografías de inmunofluorescencia con anticuerpos anti-GFAP sobre cultivos primarios mixtos tratados con S100B mostrando la morfología astroglial en células expuestas a HI. Magnificación primaria 200x. **b)** Análisis cuantitativo del porcentaje de astrocitos filamentosos por campo para cada uno de los tratamientos. Las barras en los gráficos representan la media \pm SEM del parámetro indicado en cada condición. La significancia entre tratamientos fue evaluada por ANOVA de dos vías y post-test de Bonferroni: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

La estimulación con S100B en cultivos primarios mixtos previene parcialmente el acortamiento de dendritas inducido por la HI *in vitro*.

Para estudiar los efectos de la estimulación con S100B sobre las neuronas de los cultivos primarios mixtos expuestos a HI, se realizó inmunofluorescencia con el anticuerpo anti- β III-tubulina y se cuantificó por técnicas morfométricas la longitud total de dendritas relativizándola a la cantidad de neuronas en cada campo. Este análisis mostró para el pretratamiento con S100B en los cultivos expuestos a HI una tendencia a la prevención de la disminución de la longitud de las dendritas inducida por la HI. En los cultivos normóxicos el pretratamiento con S100B no indujo diferencias en la longitud media de las dendritas con respecto al grupo control (Figura 25).

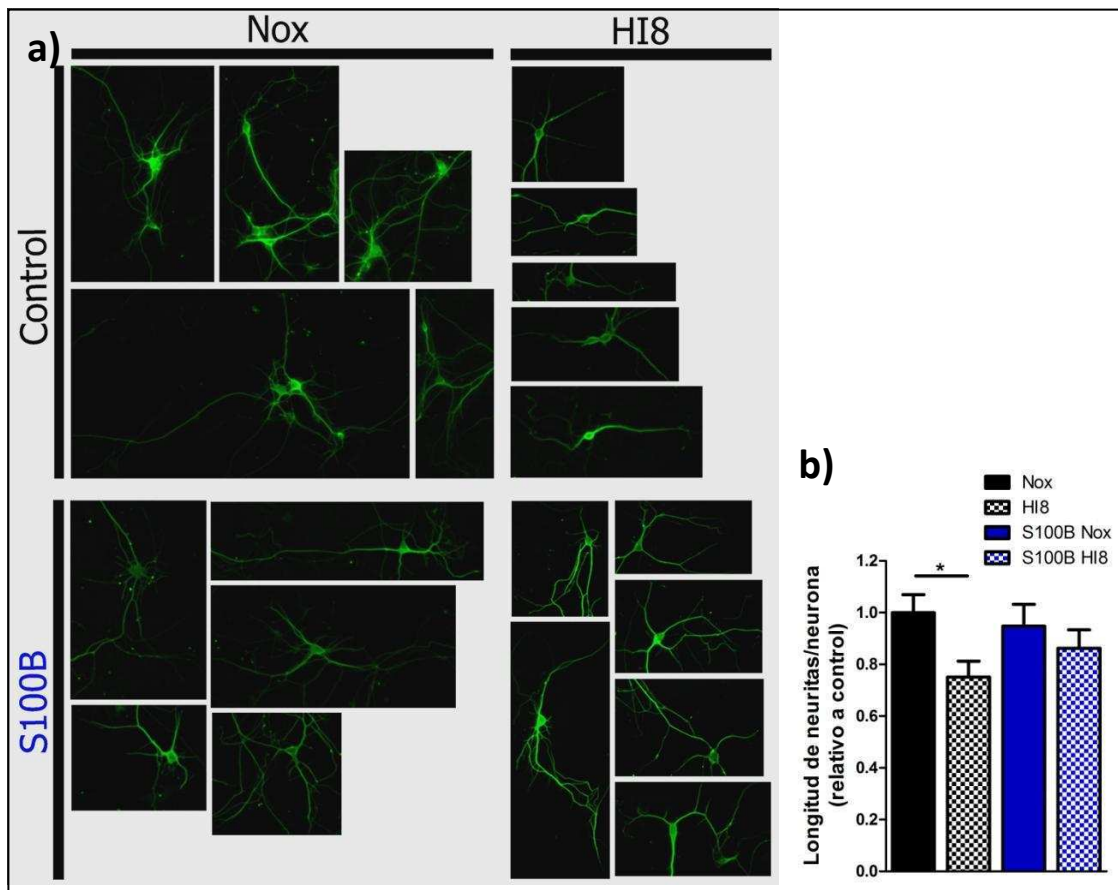


Figura 25: a) Fotomicrográficas de inmunofluorescencia con anticuerpos anti- β III-tubulina sobre cultivos primarios mixtos hipocampales tratados con S100B y expuestos a HI. Magnificación primaria 200x. b) Análisis cuantitativo de la longitud dendrítica por neurona para cada uno de los tratamientos relativizado al control. Las barras en los gráficos representan la media \pm SEM del parámetro indicado. La significancia entre tratamientos fue evaluada por ANOVA de dos vías y post-test de Bonferroni: * $p < 0,05$.

El bloqueo de S100B previene la *stellation* inducida por la HI *in vitro*.

La observación de que el agregado de S100B exógena interfería con el acortamiento de dendritas y reducía el nivel de la gliosis reactiva *in vitro* inducido por la HI fue un resultado inesperado y nos sugirió que probablemente el agregado de S100B podría lograr la disrupción de la correcta señalización neuro-glial mediada por S100B. Para estudiar esta posibilidad desarrollamos experimentos de pérdida de función pretratando los cultivos expuestos a HI con anticuerpos neutralizantes de S100B. El análisis de la morfología astrocitaria mostró que el bloqueo de la S100B endógena es capaz de prevenir la *stellation* inducida por la HI. En cambio, en condiciones de normoxia el pretratamiento con anti-S100B induce la conversión de los astrocitos a su forma filamentosa (Figura 26). Este resultado sugiere que el rango de concentraciones a las cuales S100B ejerce sus efectos dependería del estado basal de los astrocitos y de su exposición a noxas como la HI.

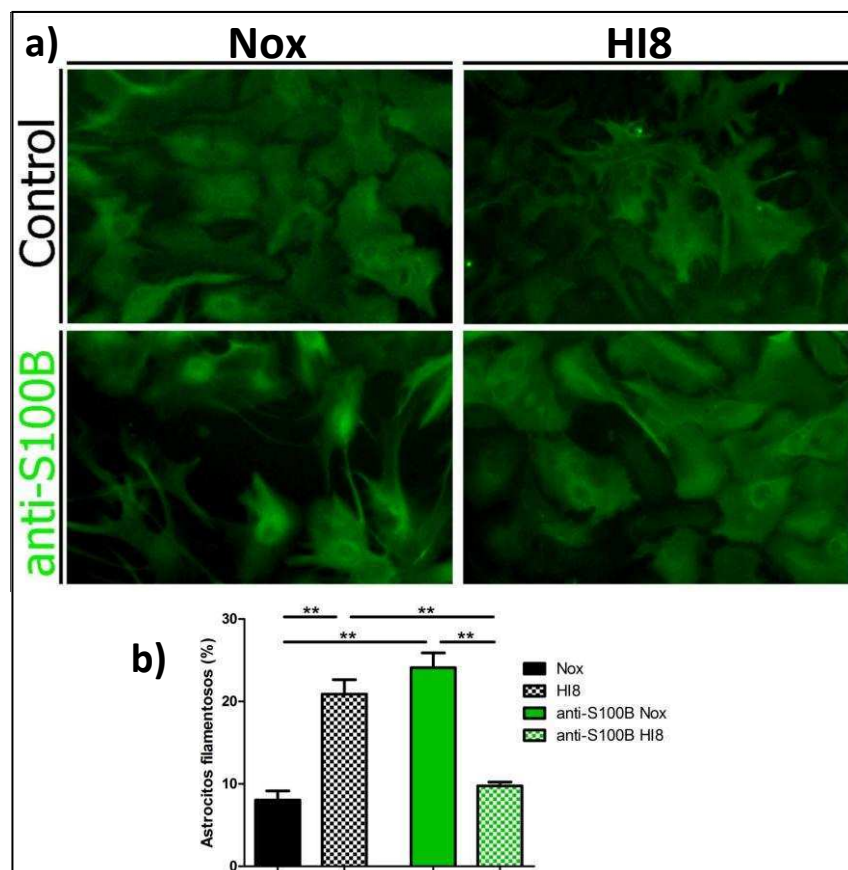


Figura 26: a) Fotomicrografías de inmunofluorescencia contra S100B sobre cultivos mixtos donde se observa que la HI induce un cambio morfológico astrocitario que puede ser prevenido por el tratamiento con anticuerpos anti-S100B. b) Cuantificación del porcentaje de astrocitos con morfología filamentosa. Los gráficos representan la media de este parámetro \pm SEM. La significancia entre tratamientos fue evaluada por ANOVA de dos vías y post-test de Bonferroni: $**p < 0,01$.

El bloqueo de RAGE previene la retracción de las prolongaciones neuronales inducida por la HI *in vitro*.

Para continuar con el estudio de la participación de la vía de señalización S100B/RAGE/NF- κ B en las alteraciones en astrocitos y neuronas que se inducen luego de la HI, se realizaron ensayos de pérdida de función con un anticuerpo neutralizante de RAGE. Basándonos en los resultados *in vivo* que mostraban una inducción de la expresión de RAGE en neuronas hipocampales luego de la HI (Avilés Reyes, Angelo y cols., 2010), realizamos experimentos *in vitro* exponiendo los cultivos mixtos hipocampales a ciclos de HI y estudiamos los efectos del bloqueo de RAGE con los anticuerpos neutralizantes. Para analizar los efectos del bloqueo de RAGE sobre la morfología neuronal, estudiamos la longitud de las neuritas en los cultivos pretratados con el anticuerpo anti-RAGE. Este análisis mostró que la retracción de neuritas inducida por la exposición a HI puede ser prevenida por el tratamiento con el anticuerpo neutralizante de RAGE (Figura 27). Si bien estos cultivos difieren de la situación *in vivo*, ya que expresan basalmente niveles importantes de RAGE en neuronas, este resultado sugiere que RAGE podría estar implicado en las alteraciones neuronales inducidas por la HI.

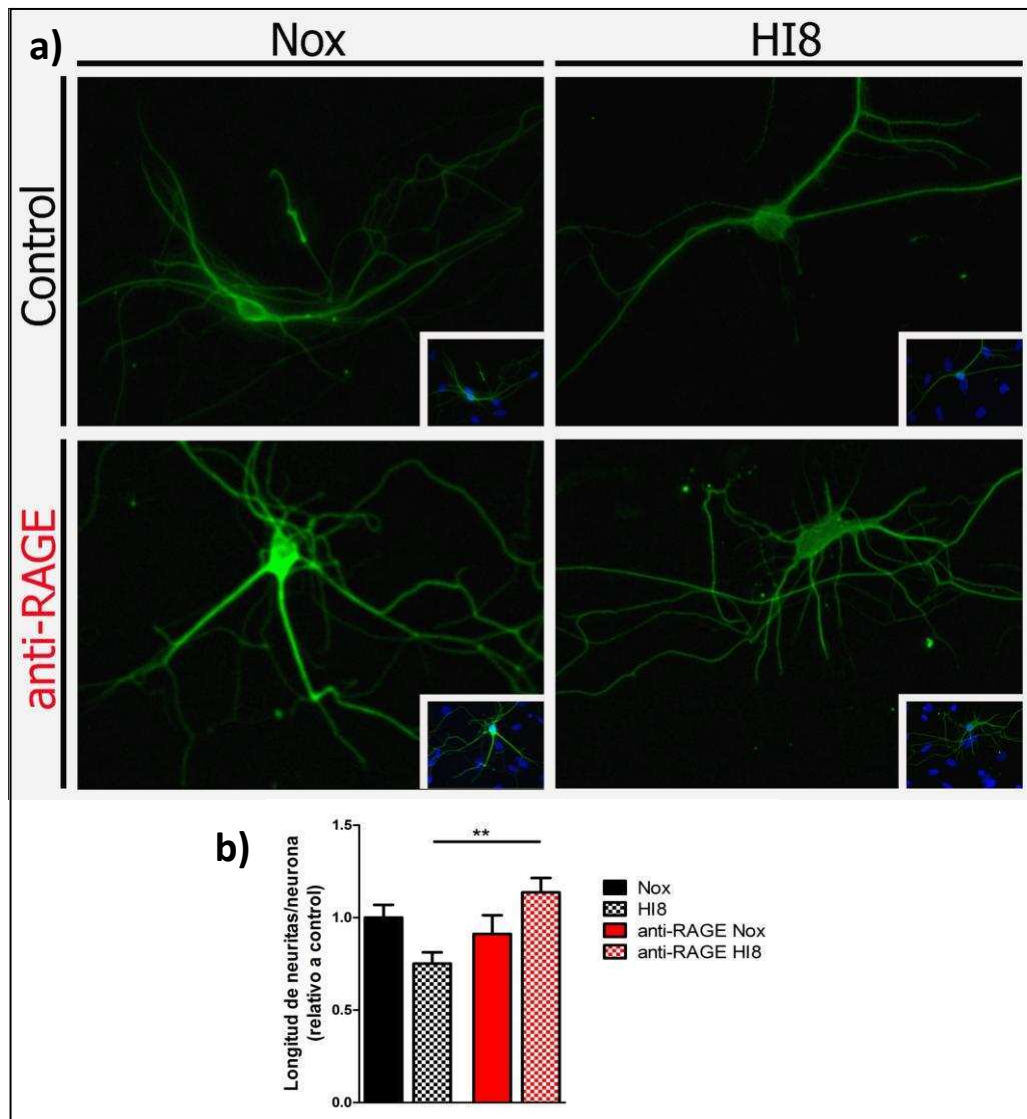


Figura 27: a) Fotomicrografía de inmunofluorescencia con el anticuerpo anti- β III-tubulina de cultivos mixtos sometidos a HI. Se observa que la HI induce una retracción en las neuritas que puede ser prevenida por el tratamiento con el anticuerpo anti-RAGE. Los *insets* muestran la tinción con anti- β III-tubulina y el colorante nuclear Hoechst 33342, en las que se puede evidenciar la presencia de otros tipos celulares. b) Cuantificación de la longitud promedio de neuritas por neurona. El gráfico representa la media de este parámetro \pm SEM. La significancia entre tratamientos fue evaluada por ANOVA de dos vías y post-test de Bonferroni: ** $p < 0,01$.

En astrocitos, el bloqueo de RAGE previene la *stellation* inducida por la HI *in vitro*.

La activación de RAGE en astrocitos primarios *in vitro* activa un programa de cambios gliales que se asemejan a los inducidos por la gliosis reactiva *in vivo*. Así, la activación de RAGE induce una *stellation* que parece ser dependiente de la activación de las pequeñas GTPasas Rac1 y Cdc42 (Villarreal y cols., 2013), induce un aumento en la tasa de división celular, aumenta la expresión de iNOS y de mediadores proinflamatorios (Ponath y cols., 2007). Con el objetivo de profundizar en el estudio de

la participación de esta ruta S100B/RAGE en la gliosis reactiva inducida por la HI desarrollamos estudios de pérdida de función bloqueando RAGE con anticuerpos neutralizantes. Para ello se analizó la morfología de las células GFAP+ expuestas a HI en presencia de anticuerpos neutralizantes de RAGE o un anticuerpo control del mismo isotipo. Este análisis mostró que la *stellation* que se produce por la exposición a HI puede ser prevenida con el pretratamiento con el anticuerpo anti-RAGE (Figura 28). Este resultado sugiere que la activación de RAGE estaría implicada en la *stellation* que se induce en astrocitos expuestos a HI.

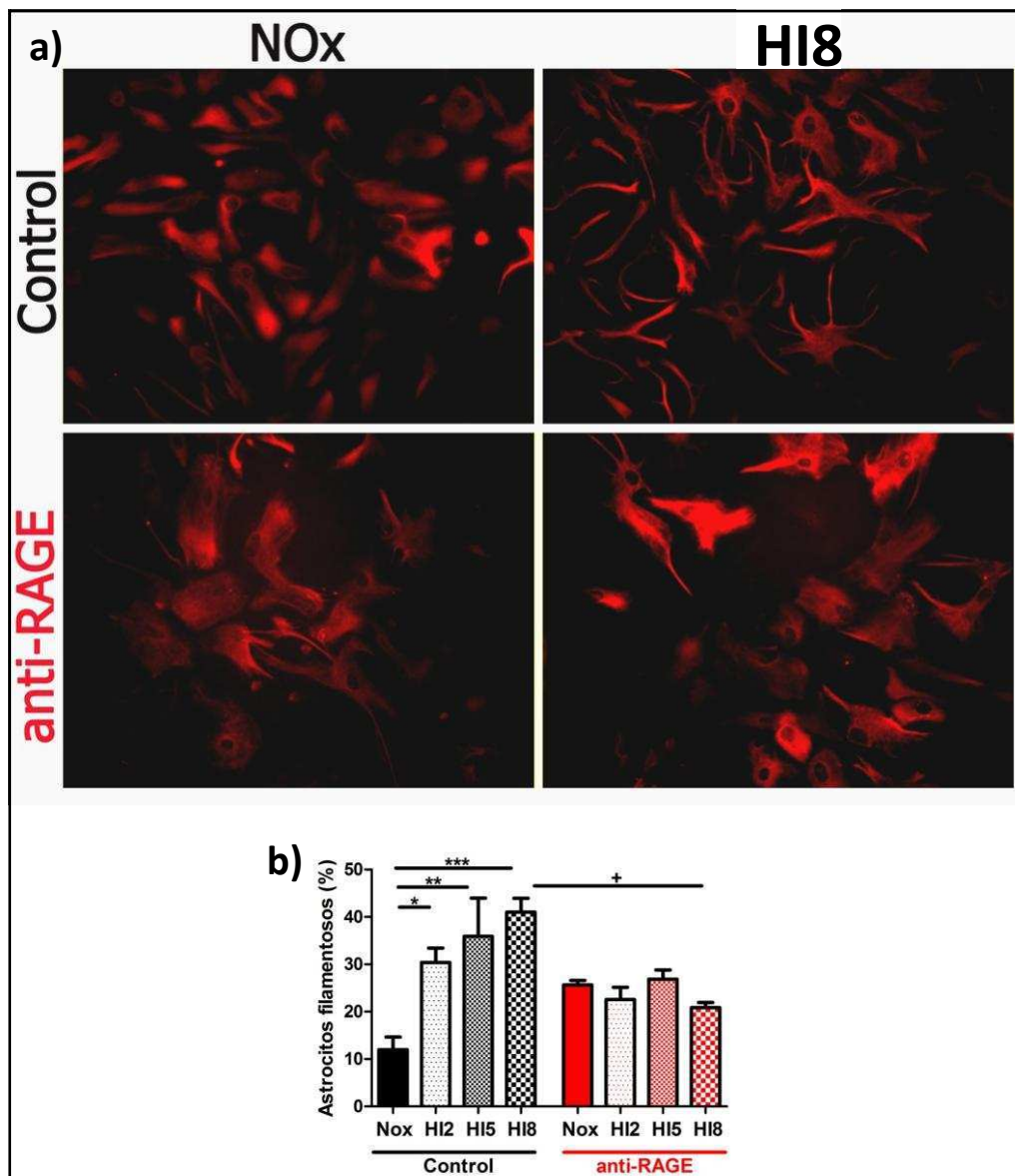


Figura 28: a) Fotomicrografías de inmunofluorescencia contra GFAP sobre cultivos mixtos donde se observa que la HI induce un cambio morfológico en los astrocitos que puede ser prevenido por el tratamiento con anticuerpos neutralizantes de RAGE. Magnificación primaria 200X. **b)** Cuantificación del porcentaje de astrocitos con morfología filamentososa. Los gráficos representan la media del parámetro indicado \pm SEM. La significancia entre tratamientos fue evaluada por ANOVA de dos vías y post-test de Bonferroni: *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * y + $p < 0,05$.

La expresión del dominante negativo de RAGE (RAGE Δ cyt) previene los cambios en la morfología glial inducidos por la HI.

Si bien el uso de anticuerpos neutralizantes está extendido y es muy empleado en la literatura para ensayos de pérdida de función, decidimos desarrollar un vector viral que se pudiera emplear tanto *in vitro* como *in vivo* para lograr la entrega de una versión defectiva de RAGE que carece de dominio citoplasmático (RAGE Δ cyt), y que en los hechos funcionaría como un dominante negativo capturando ligandos de RAGE sobre la membrana plasmática pero impidiendo la transducción de señales. El vector viral utilizado (amplicón derivado de HSV, ver materiales y métodos) resultó tener un tropismo específico por neuronas *in vivo*, pero en cultivos mixtos fue capaz de infectar tanto neuronas como células de la glía. Por lo tanto utilizamos este vector para la entrega de un plásmido bicistrónico que expresa RAGE Δ Cyt y GFP como dos proteínas independientes para poder seguir las células efectivamente infectadas y que expresan el dominante negativo. *In vitro*, los estudios se desarrollaron comarcando con β III-tubulina para identificar el tipo celular que expresaba RAGE Δ Cyt. Como control, se utilizó un vector viral idéntico pero que codifica GFP y LacZ.

Los cultivos primarios mixtos fueron infectados 48hs antes de la exposición a HI con el vector viral codificante para RAGE- Δ Cyt o el vector viral control. Luego de 24hs de finalizada la exposición a HI se realizó la técnica de inmunofluorescencia con un anticuerpo contra β III-Tubulina y se estudió la morfología de las células infectadas (evidenciadas por GFP, ver Materiales y Métodos) que resultaron negativas para esta inmunotinción específica para neuronas y por lo tanto son células gliales. Se observó que en los cultivos expuestos a HI las células gliales sufrieron *stellation* tal como ocurre en ausencia de infección viral. Estos cambios morfológicos no ocurrieron en las células infectadas que sobreexpresan RAGE Δ Cyt, mientras que se observó el cambio hacia la morfología estrellada en las células que expresan el vector control (Figura 29).

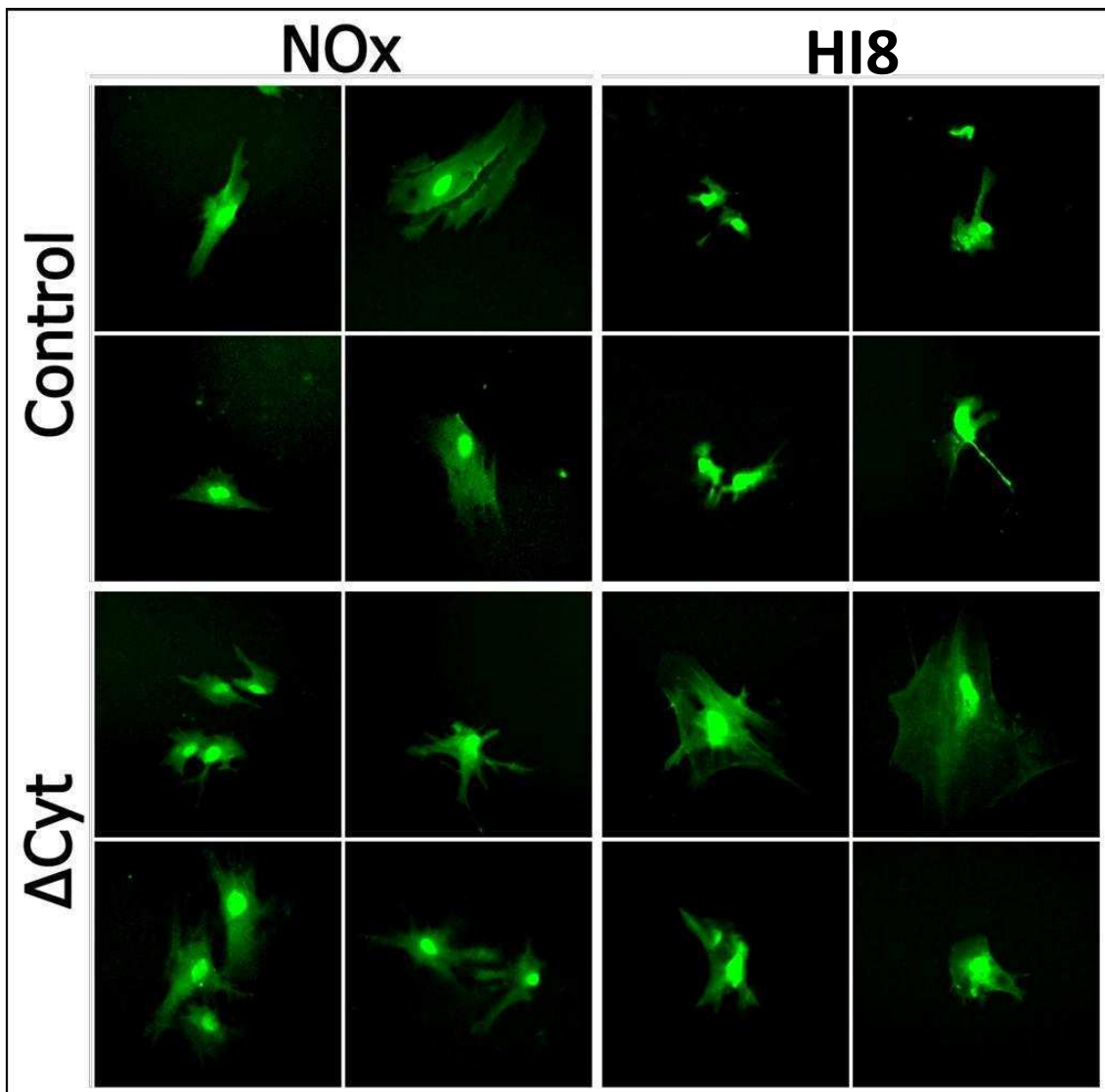


Figura 29: Fotomicrografías de las células infectadas con el vector codificante para la versión de RAGE sin dominio citoplasmático (Δ cyt) y con un vector control. Las células que se muestran en el panel resultaron negativas para la inmunofluorescencia contra β III-tubulina. Obsérvese el cambio hacia la morfología filamentososa de las células gliales expuestas a HI que puede ser prevenida con la infección del vector portador de la secuencia Δ cyt.

El bloqueo de NF- κ B *in vitro* previene los cambios morfológicos inducidos por la exposición a HI en astrocitos.

Siguiendo con la estrategia del bloqueo secuencial de los diferentes pasos de la ruta S100B/RAGE/NF- κ B, estudiamos el requerimiento de NF- κ B para el fenómeno de *stellation* observado en los astrocitos de cultivos mixtos cuando fueron expuestos a HI. Para ello decidimos bloquear la activación de este factor de transcripción con el compuesto comercial BAY117082 (BAY) que es un inhibidor de la fosforilación de I κ B- α . Los cultivos primarios mixtos fueron tratados con 2 μ m de BAY previamente a la

exposición a HI y el compuesto permaneció durante todo el periodo de exposición a HI. Luego de 24hs de finalizada la HI, los cultivos fueron fijados y se realizó la técnica de inmunofluorescencia con un anticuerpo anti-S100B para poder estudiar la morfología astrocitaria. Este análisis mostró que el tratamiento con BAY es efectivo para prevenir la conversión de los astrocitos hacia la morfología estrellada típica del proceso de *stellation* descrito en las secciones anteriores (Figura 30). En condiciones de normoxia, la exposición a BAY mostró una tendencia a inducir la morfología estrellada, que no alcanzó diferencia estadísticamente significativa con respecto a los cultivos del grupo control.

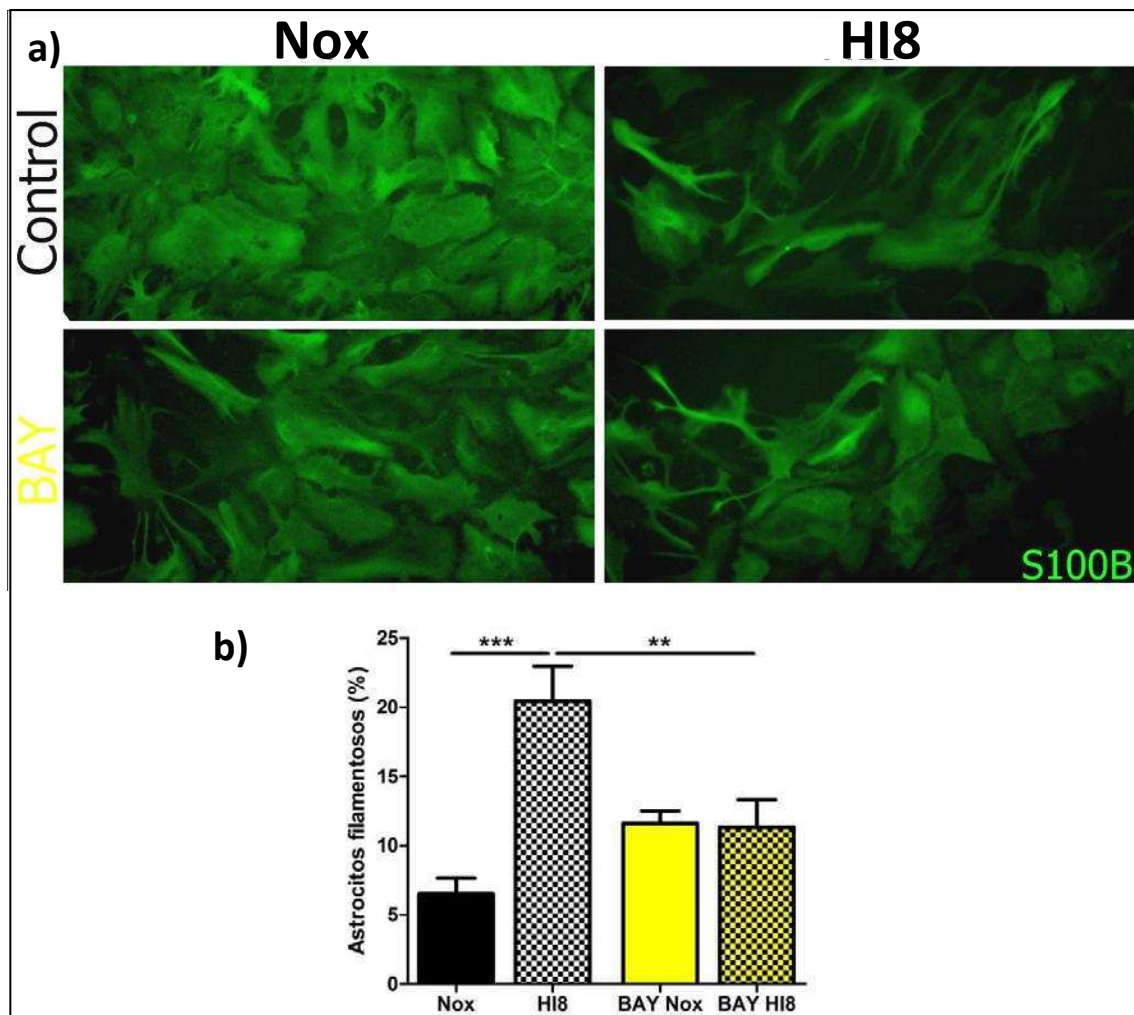


Figura 30: a) Fotomicrografías de la inmunotinción con anticuerpos anti-S100B en cultivos primarios mixtos sometidos a HI y pretratados con BAY que permiten observar la morfología celular de los astrocitos S100B+. Magnificación primaria 200X. b) Cuantificación del porcentaje de astrocitos filamentosos en cada uno de los tratamientos. Las barras representan la media del parámetro indicado \pm SEM. La significancia entre tratamientos fue evaluada por ANOVA de dos vías y post-test de Bonferroni: *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$.

La proteína kinasa B, conocida también como Akt, ha sido implicada en la activación de NF- κ B ya que su propia activación conduce a la fosforilación y activación de las subunidades p65 y p50 y además puede activar IKK (Koul y cols., 2001; Madrid y cols., 2000; 2001; Sizemore y cols., 1999). Para investigar si Akt estaba involucrada en los cambios de la morfología astrocitaria inducidos por HI, cultivos primarios mixtos fueron pretratados con el inhibidor comercial de Akt, LY 294002 (LY). El análisis morfológico de los astrocitos mostró que LY es capaz de prevenir los cambios morfológicos típicos del proceso de *stellation* que se inducen por la HI (Figura 31). Este resultado sugiere que Akt estaría involucrado en la vía de señalización que induce *stellation* luego de la exposición a HI y probablemente se encuentre localizada *upstream* de NF- κ B en la cascada de señalización.

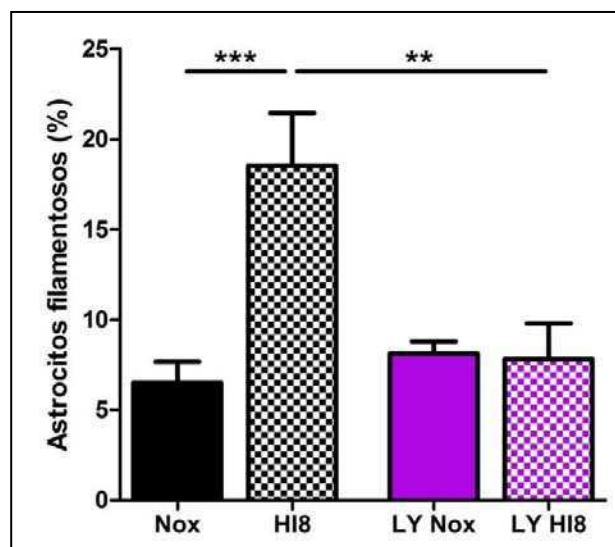


Figura 31: Cuantificación del porcentaje de astrocitos filamentosos en cada uno de los tratamientos. Los gráficos representan la media del parámetro indicado \pm SEM. La significancia entre tratamientos fue evaluada por ANOVA de dos vías y post-test de Bonferroni: *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$.

Estudios de ganancia y pérdida de función *in vivo* sobre la vía de señalización S100B/RAGE/NF- κ B.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos *in vitro* en los ensayos de pérdida y ganancia de función decidimos realizar estudios similares *in vivo* para investigar si el bloqueo de la activación de la vía de señalización S100B/RAGE/NF- κ B era capaz de disminuir las alteraciones que se inducen en animales expuestos a HI y por lo tanto podrían tener utilidad para el desarrollo futuro de nuevas estrategias terapéuticas para el tratamiento de la AS. Para ello, se trabajó con una exposición a HI de tres días de duración (HI3), tiempo al cual se observaban los mayores signos de alteraciones neuronales y gliales. Para evitar los problemas que presentan algunos de los compuestos para atravesar la barrera hematoencefálica, los distintos tratamientos se administraron por inyecciones estereotáxicas intrahipocampales. En el caso de los bloqueantes, las inyecciones se realizaron cada día previamente al comienzo de la exposición a HI a través de cánulas implantadas y fijadas en el cráneo de los animales (Ver sección Materiales y Métodos). Para administrar los vectores, se realizó una única inyección 2 días antes de comenzar la hipoxia ya que la máxima expresión de los plásmidos contenidos en el vector viral se alcanza luego de las 48-72 hs post infección (Adrover y cols., 2003). Con estos ensayos se obtuvieron los resultados que se describen a continuación.

Participación de S100B en las alteraciones neuronales y gliales inducidas por la exposición a HI.

- **El bloqueo de S100B no previene las alteraciones neuronales inducidas por la HI *in vivo*.**

Los estudios que desarrollamos durante la descripción del modelo de AS por HI *in vivo* nos permitieron evidenciar que las neuronas hipocampales sufren alteraciones neurodegenerativas, las cuales se evidenciaron por cambios en la localización

subcelular de la proteína específica neuronal NeuN (Avilés Reyes, Angelo y cols., 2010). NeuN es probablemente un factor de transcripción (Mullen y cols., 1992; Lind y cols., 2005) o una proteína involucrada en la regulación del *splicing* alternativo (Kim y cols., 2009; Dent y cols., 2010) y tal como se describió originalmente en Robertson y cols., (2006) en otro modelo experimental, esta proteína se moviliza desde el núcleo al citoplasma durante fenómenos de neurodegeneración con cierta capacidad de reversibilidad y por lo tanto indicarían una alteración neuronal que, de persistir, lleva a la muerte neuronal (Ünal-Çevik y cols., 2004).

Utilizando esa tipificación del estadio de neurodegeneración estudiamos el efecto del bloqueo de los diferentes miembros de la ruta S100B/RAGE/NF- κ B en la relación entre neuronas normales y las que presentaban localización atípica de NeuN. Para facilitar la interpretación de los gráficos se muestra el porcentaje de neuronas con marcación normal (nuclear intensa y leve citoplasmática) para NeuN.

En el primer experimento estudiamos el efecto del bloqueo de S100B en las alteraciones neuronales inducida por la exposición a HI. Para ello los animales fueron inyectados intrahipocampalmente con el anticuerpo bloqueante de S100B o el control isotópico correspondiente y expuestos a normoxia o ciclos de HI. Los resultados mostraron que el bloqueo de S100B no induce diferencias estadísticamente significativas en las alteraciones neuronales inducidas por la HI. En condiciones de normoxia, el bloqueo de S100B muestra una tendencia a reducir el porcentaje de neuronas normales, que no alcanza significancia estadística (Figura 32).

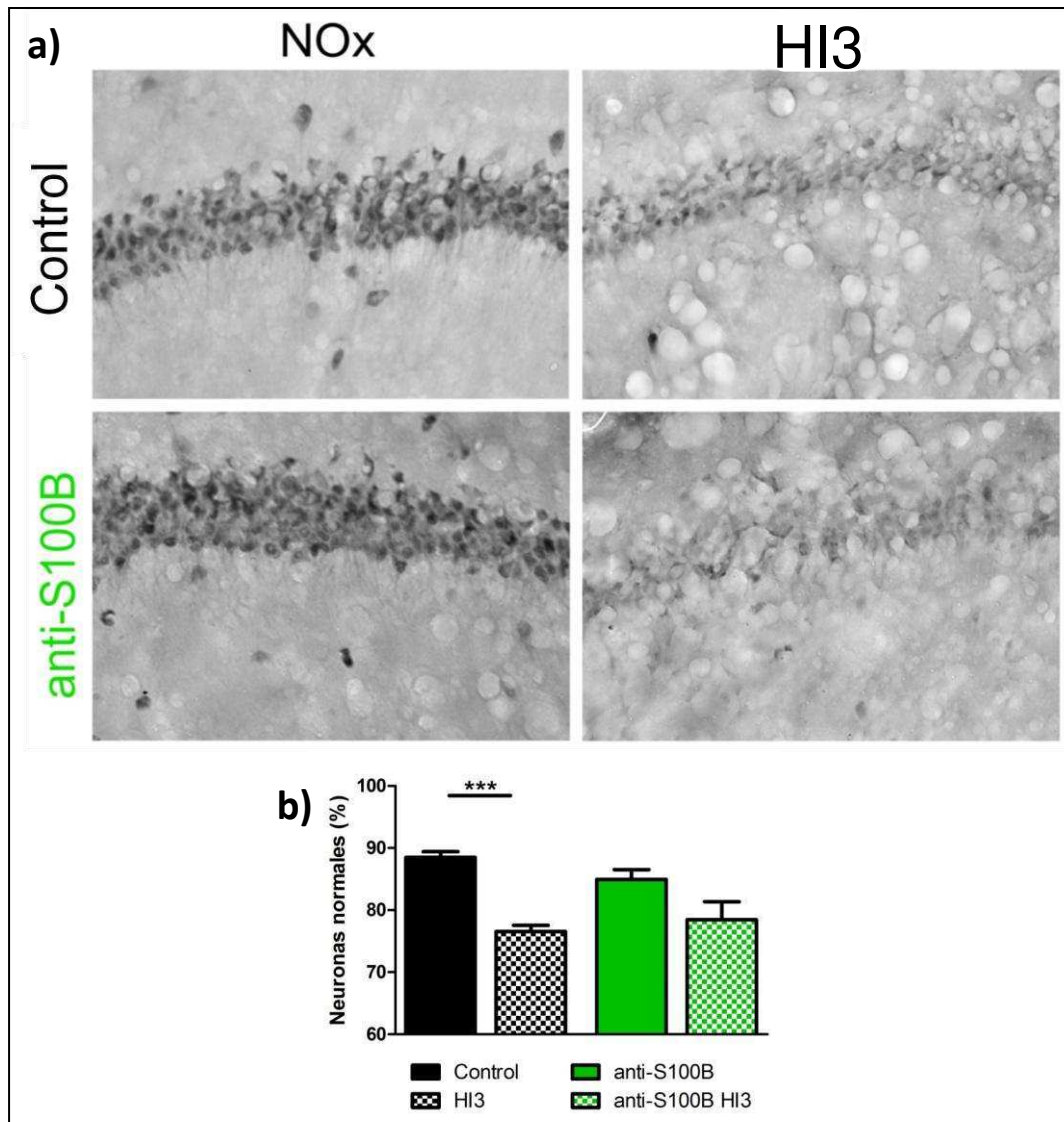


Figura 32: a) Fotomicrografías mostrando los efectos de la HI y el pretratamiento con anticuerpos anti-S100B sobre la inmunomarcación para NeuN en células del área CA1 del hipocampo. b) Cuantificación del porcentaje de neuronas normales para cada uno de los tratamientos. Los gráficos representan la media del parámetro indicado \pm SEM. La significancia entre tratamientos fue evaluada por ANOVA de dos vías y post-test de Bonferroni: *** $p < 0,001$.

- **El bloqueo de S100B previene la gliosis reactiva inducida por la HI *in vivo*.**

Teniendo en cuenta la gliosis reactiva que se observó en animales expuestos a HI, decidimos investigar la participación de S100B sobre los cambios inducidos en la morfología glial de estos animales. Para ello, realizamos experimentos de inmunohistoquímica para el marcador astrocitario GFAP en los animales inyectados intrahipocampalmente con anti-S100B previamente al inicio de la exposición. El análisis de la superficie ocupada por los astrocitos, que es un índice de la gliosis reactiva ya que detecta hipertrofia/hiperplasia astrocitaria, mostró una disminución de

la astrogliosis inducida por HI en animales pretratados con el anticuerpo bloqueante de S100B con respecto a los inyectados con anticuerpo control isotópico. En condiciones normóxicas el tratamiento con anti-S100B induce gliosis reactiva *per se* (Figura 33). Estos resultados sugieren que S100B estaría implicado en la inducción de la gliosis reactiva observada en animales expuestos a HI, actuando probablemente en forma autócrina sobre los mismos astrocitos.

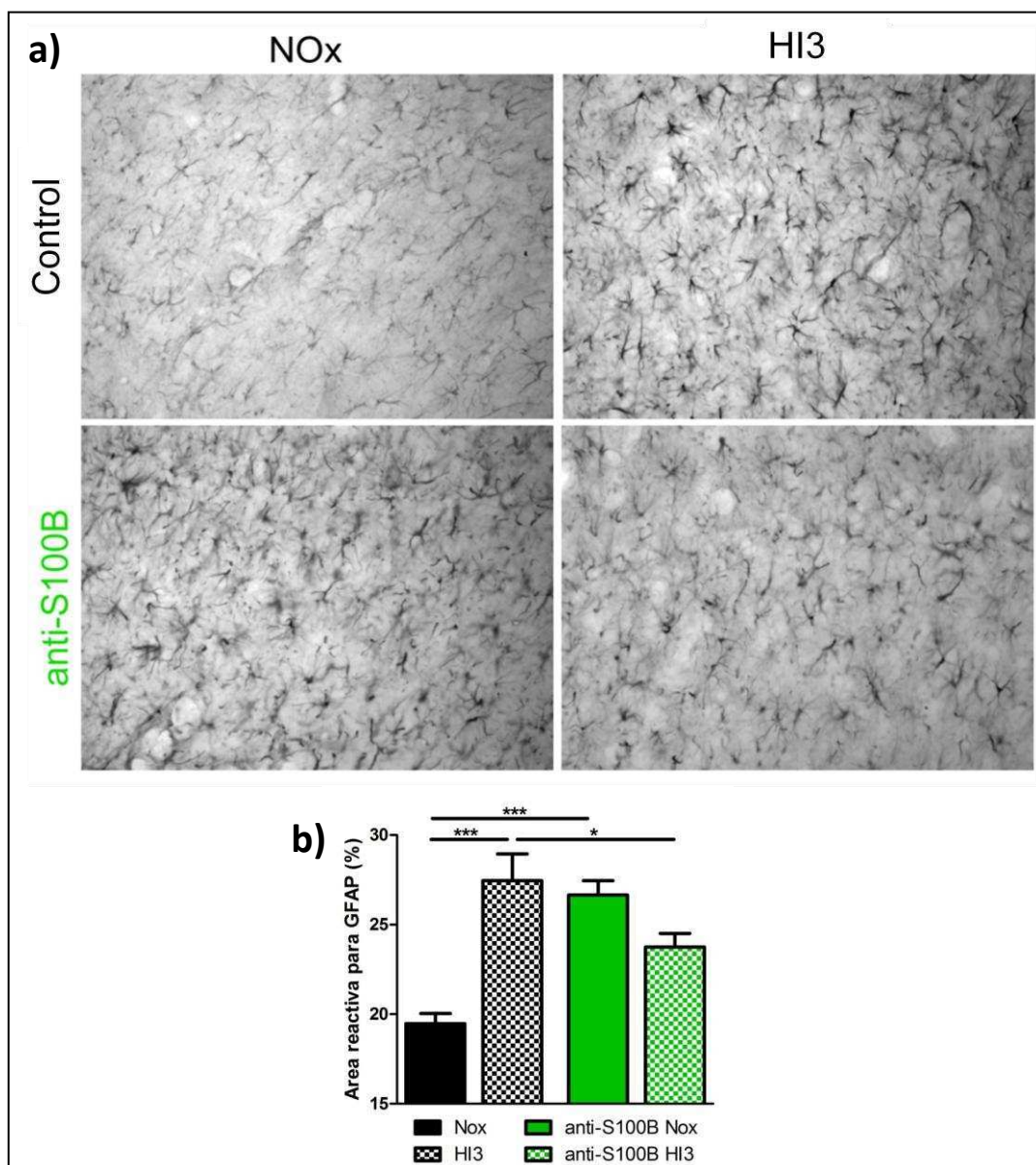


Figura 33: a) Fotomicrografías mostrando los efectos de la HI y el pretratamiento con anticuerpos anti-S100B sobre la activación de la glía en el área CA1 del hipocampo. Magnificación primaria 100x. b) Cuantificación del porcentaje de área reactiva para GFAP por campo microscópico. Los gráficos representan la media del parámetro indicado \pm SEM. La significancia entre tratamientos fue evaluada por ANOVA de dos vías y post-test de Bonferroni: *** $p < 0,001$; * $p < 0,05$.

Participación de RAGE en las alteraciones neuronales y gliales inducidas por la exposición a HI.

- **El bloqueo de RAGE previene las alteraciones neuronales inducidas por HI *in vivo*.**

Dado que en los estudios *in vitro* los cambios en la morfología neuronal inducidos por la HI se vieron prevenidos por el bloqueo de RAGE, decidimos estudiar los efectos de este bloqueo *in vivo*. Para ello se inyectaron animales con el anticuerpo bloqueante de RAGE inmediatamente antes de la exposición a HI.

El análisis de la distribución subcelular del marcador NeuN reveló que el pretratamiento con anticuerpos neutralizantes de RAGE previene las alteraciones neuronales que se reflejan como cambios en la distribución normal del marcador NeuN. Los animales normóxicos pretratados con anti-RAGE mostraron un grado mayor de alteraciones que los animales pretratados con anticuerpo control, ya sean expuestos a HI o incluso a normoxia (Figura 34). Este resultado indica que RAGE estaría involucrado en la vía de señalización que induce las alteraciones neuronales inducidas por la HI, pero su bloqueo en condiciones de normoxia induce neurodegeneración.

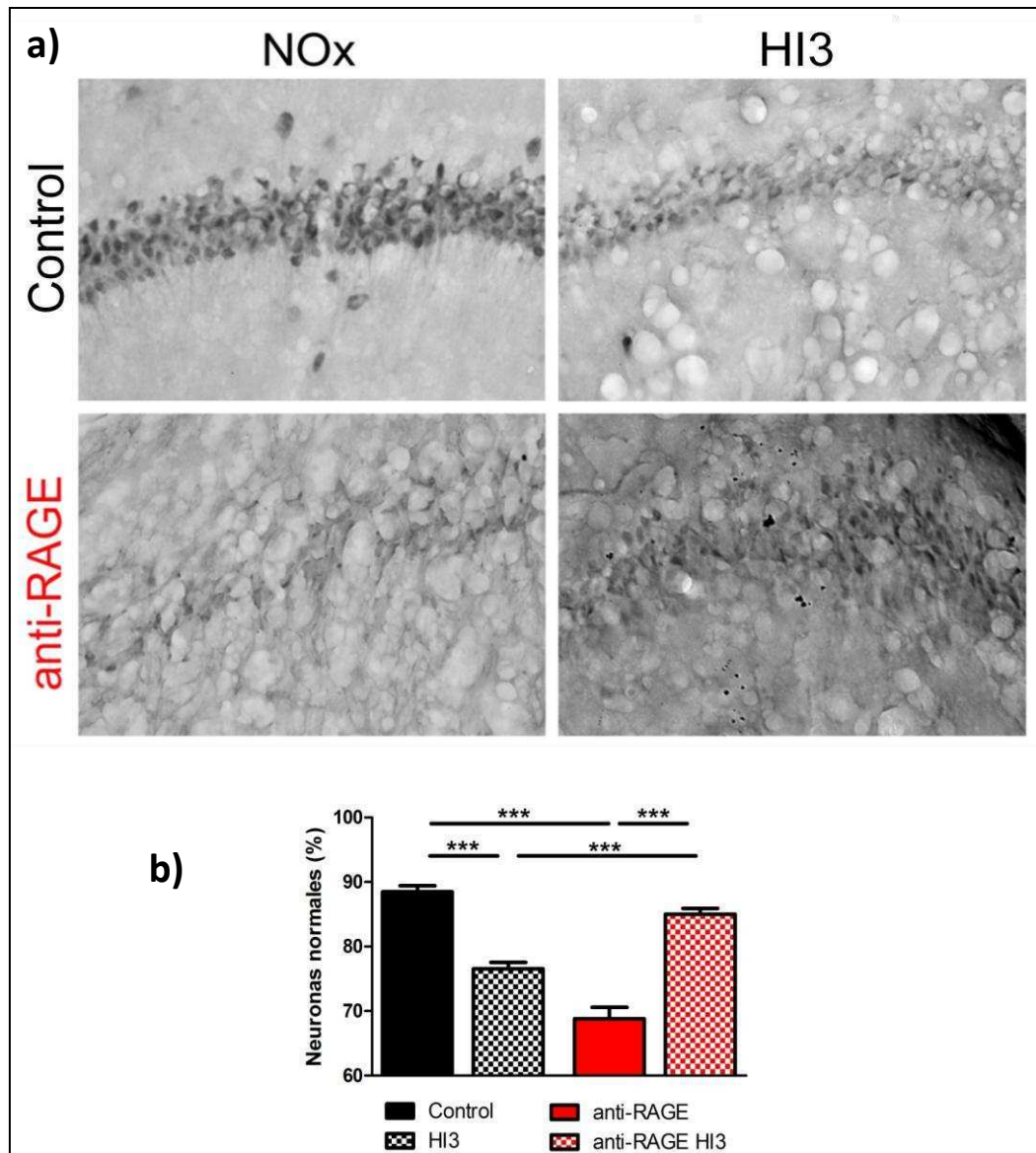


Figura 34: a) Fotomicrografías mostrando los efectos de la HI y el pretratamiento con anticuerpos anti-RAGE sobre la inmunomarcación para NeuN en células del área CA1 del hipocampo. Magnificación primaria 100x. b) Cuantificación del porcentaje de neuronas normales para cada uno de los tratamientos. Los gráficos representan la media del parámetro indicado \pm SEM. La significancia entre tratamientos fue evaluada por ANOVA de dos vías y post-test de Bonferroni: *** $p < 0,001$.

- **Anticuerpos anti-RAGE previenen la gliosis reactiva inducida por la HI *in vivo*.**

Teniendo en cuenta que el bloqueo de RAGE *in vitro* fue capaz de prevenir la *stellation* (correlato *in vitro* de la gliosis reactiva) inducida por la HI, decidimos estudiar si este bloqueo también era capaz de prevenir la gliosis reactiva observada en los animales luego de la exposición a HI. Para ello, se estudió la morfología glial por inmunohistoquímica contra GFAP en los animales inyectados intrahipocampalmente

con anti-RAGE previamente a la exposición a HI. Este análisis mostró un aumento en el área reactiva para GFAP en los animales expuestos a HI, tal como habíamos descrito (Avilés Reyes, Angelo y cols., 2010). La administración de los anticuerpos bloqueantes de RAGE disminuyó la intensidad de gliosis reactiva en animales expuestos a HI mientras el pretratamiento con este anticuerpo indujo gliosis reactiva *per se* en animales no expuestos a HI (Figura 35). Este resultado indica que RAGE está involucrado en la gliosis reactiva inducida por la HI pero que su actividad es necesaria en condiciones de normoxia para mantener la normal morfología glial.

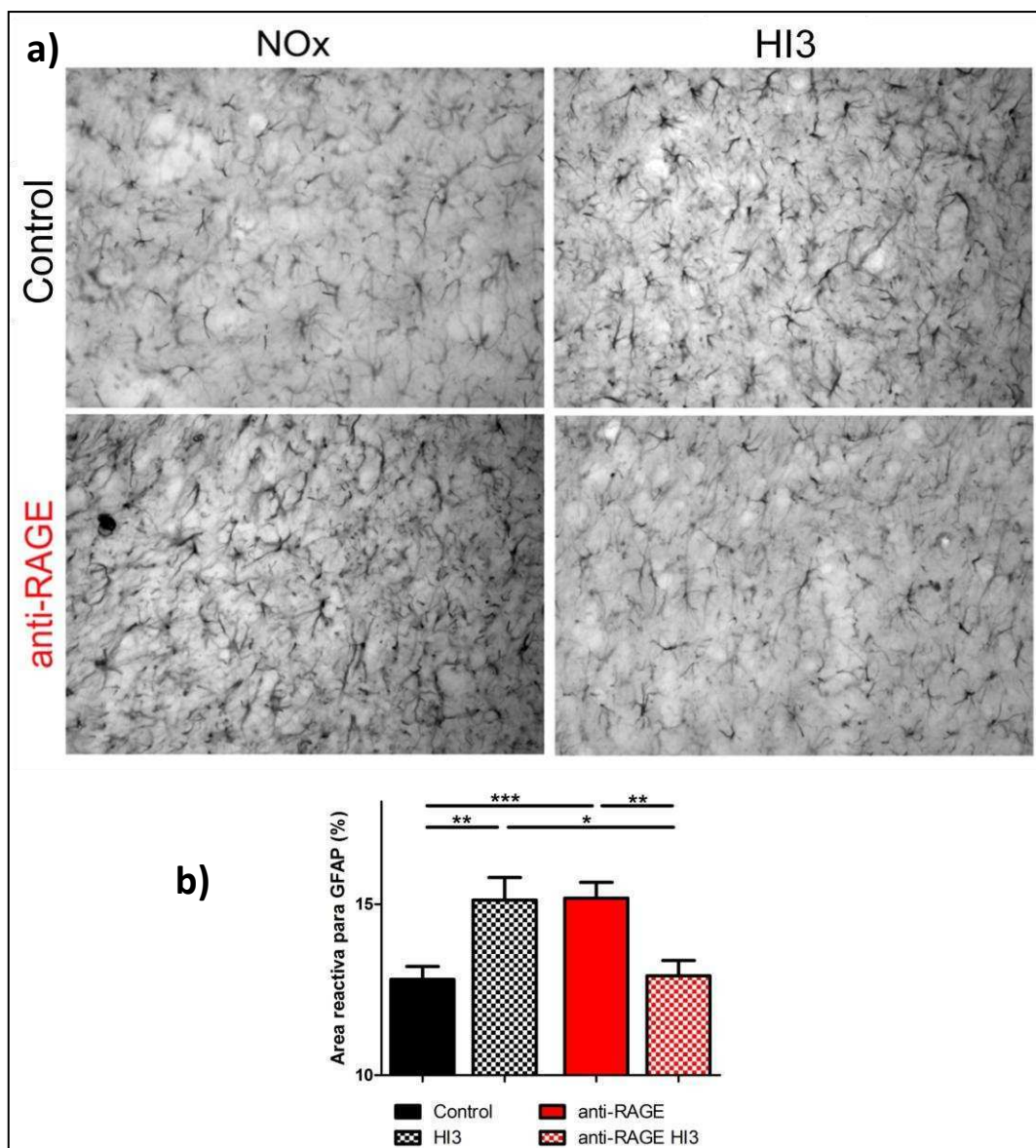


Figura 35: a) Fotomicrografías mostrando los efectos de la HI y el pretratamiento con anticuerpos anti-GFAP sobre la activación de la glía en el área CA1 del hipocampo. Magnificación primaria 100x. b) Cuantificación del porcentaje de área reactiva para GFAP. Los gráficos representan la media del parámetro indicado \pm SEM. La significancia entre tratamientos fue evaluada por ANOVA dos vías y post-test de Bonferroni: *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$.

- **La expresión de RAGE pero no de RAGE- Δ cyt induce alteraciones neuronales en ausencia de injuria *in vivo*.**

Nuestros resultados indicaban que la actividad de RAGE parece ser determinante para la sobrevivencia neuronal luego de la exposición a HI. Un resultado similar habíamos evidenciado en un trabajo previo *in vitro* utilizando neuronas corticales primarias expuestas a stress excitotóxico por glutamato (Villarreal y cols., 2011). Considerando estos antecedentes y con el objetivo de mejorar los ensayos de pérdida de función para determinar la importancia de RAGE en las alteraciones neuronales, pero también explorar una potencial proyección terapéutica de nuestro trabajo desarrollamos vectores virales amplicones derivados de HSV que sobreexpresan RAGE nativo (RAGE-FL) o RAGE- Δ cyt. Con estos virus realizamos experimentos *in vivo* de ganancia de función, sobreexpresando RAGE-FL o RAGE- Δ cyt en animales controles *naïve* (no expuestos a HI) para analizar el efecto de la sobreexpresión de RAGE en ausencia de daño. Para mejorar la visualización de las características morfológicas de las neuronas infectadas, se realizó una inmunohistoquímica contra GFP y se estudió la morfología de las células infectadas. Este análisis mostró que los animales que recibieron las partículas virales que inducen la expresión de RAGE-FL presentan una morfología neuronal alterada en las neuronas infectadas, mientras que las neuronas infectadas en los animales que recibieron el dominante negativo RAGE- Δ cyt no presentan estas alteraciones (Figura 36).

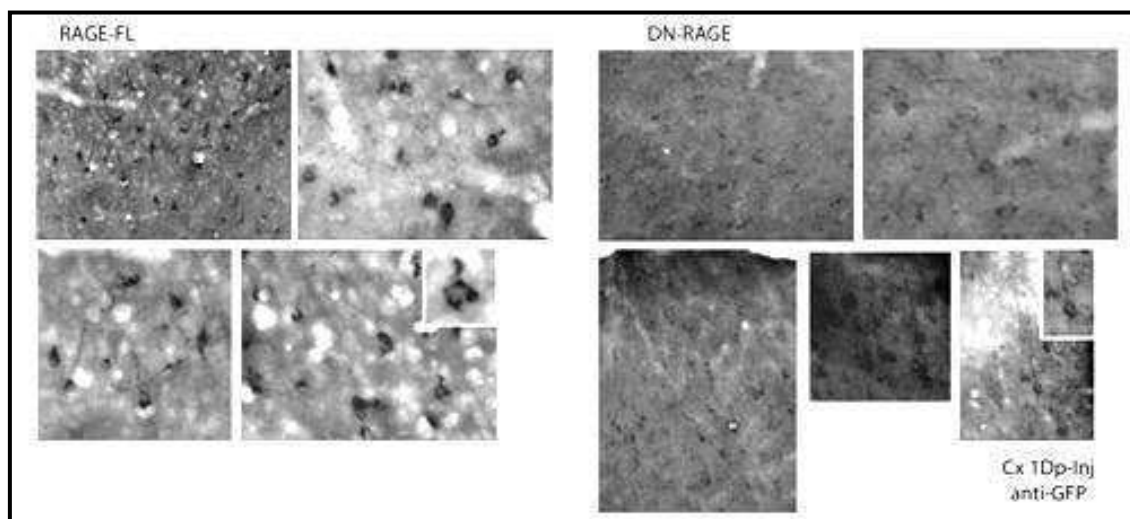


Figura 36: Fotomicrografías de inmunohistoquímica contra GFP mostrando alteraciones de la morfología neuronal en animales *naïve* que sobreexpresan RAGE-FL. Magnificación primaria 100x.

Los ensayos de pérdida de función utilizando anticuerpos neutralizantes nos orientaron acerca del requerimiento de RAGE para el desarrollo de las alteraciones neuronales y la gliosis reactiva luego de la exposición a HI tanto *in vitro* como *in vivo*. Considerando estos resultados y los obtenidos a partir de las infecciones con los vectores que sobre-expresan RAGE-FL y RAGE- Δ Cyt en animales *naïve*, decidimos investigar los efectos de la infección con dichos vectores en animales expuestos a HI. Para ello, infectamos animales con los vectores RAGE-FL, RAGE- Δ cyt o vector control (A2Z) y 48 hs después comenzamos la exposición a los ciclos de hipoxia. El análisis de la inmunomarcación para NeuN en microscopia confocal mostró una mayor cantidad de núcleos neuronales en los animales infectados con RAGE- Δ cyt, mientras que en el caso de los animales infectados con RAGE-FL hubo una disminución tanto de los núcleos neuronales como de los núcleos totales (estudiados por la marcación de Hoechst 33342), aunque en ningún caso se alcanzaron diferencias estadísticamente significativas (Figura 37).

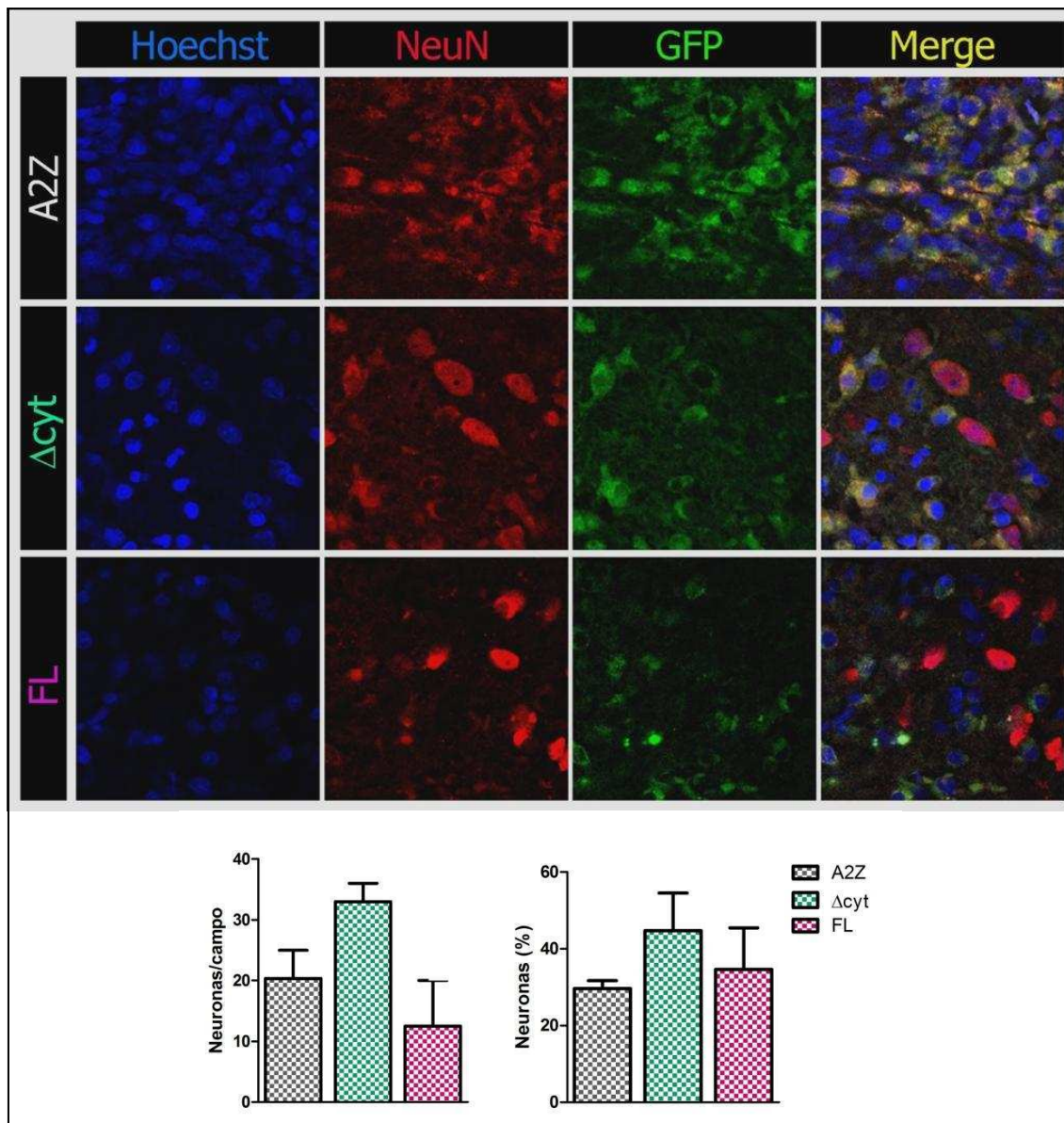


Figura 37: a) Fotografías de microscopía confocal de los cortes de tejido de los animales infectados con los distintos vectores y sometidos a HI. **b)** Cuantificación de neuronas y porcentaje de neuronas sobre células totales de los cortes de animales infectados y sometidos a HI. La significancia entre tratamientos fue evaluada por ANOVA de una vía y se realizó el post-test de Student-Newman-Keuls.

Modulación de NF- κ B *in vivo*.

- **La Sulfasalazina inhibe la translocación nuclear de p65 *in vivo*.**

La Sfz es un potente inhibidor de NF- κ B (Wahl y cols. 1998), que actúa directamente sobre el complejo I κ B kinasa (IKK) inhibiendo la fosforilación de I κ B (Weber y cols., 2000) y por lo tanto su degradación por el proteosoma, resultando en una retención de NF- κ B en el citoplasma y la inhibición de la activación de la transcripción NF- κ B dependiente.

Ya que la Sfz atraviesa la BHE con muy baja eficiencia (Liu y cols., 2012) y su administración sistémica produce el bloqueo periférico de NF- κ B, lo que complica la evaluación de sus efectos en el SNC, decidimos administrar la droga intrahipocampalmente. Los animales recibieron por esa vía Sfz en una dosis de 1,25mM. Un grupo de animales fue sacrificado para verificar si efectivamente la Sfz administrada por esa ruta era capaz de inhibir la localización nuclear de NF- κ B, indicando el efecto de bloqueo del factor de transcripción. La localización nuclear o citoplasmática de la subunidad p65 de NF- κ B, fue verificada por inmunohistoquímica. En los animales expuestos a HI, se observó una disminución en la marcación nuclear de p65 en animales tratados con Sfz con respecto a los inyectados con vehículo (Figura 38). Este resultado sugiere que la Sfz es capaz de bloquear la activación de NF- κ B inducida por la HI *in vivo*, reteniendo al factor de transcripción en el citoplasma.

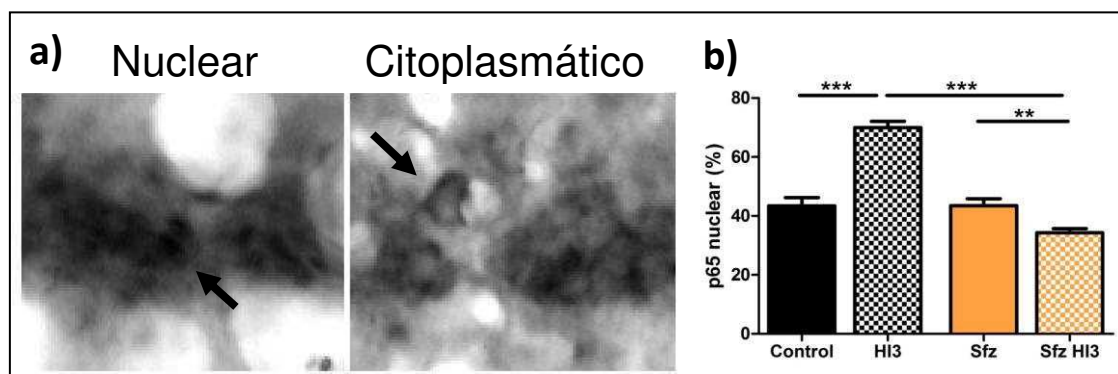


Figura 38: a) Fotomicrografías de la inmunomarcación con un anticuerpo anti-p65 que permite observar los diferentes tipos de marcación: nuclear y citoplasmática (según se indica en cada caso). Magnificación primaria 1000x. b) Análisis cuantitativo de la localización subcelular de p65 mostrando el porcentaje de células que muestran p65 en el núcleo celular. Las barras en los gráficos representan la media del parámetro indicado \pm SEM. La significancia entre tratamientos fue evaluada por ANOVA dos vías y post-test de Bonferroni: *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$

- **El bloqueo de NF- κ B previene las alteraciones neuronales inducidas por la HI *in vivo*.**

Luego de verificar la inhibición de la translocación nuclear de NF- κ B que se induce por el tratamiento con Sfz, se estudió el efecto de este bloqueo sobre las alteraciones neuronales inducidas por la exposición a HI. El estudio de la morfología nuclear de las neuronas por inmunohistoquímica con el anticuerpo anti-NeuN mostró una disminución de las alteraciones en la distribución de este marcador en los

animales hipóxicos pretratados con Sfz. El pretratamiento con Sfz en animales normóxicos indujo un aumento en la cantidad de neuronas con morfología nuclear anormal (Figura 39). Este resultado sugiere que NF- κ B se encuentra implicado en los cambios neuronales inducidos por HI, pero que la activación basal de este factor de transcripción sería fundamental en condiciones normales.

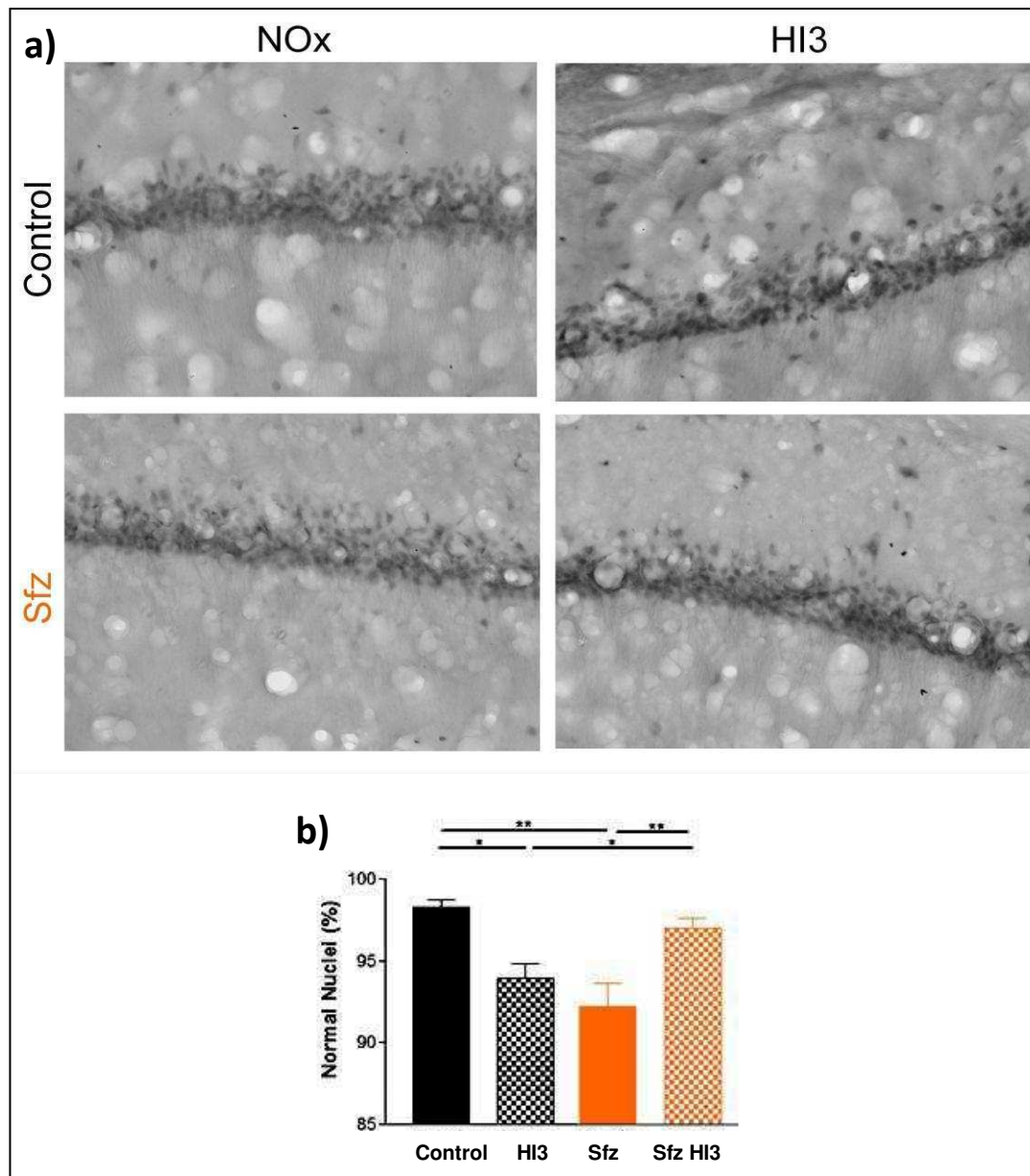


Figura 39: a) Fotomicrografías del efecto del bloqueo de NF- κ B sobre la morfología de los núcleos neuronales en el hipocampo de animales expuestos a IH. **b)** Cuantificación del porcentaje de neuronas normales. Las barras expresan la media del parámetro indicado \pm SEM para cada grupo. La significancia entre tratamientos fue evaluada por ANOVA dos vías y post-test de Bonferroni: ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$.

Discusión y Conclusiones

Caracterización de los modelos de AS por HI utilizados

En la bibliografía se han reportado distintos modelos experimentales de HI que intentan reproducir el patrón de hipoxemia observado en pacientes de AS y se utilizan para estudiar los efectos de esta patología y otras asociadas. Entre estos efectos se han descrito alteraciones en distintas áreas cerebrales relacionadas con las fallas cognitivas que se observan en pacientes (Gozal y Kheirandish-Gozal, 2007; Row y cols., 2007; Avilés Reyes, Angelo y cols., 2010). El modelo de HI utilizado en nuestro laboratorio cumple con el mínimo de 5 eventos hipóxicos por hora requeridos por la definición clínica de AS (Hinojosa Laborde y Mifflin, 2005; Klein y cols., 2005; Basner y cols., 2007; Ling y cols., 2008; Ma y cols., 2008) y una disminución de SpO₂ del 20-25% en cada uno de los ciclos. Además, este modelo induce alteraciones neuronales y gliales en el área CA1 del hipocampo y en la corteza cerebral (Avilés Reyes, Angelo y cols., 2010), similares a las descritas en pacientes que sufren AS (Naëgele y cols., 1995; 1998; 2006; Macey y cols., 2002; Bartlett y cols., 2004; Rae y cols., 2009; O'Donoghue y cols., 2012).

El *stress* oxidativo es una característica de la AS y muchos marcadores de esta condición han sido ampliamente descritos en pacientes. Entre ellos peroxidación lipídica y oxidación de proteínas y ácidos nucleicos (Barceló y cols., 2006; Svatikovia y cols., 2005; Lavie y Lavie, 2009; Lavie y cols., 2012; da Rosa y cols., 2012). La mayoría de estos marcadores de aumento del *stress* oxidativo también ha sido encontrada en sangre de animales expuestos a HI. Sin embargo, no es tan importante la cantidad de trabajos donde se han estudiado los marcadores de *stress* oxidativo en el SNC en animales expuestos a HI. Algunos de estos trabajos mostraron aumento de peroxidación lipídica en corteza e hipocampo (Row y cols., 2003; Xu y cols., 2004; Burckhardt y cols., 2008; Gozal y cols., 2010), aumento de la actividad de la glutatión reductasa en la protuberancia (Ramanathan y cols., 2005) y aumento de prostaglandinas en hipocampo y corteza (Burckhardt y cols., 2008; Cai y cols., 2010). Consistentemente con los resultados descritos en la bibliografía, durante este trabajo describimos un aumento de TBARS en el hipocampo de animales expuestos a HI por 3, 5 y 10 días (HI3, HI5 y HI10, respectivamente).

Es importante destacar que los TBARS fueron de los primeros marcadores de *stress* oxidativo utilizados en humanos y animales (Buege y Aust, 1978; Mayne, 2003). Esta técnica mide *stress oxidativo* por cuantificación del daño oxidativo a lípidos que ocurre con la generación de radicales libres (Oakes y Van Der Kraak, 2002). Se trata de un ensayo de espectrometría simple que mide un cromógeno que se produce por la reacción del TBA con el producto de peroxidación lipídica MDA y aunque generalmente se utiliza en plasma, puede ser utilizado en tejido (Mayne, 2003). A pesar de su amplia utilización, esta técnica ha recibido críticas por las sobreestimación de MDA, ya que otros sustratos pueden reaccionar con el TBA (Janero, 1990; Esterbauer, 1996; Handelman y Pryor, 1999; Oakes y Van Der Kraak, 2002; Mayne, 2003). Oakes y Van Der Kraak (2002) han demostrado que la utilización de BHT en el desarrollo de esta técnica minimiza la reactividad de las sustancias no específicas y el MDA producido por la manipulación (Pikul y Leszczynski., 1986; Janero, 1990; Oakes y Van Der Kraak, 2002). Teniendo en cuenta esta observación, en nuestros experimentos utilizamos BHT (ver sección Materiales y Métodos) para obtener mayor exactitud en nuestros resultados.

También existen trabajos que reportan resultados obtenidos en modelos *in vitro* donde se muestra que la HI induce el aumento de marcadores de *stress* oxidativo en distintos tipos celulares incluyendo neuronas (Shan y cols., 2007) y células PC12 (Nanduri y cols., 2009). En nuestras manos la exposición de cultivos primarios mixtos a HI indujo aumento de TBARS luego de 8 ciclos de exposición (HI8), coincidiendo con la información reportada previamente por otros grupos. Sorprendentemente, este tiempo de exposición indujo un aumento de TBARS con respecto al grupo control del 50% siendo comparable al obtenido luego de 3 días de exposición a HI *in vivo* (HI3). Valiéndonos de esta semejanza, establecimos un paralelismo entre ambos modelos para desarrollar el análisis *in vitro* de la vía de señalización involucrada en las alteraciones inducidas por AS que se habían observado previamente. Esta validación del modelo *in vitro* a través de la similitud en el aumento de *stress* oxidativo medido por TBARS resultó de fundamental importancia para tener un sistema *in vitro* que resultara útil para estudiar cascadas intracelulares y probar los paradigmas de

pérdida/ganancia de función en una forma más controlada, lo que también nos permitió reducir significativamente el uso masivo de animales de laboratorio.

RAGE se expresa durante el desarrollo del SNC pero es indetectable en el adulto, aunque su expresión puede reinducirse en neuronas y glía luego de la injuria tisular (Ma y cols., 2003; Rong y cols., 2005; Toth y cols., 2006; Ponath y cols., 2007; Villarreal y cols., 2010; Dvorientchikova y cols., 2011), entre las que se incluyen hipoxia e isquemia (Ma y cols., 2003; Pichiule y cols., 2007; Avilés Reyes, Angelo y cols., 2010; Dvorientchikova y cols., 2011). Previamente, en trabajos de nuestro grupo (Avilés Reyes, Angelo y cols., 2010) y del laboratorio del Dr. Gozal (Burckhardt y cols., 2008) se había descrito una inducción en la expresión de RAGE en corteza e hipocampo de animales expuestos a HI. Posteriormente, nuestro laboratorio reportó que la exposición a excitotoxicidad por glutamato, la exposición a ligandos de RAGE o la hipoosmolaridad son potentes inductores de la expresión de RAGE en neuronas corticales en cultivo (Villarreal y cols., 2011). Como parte de este trabajo de tesis estudiamos por inmunofluorescencia la abundancia de RAGE en cultivos primarios mixtos. Sorprendentemente, se observó un alto nivel de expresión basal tanto en neuronas como astrocitos *naïve* que no resultó incrementado cuando los cultivos mixtos fueron sometidos a HI. Este resultado nos indica que en los cultivos primarios mixtos hipocampales se mantiene la expresión de RAGE neuronal y glial en cultivos diferenciados. Esto ha sido observado también por nuestro grupo de trabajo y por otros equipos (Chou y col., 2003; Schmitt y cols., 2006; Ponath y cols., 2007; Qin y cols., 2008; Steiner y cols., 2008; Kim y cols., 2011; Villarreal y cols., 2011). Particularmente en el modelo de HI no se observa una inducción de la expresión similar a la observada en cultivos puros neuronales y gliales expuestos a ligandos de RAGE o excitotoxicidad por glutamato (Villarreal y cols., 2011). En base a la escasa información existente sobre el control de la expresión de RAGE a nivel de la transcripción y la nula información disponible de su control por mecanismos post-traduccionales (RBP, miRNA, etc.), sólo podemos especular acerca de las razones por las cuales los cultivos mixtos no muestran una inducción significativa de la expresión de RAGE. Una explicación plausible sería que la presencia de todos los tipos celulares (macro y microglía, además de neuronas) produce una cierta atenuación del efecto de la HI y reduce la señal para

la inducción de RAGE en neuronas. El control fino de la reexpresión de RAGE luego de la injuria, así como la interacción con otros PRR es motivo de estudio en otro proyecto de nuestro laboratorio y es probable que encierre algunas claves importantes para entender las diferencias en la respuesta de los distintos paradigmas experimentales.

El factor de transcripción HIF-1 está compuesto por las subunidades α y β . Ambas subunidades son constitutivamente expresadas pero la degradación de la subunidad α es regulada por oxígeno. Así, en condiciones de normoxia esta subunidad es degradada por el proteosoma mientras que en condiciones de hipoxia es estabilizada, migra al núcleo y dimeriza con la subunidad β para formar el complejo HIF-1 capaz de activar la transcripción de genes relacionados con la adaptación a hipoxia (Recuadro 2, sección Introducción) (Wang y cols., 1995; Sharp y Bernaudin, 2004; Semenza, 2004; 2007; Cunningham y cols., 2012; Xia y cols., 2012). Tanto en nuestro grupo como en otros se ha demostrado que la HI induce el aumento en la abundancia de HIF-1 α en distintos órganos incluyendo el cerebro (Avilés Reyes, Angelo y cols., 2010; Bhaskara y cols., 2012; Semenza y Prabhakar, 2012). En cultivos celulares, la información es contradictoria ya que se ha descrito tanto aumento de la expresión de HIF-1 α (Yuan y cols., 2005; Toffoli y cols., 2009), como la falta de activación de HIF-1 en cultivos expuestos a HI (Ryan y cols., 2005). Nuestro trabajo logró demostrar que *in vitro* la inducción de HIF-1 α ocurre esencialmente en astrocitos GFAP+, mientras que en las neuronas no se observan cambios significativos en la abundancia de este factor de transcripción. Nuevamente emerge el papel como regulador o *buffer* que tendrían los astrocitos en este sistema *in vitro* de exposición a HI.

En el SNC adulto normal, los astrocitos presentan esencialmente una forma estrellada de la cual obtienen su nombre (del griego: *astron*, estrella y *cyte*, célula), con prolongaciones largas y angostas. En situaciones de injuria al SNC, los astrocitos responden mediante un proceso característico denominado gliosis reactiva que involucra un aumento en la tasa de división celular (hiperplasia), alteraciones de la morfología celular y provoca cambios en la expresión de un gran número de genes entre los que se incluye el filamento intermedio glial GFAP (Sofroniew, 2009; Zamanian y cols., 2012). En nuestro laboratorio reportamos previamente la inducción de gliosis reactiva en corteza e hipocampo cerebral de animales expuestos al modelo de AS por

HI (Avilés Reyes, Angelo y cols., 2010). Estos resultados fueron confirmados y extendidos durante el desarrollo de esta tesis donde se estudió la expresión de GFAP por RT-PCR e *immunoblot*. Estos análisis mostraron que la HI induce un aumento en la abundancia tanto del mRNA como de la proteína GFAP, lo que indicaría un aumento de la expresión *de novo* de GFAP y no solamente un fenómeno de remodelado del citoesqueleto astrogliar. Si bien son escasos los reportes en donde se ha relacionado la expresión de GFAP con AS, nuestros resultados se correlacionan con los previos del laboratorio (Avilés Reyes, Angelo y cols., 2010) y otros donde se ha reportado un aumento en la expresión de GFAP en el cerebro de pacientes con síndrome infantil de muerte súbita debida posiblemente a AS (Kinney y cols., 1983; Sawaguchi y cols., 2002; 2003). Además, recientemente se ha publicado un trabajo sobre animales expuestos a HI (Baronio y cols., 2013) que confirma nuestros hallazgos sobre la gliosis reactiva publicados en 2010 (Avilés Reyes, Angelo y cols., 2010) y extendidos en este trabajo de tesis.

En cultivos primarios, los astrocitos presentan una morfología diferente de la observada *in vivo*. Los astrocitos cultivados *in vitro* muestran una forma aplanada y poligonal en condiciones normales y presencia de nutrientes adecuados, pero frente a ciertos estímulos o noxas extienden prolongaciones y se transforman en células estrelladas a través de la activación de diferentes cascadas que finalizan en efectores clásicos de los cambios en la morfología del citoesqueleto como son las pequeñas RhoGTPasas. Este proceso se denomina *stellation*, ha sido ampliamente descrito en la bibliografía y existe consenso en que involucra mecanismos similares a los de la gliosis reactiva *in vivo*, utilizándose como la correlación *in vitro* de este fenómeno (Ramakers y Moolenaar, 1998; Abe y Saito, 1999; Schmidt-Ott y cols., 2001; Abe y Misawa, 2003; Frizzo y cols., 2004; Koh y cols., 2005; Park y cols., 2006). En nuestro modelo *in vitro* los astrocitos presentes en los cultivos mixtos hipocampales expuestos a HI mostraron una transformación hacia la forma estrellada, en concordancia con los resultados obtenidos en modelos animales. La *stellation* observada induce una morfología astrogliar que no parece diferir significativamente de la reportada para otros modelos de injuria (Abe y Saito., 1999; Abe y Misawa, 2003; Frizzo y cols., 2004;

Koh y cols., 2005; Park y cols., 2006), remarcando la característica genérica de la reacción astrogliar frente a diferentes tipos de injuria.

El stress oxidativo inducido por hipoxia puede causar la retracción de las neuritas y conducir a la neurodegeneración como se ha demostrado en diferentes enfermedades neurodegenerativas (Jackson y cols., 1995; Mattila y cols., 1999; Dickson y Vickers, 2001; Fujimura y cols., 2009; Satoh y cols., 2011; Ibegbu y cols., 2012). Las proteínas de la familia de GTPasas Rho son reguladores clave del citoesqueleto de actina y se las ha asociado a la regulación neurítica y a la muerte celular apoptótica en las neuronas (Negishi y Katoh, 2002; Tanabe y cols., 2003; Koh, 2006; Tomasevic y cols., 2007). Las acciones de estas proteínas son contrarias; los miembros Rac1 y Cdc42 promueven la extensión de neuritas e inhiben apoptosis, mientras RhoA promueve la retracción de las prolongaciones, la desaparición de los conos de crecimiento y puede llegar a inducir muerte celular apoptótica (Koh, 2006; Fujimura y cols., 2009). Entre los efectores de Rho, la retracción de neuritas es mediada por la Rho quinasa, cuya activación induce este fenómeno (Hirose y cols., 1998; Negishi y Katoh, 2002). Así, la evaluación de la extensión y/o complejidad del árbol neuronal es un interesante parámetro para detectar el inicio de la neurodegeneración antes de que ocurra un daño irreversible que produce efectos secundarios, por ejemplo por difusión de DAMP y activación de la inmunidad innata. Este efecto de daño secundario puede ocurrir en estos cultivos que cuentan con todos los tipos celulares y por ello pueden montar esta respuesta. La exposición a HI esencialmente redujo el largo de las dendritas en las neuronas hipocampales en los cultivos mixtos. Si bien existen algunos reportes que muestran un aumento de la longitud de las neuritas en modelos *in vitro* de hipoxia continua y OGD (Lei y cols., 2006; Genetos y cols., 2010), varios trabajos han mostrado la disminución en la longitud de las neuritas en modelos de hipoxia continua *in vitro* y de HI *in vivo* (Kheirandish y cols., 2005; Gladman y cols., 2010). En nuestros modelos de HI, se observó una disminución en la longitud de las dendritas tanto *in vitro* como *in vivo*, aunque en este último modelo existe una leve recuperación luego de exposiciones prolongadas a HI (5 y 10 días) (Avilés Reyes, Angelo y cols., 2010).

La activación de NF- κ B ha sido ampliamente descrita en pacientes de AS como también en animales y células expuestas a HI (Xu y cols., 2004; Greenberg y cols., 2006; Htoo y cols., 2006; Yamauchi y cols., 2006; Ryan y cols., 2007; Nácher y cols., 2009; Li y cols., 2011; Da Rosa y cols., 2012; Wang y cols., 2012), aunque existe un trabajo donde se reporta la falta de activación en cultivos celulares expuestos a HI (Toffoli y cols., 2009). Sin embargo, la mayoría de estos trabajos no se realizaron en células del tejido nervioso. Concordantemente con la bibliografía, previamente en nuestro laboratorio habíamos descrito en hipocampo de ratones reportadores de NF- κ B un aumento en la activación de este factor de transcripción. Ese trabajo realizado en ratones implica un cambio de especie que puede afectar la validez del modelo que desarrollamos para trabajar con ratas. Para evitar estos problemas, en este trabajo de tesis utilizamos el modelo en rata y demostramos por RT-PCR un aumento de la expresión de diversos genes que son dependientes de NF- κ B como I κ B, XIAP y BclXL. *In vitro*, por medio de estudios de inmunofluorescencia describimos la activación de NF- κ B tanto en neuronas como astrocitos de cultivos primarios mixtos expuestos a HI evidenciada por la detección de la p65NLS que resulta liberada de su oclusión por I κ B, permitiendo así que el factor de transcripción sea capaz de migrar al núcleo e inducir la expresión de diferentes genes. Todas estas técnicas demostraron que NF- κ B resulta activado por la exposición a HI *in vivo* e *in vitro*.

La activación de NF- κ B tiene una gran implicancia no solamente a nivel del set de genes regulados que se involucran tanto en la inducción como en la inhibición de la muerte celular (Baldwin, 1996; Yaron y cols., 1998; Bender y cols., 1998; Li y Karin y cols., 1998; Gilmore y cols., 1999; Gutierrez y cols., 2005; Dutta y cols., 2006; Mémet, 2006; Ridder y Schwaninger, 2009), sino que es importante por ser el efector común de varios PRR incluido RAGE. Estudios realizados por nuestro grupo y otros han demostrado que la activación de RAGE por DAMP induce un aumento de la activación de NF- κ B tanto en neuronas como en astrocitos (Villarreal y cols., 2011; 2013).

Participación de la vía de señalización S100B/RAGE/NF- κ B en las alteraciones inducidas por la HI

- **Exposición y bloqueo de S100B**

El aumento en la abundancia y secreción de S100B en situaciones de injuria han sido descritos ampliamente en la bibliografía destacando su valor diagnóstico y pronóstico (Kögel y cols., 2004; Donato, 2007; Sen y Belli, 2007; Sofroniew, 2009; Avilés Reyes, Angelo y cols., 2010). Por ésto, y dado que la S100B extracelular es considerada un DAMP por contribuir a la propagación de la inflamación a través de la activación de la inmunidad innata, su bloqueo podría ser beneficioso en la atenuación de la inflamación y el daño celular (Sorci y cols., 2010). Sin embargo, existen muy pocos estudios sobre los efectos del bloqueo o el agregado exógeno de S100B. Uno de ellos muestra que el tratamiento con S100B *in vitro* induce *stellation* en astrocitos *naïve* y además provoca un aumento de la filamentación en cultivos astrocitarios tratados simultáneamente con S100B y amiloide β (Hu y Van Eldik, 1999). En contraposición, se han reportado efectos protectores de S100B sobre astrocitos y microglía en un modelo *in vitro* de neurodegeneración por trimetilina ((CH₃)₃SnCl) (Reali y cols., 2005). En este modelo los cambios morfológicos astrocitarios (*stellation*) que se inducen por el tratamiento con trimetilina son prevenidos por el tratamiento con S100B. Nuestros resultados coinciden con los expuestos en el trabajo de Reali y cols. (2005), ya que el pretratamiento con S100B *in vitro* interfiere con la filamentación astrocitaria inducida por la HI, aunque se conserva una tendencia a la reactividad glial por la HI.

Sorprendentemente, los estudios de pérdida de función que realizamos con el anticuerpo bloqueante de S100B no mostraron el efecto opuesto a el agregado de S100B sino que se observó también una prevención de la *stellation* inducida por la HI, aunque en condiciones de normoxia el tratamiento con el anticuerpo induce la filamentación astrocitaria *per se*. Por otro lado y respaldando parcialmente los resultados obtenidos *in vitro*, nuestros experimentos *in vivo* muestran que el bloqueo de S100B por administración intrahipocampal de anticuerpos bloqueantes es capaz de prevenir la gliosis reactiva inducida por la HI pero este proceso se induce *per se* en los animales del grupo normóxico tratados con el anticuerpo contra S100B.

Es interesante observar que *in vitro* los astrocitos responden al exceso de S100B administrada exógenamente a niveles μM (tipo DAMP) con una limitación de su respuesta normal a la HI (*stellation*) pero que, a la vez, el bloqueo de S100B induce también una respuesta limitada a la HI pero una exacerbada gliosis reactiva en condiciones normales. Considerando que S100B extracelular se comporta como DAMP generando una señalización autócrina que induce gliosis reactiva, existen potenciales explicaciones fisiológicas y técnicas para el efecto observado por nosotros. Por un lado, parece requerirse de un rango determinado de S100B para permitir la normal evolución de la gliosis reactiva inducida por la HI y por lo tanto el exceso interfiere con la respuesta o bien es posible que se generan complejos multiméricos de alto orden de S100B que impiden la correcta unión con sus receptores. Adicionalmente, S100B es una proteína que une Ca^{2+} y el exceso de S100B podría inducir una caída en el Ca^{2+} extracelular que cambia la respuesta astrogliar. Experimentos exploratorios no mostrados en este trabajo de tesis han mostrado que los niveles de Ca^{2+} en el medio extracelular cambian significativamente los efectos de S100B. El bloqueo de S100B con anticuerpos neutralizantes, técnica utilizada por nosotros para reducir los niveles endógenos de S100B e impedir la señalización por esta vía, induce una esperable limitación de la gliosis reactiva que estaría mediada en forma autócrina por S100B y a la vez induce gliosis *per se* en condiciones normales. Es posible que niveles mínimos de S100B sean requeridos para el normal desarrollo de los astrocitos *in vitro* tal como se ha comentado en diferentes trabajos en los últimos años (Donato, 2001; 2003; Donato y cols., 2009; Donato y Heizmann, 2010; Sorci y cols., 2010). Finalmente, los anticuerpos neutralizantes son efectivos cuando se aplican sobre dominios extracelulares de receptores o bloquean completamente los ligandos de forma estérica o por alteraciones conformacionales. En el caso de S100B, que es una proteína capaz de formar dímeros desconocemos el efecto que podría tener sobre su capacidad de dimerización, la unión de IgG específicas en su estructura. Esto podría generar una pérdida de actividad (efecto buscado) pero también podría inducir complejos de alto orden de efectos desconocidos. Es importante comentar estas limitaciones que tiene nuestro enfoque, por las cuales decidimos desarrollar herramientas más complejas para estudiar la participación de la ruta S100B/RAGE en la AS por HI.

El efecto de S100B sobre las neuronas fue ampliamente estudiado, atribuyéndole propiedades tróficas cuando este DAMP se encuentra en bajas concentraciones (orden nanomolar, nM) típicas del tejido sano, y propiedades tóxicas cuando se encuentra en altas concentraciones (orden micromolar, μM) como las presentes en zonas de injuria en el SNC (Van Eldik y cols., 2003; Donato, 2003; 2007). Entre los efectos tróficos se han descrito inducción del crecimiento de neuritas durante el desarrollo normal (Van Eldik y cols., 1988; Winningham-Major y cols., 1989; Haglid y cols., 1997) y crecimiento axonal y aumento de la abundancia de neuronas serotoninérgicas en ratones transgénicos que sobreexpresan S100B (Reeves y cols., 1994; Whitaker-Azmitia y cols., 1997). Además, trabajos utilizando ratones con expresión de S100B reducida muestran una disminución de fibras serotoninérgicas y anormalidad en la migración neuronal (Ueda y cols., 1994; 1995; 1997). Sin embargo, también existe una gran cantidad de evidencias que indican que un aumento en los niveles de S100B puede ser perjudicial (Mrak y Griffin, 2001). Así, la sobreexpresión de S100B en ratones transgénicos resulta en cambios neuropatológicos y deficiencias en aprendizaje espacial (Bhattachryya y cols., 1992; Whitaker-Azmitia y cols., 1997; Winocur y cols., 2001). Coincidiendo con estos resultados, también se ha reportado que estos animales tienen mayor susceptibilidad al insulto hipóxico-isquémico (Wainwright y cols., 2004) y se ha demostrado que altas concentraciones de S100B inducen apoptosis en cultivos celulares de las líneas neuronales PC12, N18 (Fano y cols., 1993; Mariggio y cols., 1994; Huttunen y cols., 2000) y neuronas corticales primarias (Villarreal y cols., 2011). Nuestros resultados *in vitro* muestran que el tratamiento con S100B induce un leve efecto de protección al acortamiento de neuritas inducido por la HI, sin mayores efectos si se aplica en condiciones de normoxia. Considerando que la concentración de S100B utilizada corresponde al nivel en el cual se especula que se comportaría como DAMP y que, a esa dosis, genera alteraciones y muerte celular en cultivos primarios neuronales puros expuestos a excitotoxicidad (Villarreal y cols., 2011), es probable que el efecto protector se deba a la observada inhibición de la gliosis reactiva.

Por otro lado nuestros experimentos *in vivo*, muestran que el bloqueo con anticuerpos neutralizantes de S100B no cambia significativamente el número de

neuronas con signos de degeneración inducidos por la HI. Esto abre la posibilidad de que RAGE sea coactivado por algún otro ligando presente en estas condiciones tal como HMGB-1, posibilidad que está estudiando actualmente el laboratorio.

- **Expresión y activación de RAGE**

Tradicionalmente, la bibliografía ha descrito los efectos tróficos y tóxicos de S100B dependiendo de su concentración, aunque se ha propuesto que los efectos también dependen de la densidad de moléculas de RAGE expresadas en la superficie de la célula respondedora (Sorci y cols., 2010). La inducción y activación de RAGE han sido implicadas tanto en el daño como en la protección celular en distintos modelos de injuria al SNC, probablemente porque RAGE promueve la expresión de genes proinflamatorios y también neurotróficos (Huttunen y cols., 2000; 2002; Shanmugam y cols., 2003; Bierhaus y cols., 2004; Rong y cols., 2004a; 2004b; Pichiule y cols., 2007; Bianchi y cols., 2007; Ponath y cols., 2007; Dvorientchikova y cols., 2011). Para investigar el rol que juega la activación de este receptor en las alteraciones celulares observadas en nuestro modelo de AS por HI decidimos realizar experimentos de ganancia y pérdida de función, en una primera instancia sobre cultivos primarios mixtos y luego en animales. Al estudiar la abundancia de RAGE en los cultivos primarios mixtos encontramos que existe un nivel basal de expresión, tanto en neuronas como en astrocitos. Este resultado es concordante con los reportados en trabajos de nuestro grupo y otros donde la expresión de RAGE es evidenciada en neuronas (Kobayashi y cols., 2005; Kim y cols., 2011; Villarreal y cols., 2011) y astrocitos (Wang y cols., 2002; Steiner y cols., 2008) de cultivos celulares primarios sin necesidad de inducir ningún tipo de *stress* celular.

Pichiule y cols. (2007) mostraron en un trabajo con cultivos primarios de neuronas hipocampales que existe una región de unión para HIF-1 en el promotor proximal del gen de RAGE, a partir de la cual este factor de transcripción podría regular la expresión del receptor tal como ellos proponen en ensayos de reportadores de luciferasa. En nuestras manos la exposición de los cultivos primarios mixtos a HI indujo el aumento en la abundancia de HIF-1 α en astrocitos pero fue incapaz de inducir la sobreexpresión de RAGE, sugiriendo que la expresión del receptor podría estar

limitada o controlada por otros factores de transcripción o mecanismos post-transcripcionales (RBPs, miRNA etc.).

La pérdida de función *in vitro* con anticuerpos neutralizantes de RAGE previno la *stellation* de los astrocitos inducida por la exposición a HI. De la misma manera, la sobreexpresión del dominante negativo RAGE- Δ cyt previno los cambios hacia la morfología filamentososa de las células gliales en los cultivos expuestos a HI, aunque en condiciones normales indujo la transformación hacia esta morfología. En una forma similar, *in vivo*, el bloqueo con anticuerpos anti-RAGE previno la gliosis reactiva inducida por la exposición a ciclos de HI, aunque este bloqueo es capaz de inducir la gliosis reactiva en condiciones normales (normoxia).

En neuronas, el bloqueo de RAGE con anticuerpos neutralizantes previno las alteraciones neuronales inducidas por la HI tanto *in vitro* como *in vivo*. Por el contrario, pero en una forma similar a lo que ocurre *in vitro*, el bloqueo de RAGE en condiciones de normoxia indujo un aumento en la cantidad de neuronas que muestran una movilización de NeuN compatible con neurodegeneración.

Por otro lado, animales *naïve* infectados con los vectores derivados del HSV-1 que inducen la expresión de RAGE-FL mostraron que la sobreexpresión del receptor es suficiente para provocar alteraciones morfológicas neuronales, mientras que la sobreexpresión del dominante negativo (RAGE- Δ cyt) no muestra estos cambios en las neuronas infectadas. Luego de la exposición a HI los animales infectados con RAGE- Δ cyt mostraron una pérdida menor de neuronas cuando se compararon con los animales infectados con un vector control o con RAGE-FL. Respaldao nuestros resultados, el efecto perjudicial de la activación de RAGE se ha reportado en un modelo de neuropatía diabética (Bierhaus y cols., 2004). Por otro lado, se han descrito efectos neuroprotectores en modelos de daño a nervios periféricos (Rong y cols., 2004a; 2004b). Pichiule y cols., (2007), han reportado que la activación de RAGE resulta neuroprotectora en un modelo de isquemia pero aclarando que los efectos de la activación de este receptor varían dependiendo de la expresión espaciotemporal del mismo y de la disponibilidad de sus ligandos. Más allá de estas discrepancias, está claro que en el modelo de AS *in vivo* e *in vitro*, el bloqueo de RAGE parece ser

beneficioso para disminuir las alteraciones neuronales y la gliosis reactiva. Resta evaluar si estos cambios se reflejan en una mejoría de los parámetros cognitivos.

- **Estudio de la señalización intracelular: Akt y NF- κ B**

Se ha propuesto que la cascada de señalización intracelular de RAGE involucra la vía PI3K/Akt (Chen y cols., 2009; Gelain y cols., 2011; Li y cols., 2012; Rai y cols., 2012). Además, algunos trabajos sugieren la participación de Akt en la gliosis reactiva inducida por una injuria al SNC (Neary y cols., 2005a; 2005b). Por ello, decidimos estudiar si esta vía estaba involucrada en la inducción de la filamentación de los astrocitos en cultivo luego de su exposición a HI. Para ello se trataron los cultivos primarios mixtos con LY294002 (LY), un inhibidor comercial de la fosfato-inosidil 3 (PI3) kinasa utilizado ampliamente para bloquear la fosforilación y activación de Akt dependiente de PI3 (Roche y cols., 1994; Shivakrupa y cols., 2003; Jiang y cols., 2010; Lukinovic-Skudar y cols., 2011). Este tratamiento previno la filamentación de los astrocitos inducida por HI, mientras que en condiciones de normoxia no provocó cambios morfológicos significativos en los astrocitos presentes en los cultivos mixtos hipocampales. Estos resultados sugieren que la activación de Akt estaría involucrada en la señalización de la *stellation* inducida por la exposición a HI. Sorpresivamente, nuestros hallazgos se contraponen a los expuestos por Ke y cols. (2009) donde muestran que la inactivación de Akt se relaciona con un aumento de gliosis reactiva (evidenciada como aumento en la expresión de GFAP) en un modelo de isquemia *in vitro* sobre una línea celular astrocitaria.

NF- κ B controla la expresión de diversos genes que regulan una gran cantidad de procesos en el sistema nervioso como plasticidad y función sináptica, neurogénesis, diferenciación, mielinización de nervios periféricos, crecimiento neurítico y sobrevida y muerte neuronal (Mémet, 2006; Gutierrez y cols., 2008; Sarnico y cols., 2009a; 2009b). A pesar de que NF- κ B es esencial para la sobrevida neuronal y de que su activación protege las neuronas del *stress* oxidativo o de la neurodegeneración inducida por la isquemia, esta activación puede contribuir a la inflamación y apoptosis luego de injuria cerebral (Sarnico y cols., 2009b). Algunos estudios muestran que dentro de la misma

célula neuronal, la activación de los distintos dímeros de NF- κ B puede conducir a efectos opuestos sobre la supervivencia neuronal. Se ha propuesto también que los efectos contrastantes de NF- κ B dependen de los diferentes estímulos y del tipo celular que los recibe (Sarnico y cols., 2009a). Así, se ha propuesto que NF- κ B resultaría neurotóxico cuando es inducido en las células gliales (Mattson y Meffert, 2006). Por otra parte, Bae y cols. (2006), han demostrado la existencia de un sitio de unión para NF- κ B en el promotor de GFAP. Nuestros experimentos *in vitro*, muestran que el bloqueo de NF- κ B por pretratamiento con el compuesto comercial BAY117082 previno la *stellation* de los astrocitos expuestos a HI. Estos resultados concuerdan con los descritos por Bae y cols. (2006) en un modelo de hipoxia continua, quienes reportaron además que el bloqueo de la activación de NF- κ B con el anti-inflamatorio aspirina o la transfección con un plásmido super-represor (I κ B no fosforilable) reduce la sobreexpresión de GFAP inducida por hipoxia en cultivos de astrocitos primarios y en la línea celular de glioblastoma A172. Sin embargo, otros autores proponen que la inhibición de NF- κ B induce un aumento de la expresión de GFAP en un modelo de isquemia cerebral (Zhang y cols., 2005), lo que muestra la diferente respuesta de acuerdo al tipo de injuria o bien el estado basal celular previo a la lesión.

En concordancia con trabajos que apoyan la teoría de que el bloqueo de NF- κ B en astrocitos resulta neuroprotector en glaucoma y encefalomiелitis autoinmune (Brambilla y cols., 2009; Dvorianchikova y cols., 2009), el bloqueo de este factor de transcripción con el inhibidor Sfz *in vivo* previno las alteraciones neuronales por nuestro modelo de AS por HI. Tal como ocurre con el bloqueo de otros miembros de esta ruta, en condiciones de normoxia la Sfz muestra un efecto perjudicial.

Tomados en conjunto, estos resultados sugieren que la actividad basal de NF- κ B es esencial para la supervivencia neuronal y la funcionalidad astrocitaria, pero que su sobreactivación sería perjudicial y por ello el bloqueo resultaría benéfico luego de la exposición a HI. Es importante discutir los efectos del bloqueo de NF- κ B *in vivo*, ya que la Sfz es un inhibidor que no discrimina entre distintos tipos celulares (Wahl y cols., 1998) y su efecto protector podría estar dado por el bloqueo del factor principalmente en las células astrogiales, inhibiendo sus acciones neurotóxicas y resultando en un medio extracelular más permisivo para la supervivencia neuronal o bien producir el

bloqueo simultáneo en neuronas y células de la glía. Por otra parte, la Sfz es un antagonista poco potente de los receptores glutamatérgicos tipo NMDA y se ha propuesto que sus efectos neuroprotectores en un modelo de isquemia cerebral podrían deberse a la prevención de la excitotoxicidad mediada por glutamato (Ryu y cols., 2003). Así mismo, se ha reportado que la Sfz inhibe la acción de la enzima ciclooxigenasa 2 (COX-2), ampliamente involucrada en los procesos inflamatorios (Ryu y cols., 2003; Balza y cols., 2013; Chávez y cols., 2012). Por lo tanto el efecto neuroprotector observado *in vivo* en animales expuestos al modelo de AS por HI podría deberse a la combinación de estos procesos y no solamente a la inhibición de la activación de NF- κ B.

Conclusiones finales

Nuestros resultados indican que la vía de señalización S100B/RAGE/NF- κ B está involucrada en la gliosis reactiva y en la aparición de neuronas con signos de neurodegeneración inducidas por el modelo experimental de AS por HI (Figura 40). Es importante destacar que las pérdidas de función de RAGE y NF- κ B resultaron eficaces para disminuir las alteraciones neuronales y la gliosis reactiva inducidas por la HI, mientras que el bloqueo de S100B es capaz de reducir solamente la reactividad glial en HI. No debe perderse de vista que RAGE es un PRR que, además de S100B, puede ligar distintos DAMP que podrían tener mayor efecto sobre las neuronas explicando así las diferencias observadas entre los bloqueos del receptor y su ligando. Por otro lado, en condiciones normóxicas podemos afirmar que el bloqueo de la vía S100B/RAGE/NF- κ B resulta perjudicial ya que induce gliosis reactiva y alteraciones neuronales. Recién en los últimos años se comenzó a aceptar la idea de que los PRR y sus ligandos DAMP podrían tener un rol fisiológico en condiciones normales, más allá de su ya descrito rol patológico (Okun y cols., 2011). Nuestros resultados muestran que el bloqueo de esta ruta induce gliosis reactiva *per se*, signo de que podrían existir alteraciones en la fisiología neuronal normal debido a la inhibición de esta vía. Discutiendo sobre esta idea, algunos autores han propuesto funciones benéficas de la activación de PRR,

involucrándolos en la neuroprotección y en la plasticidad sináptica (Hanisch y cols., 2008; Okun y cols., 2011).

La participación de RAGE en modelos experimentales de AS ha sido descrita por nosotros pero se reconoce la participación de este PRR en una multitud de estados patológicos del SNC que van desde isquemia, hipoxia y epilepsia hasta enfermedades neurodegenerativas como la Enfermedad de Parkinson o Alzheimer. Es probable que la ruta S100B-DAMP/RAGE/NF- κ B esté involucrada en el desarrollo genérico de gliosis reactiva y alteraciones neuronales por lo que consideramos que este trabajo de tesis podría brindar respuestas mucho más allá del área de hipoxia cerebral. Este trabajo expone nuevos blancos moleculares que emergen como muy tentadores para el desarrollo de estrategias de neuroprotección y de control de la gliosis reactiva que sean de utilidad para mejorar la sobrevida neuronal y disminuir la neuroinflamación luego de la injuria al SNC.

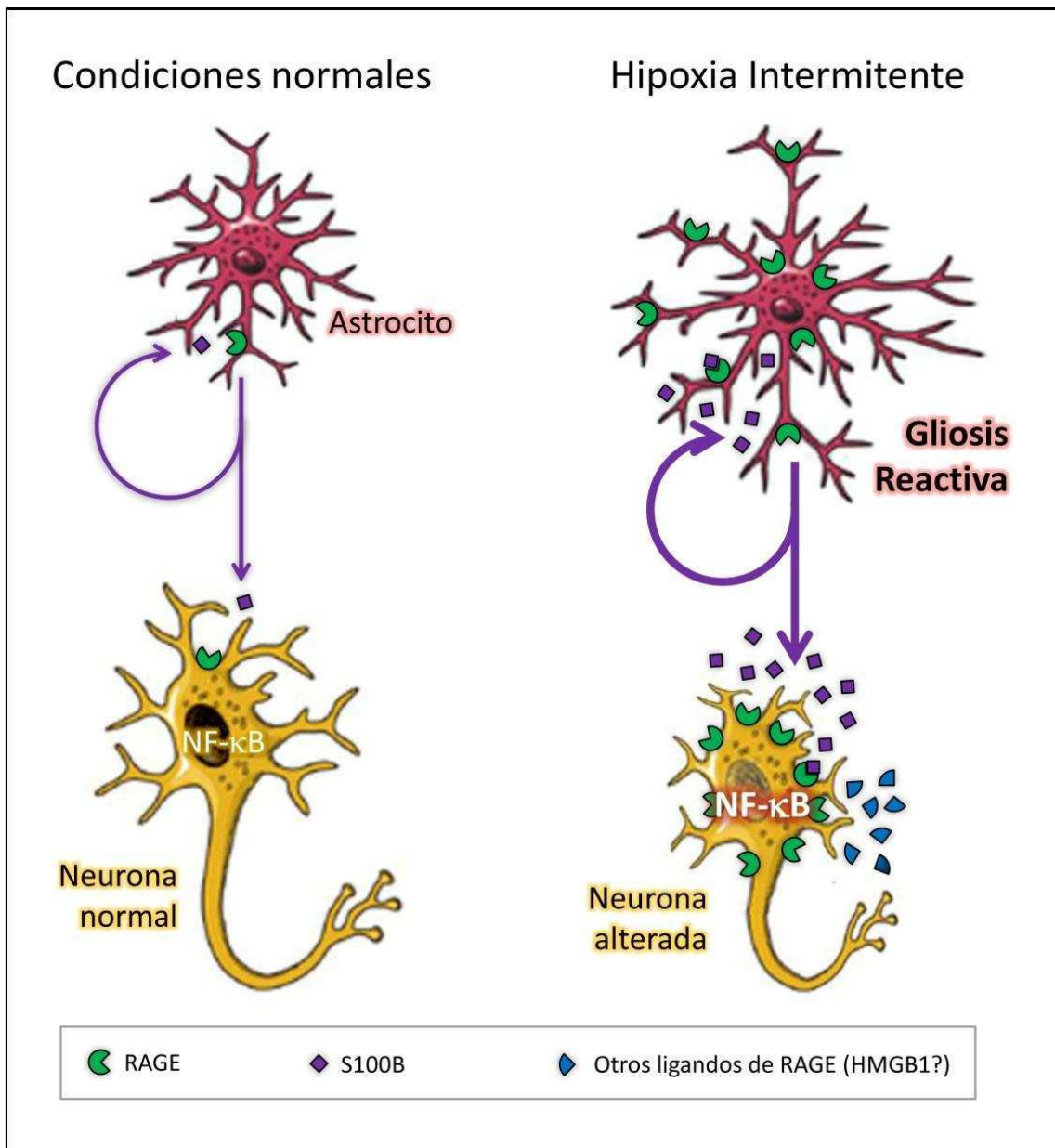


Figura 40: Esquema representativo de la ruta de señalización S100B/RAGE/NF-κB inducida por la HI y sus efectos sobre la morfología neuronal y la gliosis reactiva. En condiciones normales existe un nivel basal de la expresión de RAGE, expresión y secreción de S100B y de la activación de NF-κB. La HI induce un aumento en la expresión de RAGE y S100B como también de la secreción de este factor neurotrófico y activación de NF-κB. Además, la HI, induce cambios en la morfología celular de astrocitos y neuronas. Los esquemas celulares fueron tomados de <http://www.ninds.nih.gov>.

Bibliografía

- Abe K, Misawa M. Astrocyte stellation induced by Rho kinase inhibitors in culture. *Brain Res Dev Brain Res.* 2003 12; 143(1): 99-104.
- Abe K, Saito H. Astrocyte stellation induced by tyrosine kinase inhibitors in culture. *Brain Res.* 1999 7; 837(1-2): 306-308.
- Adrover MF, Guyot-Revol V, Cheli VT, Blanco C, Vidal R, Alché L, Kornisiuk E, Epstein AL, Jerusalinsky D. Hippocampal infection with HSV-1-derived vectors expressing an NMDAR1 antisense modifies behavior. *Genes Brain Behav.* 2003; 2(2): 103-113.
- Ahlemeyer B, Beier H, Semkova I, Schaper C, Krieglstein J. S-100beta protects cultured neurons against glutamate- and staurosporine-induced damage and is involved in the antiapoptotic action of the 5 HT(1A)-receptor agonist, Bay x 3702. *Brain Res.* 2000 6; 858(1): 121-128.
- Alberts B; Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. *Molecular Biology of the Cell.* 2007. Garland Science.
- Albin RL, Greenamyre JT. Alternative excitotoxic hypotheses. *Neurology.* 1992; 42(4): 733-738.
- Almendros I, Farré R, Torres M, Bonsignore MR, Dalmases M, Ramírez J, Navajas D, Montserrat JM. Early and mid-term effects of obstructive apneas in myocardial injury and inflammation. *Sleep Med.* 2011; 12(10): 1037-1040.
- Aviles-Reyes RX, Angelo MF, Villarreal A, Rios H, Lazarowski A, Ramos AJ. Intermittent hypoxia during sleep induces reactive gliosis and limited neuronal death in rats: implications for sleep apnea. *J Neurochem.* 2010; 112(4):854-869.
- Ayalon L, Ancoli-Israel S, Aka AA, McKenna BS, Drummond SP. Relationship between obstructive sleep apnea severity and brain activation during a sustained attention task. *Sleep.* 2009; 32(3): 373-381.
- Badr MS. Pathogenesis of obstructive sleep apnea. *Prog Cardiovasc Dis.* 1999 -; 41(5): 323-330.
- Bae MK, Kim SR, Lee HJ, Wee HJ, Yoo MA, Ock Oh S, Baek SY, Kim BS, Kim JB, Sik-Yoon, Bae SK. Aspirin-induced blockade of NF-kappaB activity restrains up-regulation of glial fibrillary acidic protein in human astroglial cells. *Biochim Biophys Acta.* 2006; 1763(3): 282-289.
- Baker TL, Mitchell GS. Episodic but not continuous hypoxia elicits long-term facilitation of phrenic motor output in rats. *J Physiol.* 2000 15; 529 Pt 1: 215-219.
- Baldwin AS Jr. The NF-kappa B and I kappa B proteins: new discoveries and insights. *Annu Rev Immunol.* 1996; 14: 649-683.
- Balza E, Castellani P, Delfino L, Truini M, Rubartelli A. The pharmacologic inhibition of the xc- antioxidant system improves the antitumor efficacy of COX inhibitors in the in vivo model of 3-MCA tumorigenesis. *Carcinogenesis.* 2013; 34(3):620-626.
- Barceló A, Barbé F, de la Peña M, Vila M, Pérez G, Piérola J, Durán J, Agustí AG. Antioxidant status in patients with sleep apnoea and impact of continuous positive airway pressure treatment. *Eur Respir J.* 2006; 27(4): 756-760.

-
- Baronio D, Martinez D, Fiori CZ, Bambini-Junior V, Forgiarini LF, Pase da Rosa D, Kim LJ, Cerski MR. Altered aquaporins in the brains of mice submitted to intermittent hypoxia model of sleep apnea. *Respir Physiol Neurobiol.* 2013 15; 185(2): 217-221
- Bartlett DJ, Rae C, Thompson CH, Byth K, Joffe DA, Enright T, Grunstein RR. Hippocampal area metabolites relate to severity and cognitive function in obstructive sleep apnea. *Sleep Med.* 2004; 5(6): 593-596.
- Basner RC. Continuous positive airway pressure for obstructive sleep apnea. *N Engl J Med.* 2007 26; 356(17): 1751-1758.
- Baumgardner JE, Otto CM. In vitro intermittent hypoxia: challenges for creating hypoxia in cell culture. *Respir Physiol Neurobiol.* 2003 16; 136(2-3):131-139.
- Beal MF. Aging, energy, and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Ann Neurol.* 1995; 38(3): 357-366.
- Belaiba RS, Bonello S, Zähringer C, Schmidt S, Hess J, Kietzmann T, Görlach A. Hypoxia up-regulates hypoxia-inducible factor-1alpha transcription by involving phosphatidylinositol 3-kinase and nuclear factor kappaB in pulmonary artery smooth muscle cells. *Mol Biol Cell.* 2007; 18(12): 4691-4967.
- Bender K, Göttlicher M, Whiteside S, Rahmsdorf HJ, Herrlich P. Sequential DNA damage-independent and -dependent activation of NF-kappaB by UV. *EMBO J.* 1998 1; 17(17): 5170-5181.
- Bertini R, Howard OM, Dong HF, Oppenheim JJ, Bizzarri C, Sergi R, Caselli G, Pagliei S, Romines B, Wilshire JA, Mengozzi M, Nakamura H, Yodoi J, Pekkari K, Gurunath R, Holmgren A, Herzenberg LA, Herzenberg LA, Ghezzi P. Thioredoxin, a redox enzyme released in infection and inflammation, is a unique chemoattractant for neutrophils, monocytes, and T cells. *J Exp Med.* 1999 7; 189(11): 1783-1789.
- Beutler B. Microbe sensing, positive feedback loops, and the pathogenesis of inflammatory diseases. *Immunol Rev.* 2009; 227(1): 248-263
- Bhaskara VK, Mohanam I, Rao JS, Mohanam S. Intermittent hypoxia regulates stem-like characteristics and differentiation of neuroblastoma cells. *PLoS One.* 2012; 7(2): e30905.
- Bhattacharyya A, Oppenheim RW, Prevette D, Moore BW, Brackenbury R, Ratner N. S100 is present in developing chicken neurons and Schwann cells and promotes motor neuron survival in vivo. *J Neurobiol.* 1992; 23(4): 451-466.
- Bianchi R, Adami C, Giambanco I, Donato R. S100B binding to RAGE in microglia stimulates COX-2 expression. *J Leukoc Biol.* 2007; 81(1): 108-118.
- Bianchi R, Giambanco I, Donato R. S100B/RAGE-dependent activation of microglia via NF-kappaB and AP-1 Co-regulation of COX-2 expression by S100B, IL-1beta and TNF-alpha. *Neurobiol Aging.* 2010; 31(4): 665-677.
- Bianchi R, Giambanco I, Donato R. S100B/RAGE-dependent activation of microglia via NF-kappaB and AP-1 Co-regulation of COX-2 expression by S100B, IL-1beta and TNF-alpha. *Neurobiol Aging.* 2010; 31(4):665-677.
- Bierhaus A, Haslbeck KM, Humpert PM, Liliensiek B, Dehmer T, Morcos M, Sayed AA, Andrassy M, Schiekhofer S, Schneider JG, Schulz JB, Heuss D, Neundörfer B, Dierl S, Huber J, Tritschler H, Schmidt AM, Schwaninger M, Haering HU, Schleicher E, Kasper M, Stern DM, Arnold B, Nawroth

-
- PP. Loss of pain perception in diabetes is dependent on a receptor of the immunoglobulin superfamily. *J Clin Invest.* 2004; 114(12): 1741-1751.
- Blackburn MR, Vance CO, Morschl E, Wilson CN. Adenosine receptors and inflammation. *Handb Exp Pharmacol.* 2009;(193): 215-269.
- Blasius AL, Beutler B. Intracellular toll-like receptors. *Immunity.* 2010 26; 32(3): 305-315.
- Bopp C, Bierhaus A, Hofer S, Bouchon A, Nawroth PP, Martin E, Weigand MA. Bench-to-bedside review: The inflammation-perpetuating pattern-recognition receptor RAGE as a therapeutic target in sepsis. *Crit Care.* 2008; 12(1): 201.
- Bours MJ, Swennen EL, Di Virgilio F, Cronstein BN, Dagnelie PC. Adenosine 5'-triphosphate and adenosine as endogenous signaling molecules in immunity and inflammation. *Pharmacol Ther.* 2006; 112(2): 358-404.
- Brambilla R, Persaud T, Hu X, Karmally S, Shestopalov VI, Dvorianchikova G, Ivanov D, Nathanson L, Barnum SR, Bethea JR. Transgenic inhibition of astroglial NF-kappa B improves functional outcome in experimental autoimmune encephalomyelitis by suppressing chronic central nervous system inflammation. *J Immunol.* 2009 1; 182(5): 2628-2640.
- Brooks D, Horner RL, Floras JS, Kozar LF, Render-Teixeira CL, Phillipson EA. Baroreflex control of heart rate in a canine model of obstructive sleep apnea. *Am J Respir Crit Care Med.* 1999; 159(4 Pt 1): 1293-1297.
- Buege JA, Aust SD. Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol.* 1978; 52: 302-310.
- Burckhardt IC, Gozal D, Dayyat E, Cheng Y, Li RC, Goldbart AD, Row BW. Green tea catechin polyphenols attenuate behavioral and oxidative responses to intermittent hypoxia. *Am J Respir Crit Care Med.* 2008 15; 177(10): 1135-1141.
- Bush TG, Puvanachandra N, Horner CH, Polito A, Ostefeld T, Svendsen CN, Mucke L, Johnson MH, Sofroniew MV. Leukocyte infiltration, neuronal degeneration, and neurite outgrowth after ablation of scar-forming, reactive astrocytes in adult transgenic mice. *Neuron.* 1999; 23(2): 297-308.
- Bushong EA, Martone ME, Jones YZ, Ellisman MH. Protoplasmic astrocytes in CA1 stratum radiatum occupy separate anatomical domains. *J Neurosci.* 2002 1; 22(1): 183-192.
- Businaro R, Leone S, Fabrizi C, Sorci G, Donato R, Lauro GM, Fumagalli L. S100B protects LAN-5 neuroblastoma cells against Abeta amyloid-induced neurotoxicity via RAGE engagement at low doses but increases Abeta amyloid neurotoxicity at high doses. *J Neurosci Res.* 2006; 83(5): 897-906.
- Butterfield D, Castegna A, Pocernich C, Drake J, Scapagnini G, Calabrese V. Nutritional approaches to combat oxidative stress in Alzheimer's disease. *J Nutr Biochem.* 2002; 13(8): 444.
- Cai XH, Zhou YH, Zhang CX, Hu LG, Fan XF, Li CC, Zheng GQ, Gong YS. Chronic intermittent hypoxia exposure induces memory impairment in growing rats. *Acta Neurobiol Exp (Wars).* 2010; 70(3): 279-287.
- Campana L, Eckert DJ, Patel SR, Malhotra A. Pathophysiology & genetics of obstructive sleep apnoea. *Indian J Med Res.* 2010; 131: 176-187.

-
- Carpagnano GE, Kharitonov SA, Resta O, Foschino-Barbaro MP, Gramiccioni E, Barnes PJ. 8-Isoprostane, a marker of oxidative stress, is increased in exhaled breath condensate of patients with obstructive sleep apnea after night and is reduced by continuous positive airway pressure therapy. *Chest*. 2003; 124(4): 1386-1392.
- Carroll VA, Ashcroft M. Targeting the molecular basis for tumour hypoxia. *Expert Rev Mol Med*. 2005 15; 7(6): 1-16.
- Chaput JP, Després JP, Bouchard C, Tremblay A. Short sleep duration is associated with reduced leptin levels and increased adiposity: Results from the Quebec family study. *Obesity (Silver Spring)*. 2007; 15(1): 253-261.
- Chavakis T, Bierhaus A, Nawroth PP. RAGE (receptor for advanced glycation end products): a central player in the inflammatory response. *Microbes Infect*. 2004; 6(13): 1219-1225.
- Chávez E, Castro-Sánchez L, Shibayama M, Tsutsumi V, Moreno MG, Muriel P. Sulfasalazine prevents the increase in TGF- β , COX-2, nuclear NF κ B translocation and fibrosis in CCl₄-induced liver cirrhosis in the rat. *Hum Exp Toxicol*. 2012; 31(9): 913-920.
- Chen LF, Greene WC. Regulation of distinct biological activities of the NF-kappaB transcription factor complex by acetylation. *J Mol Med (Berl)*. 2003; 81(9):549-557.
- Chen Q, Dong L, Wang L, Kang L, Xu B. Advanced glycation end products impair function of late endothelial progenitor cells through effects on protein kinase Akt and cyclooxygenase-2. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009 3; 381(2): 192-197.
- Chou DK, Henion TR, Jungalwala FB. Regulation of expression of sulfoglucuronyl carbohydrate (HNK-1), Amphotericin and RAGE in retinoic acid-differentiated P19 embryonal carcinoma cells. *J Neurochem*. 2003; 86(4): 917-931.
- Christou K, Markoulis N, Moulas AN, Pastaka C, Gourgoulianis KI. Reactive oxygen metabolites (ROMs) as an index of oxidative stress in obstructive sleep apnea patients. *Sleep Breath*. 2003; 7(3): 105-110.
- Chung SA, Yuan H, Chung F. A systemic review of obstructive sleep apnea and its implications for anesthesiologists. *Anesth Analg*. 2008; 107(5): 1543-1563.
- Correa-Cerro LS, Mandell JW. Molecular mechanisms of astrogliosis: new approaches with mouse genetics. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2007; 66(3): 169-176.
- Craveiro LM, Hakkoum D, Weinmann O, Montani L, Stoppini L, Schwab ME. Neutralization of the membrane protein Nogo-A enhances growth and reactive sprouting in established organotypic hippocampal slice cultures. *Eur J Neurosci*. 2008; 28(9):1808-1824.
- Cunningham LA, Candelario K, Li L. Roles for HIF-1 α in neural stem cell function and the regenerative response to stroke. *Behav Brain Res*. 2012 14; 227(2): 410-417.
- da Rosa DP, Forgiarini LF, Baronio D, Feijó CA, Martinez D, Marroni NP. Simulating sleep apnea by exposure to intermittent hypoxia induces inflammation in the lung and liver. *Mediators Inflamm*. 2012; 2012: 879419.
- Deegan PC, McNicholas WT. Pathophysiology of obstructive sleep apnea. *Eur Respir J* 1995; 8: 1161–1178.

-
- Dematteis M, Julien C, Guillermet C, Sturm N, Lantuejoul S, Mallaret M, Lévy P, Gozal E. Intermittent hypoxia induces early functional cardiovascular remodeling in mice. *Am J Respir Crit Care Med*. 2008 15; 177(2): 227-235.
- Dempsey JA, Veasey SC, Morgan BJ, O'Donnell CP. Pathophysiology of sleep apnea. *Physiol Rev*. 2010; 90(1):47-112.
- Dent MA, Segura-Anaya E, Alva-Medina J, Aranda-Anzaldo A. NeuN/Fox-3 is an intrinsic component of the neuronal nuclear matrix. *FEBS Lett*. 2010 2; 584(13): 2767-2771.
- Di Virgilio F. Liaisons dangereuses: P2X(7) and the inflammasome. *Trends Pharmacol Sci*. 2007; 28(9): 465-472.
- Dickson TC, Vickers JC. The morphological phenotype of beta-amyloid plaques and associated neuritic changes in Alzheimer's disease. *Neuroscience*. 2001; 105(1): 99-107.
- DiDonato JA, Hayakawa M, Rothwarf DM, Zandi E, Karin M. A cytokine-responsive I κ B kinase that activates the transcription factor NF- κ B. *Nature*. 1997 7; 388(6642):548-554.
- Donato R, Heizmann CW. S100B Protein in the Nervous System and Cardiovascular Apparatus in Normal and Pathological Conditions. *Cardiovasc Psychiatry Neurol*. 2010: 929712.
- Donato R, Sorci G, Riuzzi F, Arcuri C, Bianchi R, Brozzi F, Tubaro C, Giambanco I. S100B's double life: intracellular regulator and extracellular signal. *Biochim Biophys Acta*. 2009; 1793(6): 1008-1022.
- Donato R. Intracellular and extracellular roles of S100 proteins. *Microsc Res Tech*. 2003 15; 60(6): 540-551.
- Donato R. RAGE: a single receptor for several ligands and different cellular responses: the case of certain S100 proteins. *Curr Mol Med*. 2007; 7(8): 711-724.
- Donato R. S100: a multigenic family of calcium-modulated proteins of theEF-hand type with intracellular and extracellular functional roles. *Int J Biochem Cell Biol*. 2001; 33(7): 637-668.
- Dong Y, Benveniste EN. Immune function of astrocytes. *Glia*. 2001; 36(2): 180-190.
- Dutta J, Fan Y, Gupta N, Fan G, Gélinas C. Current insights into the regulation of programmed cell death by NF- κ B. *Oncogene*. 2006 30; 25(51): 6800-6816.
- Dvorientchikova G, Barakat D, Brambilla R, Agudelo C, Hernandez E, Bethea JR, Shestopalov VI, Ivanov D. Inactivation of astroglial NF- κ B promotes survival of retinal neurons following ischemic injury. *Eur J Neurosci*. 2009; 30(2): 175-185.
- Dvorientchikova G, Hernandez E, Grant J, Santos AR, Yang H, Ivanov D. The high-mobility group box-1 nuclear factor mediates retinal injury after ischemia reperfusion. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2011; 52(10): 7187-7194.
- Dyugovskaya L, Lavie P, Lavie L. Increased adhesion molecules expression and production of reactive oxygen species in leukocytes of sleep apnea patients. *Am J Respir Crit Care Med*. 2002 1; 165(7): 934-939.
- Eckert DJ, Jordan AS, Merchia P, Malhotra A. Central sleep apnea: Pathophysiology and treatment. *Chest*. 2007; 131(2): 595-607.

-
- Eckert DJ, Malhotra A. Pathophysiology of adult obstructive sleep apnea. *Proc Am Thorac Soc.* 2008 15; 5(2): 144-153.
- Elward K, Gasque P. "Eat me" and "don't eat me" signals govern the innate immune response and tissue repair in the CNS: emphasis on the critical role of the complement system. *Mol Immunol.* 2003; 40(2-4): 85-94.
- Epstein LJ, Kristo D, Strollo PJ Jr, Friedman N, Malhotra A, Patil SP, Ramar K, Rogers R, Schwab RJ, Weaver EM, Weinstein MD; Adult Obstructive Sleep Apnea Task Force of the American Academy of Sleep Medicine. Clinical guideline for the evaluation, management and long-term care of obstructive sleep apnea in adults. *J Clin Sleep Med.* 2009 15; 5(3): 263-276.
- Esterbauer H. Estimation of peroxidative damage. A critical review. *Pathol Biol (Paris).* 1996; 44(1): 25-8.
- Fanò G, Marigiò MA, Angelella P, Nicoletti I, Antonica A, Fulle S, Calissano P. The S-100 protein causes an increase of intracellular calcium and death of PC12 cells. *Neuroscience.* 1993; 53(4): 919-925.
- Farina C, Aloisi F, Meinl E. Astrocytes are active players in cerebral innate immunity. *Trends Immunol.* 2007; 28(3): 138-145.
- Faulkner JR, Herrmann JE, Woo MJ, Tansey KE, Doan NB, Sofroniew MV. Reactive astrocytes protect tissue and preserve function after spinal cord injury. *J Neurosci.* 2004 3; 24(9): 2143-2155.
- Fraga CG, Zamora R, Tappel AL. Damage to protein synthesis concurrent with lipid peroxidation in rat liver slices: effect of halogenated compounds, peroxides, and vitamin E1. *Arch Biochem Biophys.* 1989; 270(1):84-91.
- Fredholm BB. Adenosine, an endogenous distress signal, modulates tissue damage and repair. *Cell Death Differ.* 2007; 14(7): 1315-1323.
- Frizzo JK, Tramontina AC, Tramontina F, Gottfried C, Leal RB, Donato R, Gonçalves CA. Involvement of the S100B in cAMP-induced cytoskeleton remodeling in astrocytes: a study using TRTK-12 in digitonin-permeabilized cells. *Cell Mol Neurobiol.* 2004; 24(6): 833-840.
- Fujimura M, Usuki F, Sawada M, Rostene W, Godefroy D, Takashima A. Methylmercury exposure downregulates the expression of Rac1 and leads to neuritic degeneration and ultimately apoptosis in cerebrocortical neurons. *Neurotoxicology.* 2009; 30(1): 16-22.
- Fung SJ, Xi MC, Zhang JH, Sampogna S, Yamuy J, Morales FR, Chase MH. Apnea promotes glutamate-induced excitotoxicity in hippocampal neurons. *Brain Res.* 2007 7; 1179: 42-50.
- Gale SD, Hopkins RO. Effects of hypoxia on the brain: neuroimaging and neuropsychological findings following carbon monoxide poisoning and obstructive sleep apnea. *J Int Neuropsychol Soc.* 2004; 10(1): 60-71.
- Galea I, Bechmann I, Perry VH. What is immune privilege (not)? *Trends Immunol.* 2007; 28(1): 12-18.
- Gami AS, Hodge DO, Herges RM, Olson EJ, Nykodym J, Kara T, Somers VK. Obstructive sleep apnea, obesity, and the risk of incident atrial fibrillation. *J Am Coll Cardiol.* 2007 6; 49(5): 565-571.
- Garvey JF, Taylor CT, McNicholas WT. Cardiovascular disease in obstructive sleep apnoea syndrome: the role of intermittent hypoxia and inflammation. *Eur Respir J.* 2009; 33(5): 1195-1205.
- Gasque P, Dean YD, McGreal EP, VanBeek J, Morgan BP. Complement components of the innate immune system in health and disease in the CNS. *Immunopharmacology.* 2000; 49(1-2): 171-186.

-
- Gelain DP, de Bittencourt Pasquali MA, Caregnato FF, Moreira JC. Vitamin A (retinol) up-regulates the receptor for advanced glycation endproducts (RAGE) through p38 and Akt oxidant-dependent activation. *Toxicology*. 2011 28; 289(1): 38-44.
- Genetos DC, Cheung WK, Decaris ML, Leach JK. Oxygen tension modulates neurite outgrowth in PC12 cells through a mechanism involving HIF and VEGF. *J Mol Neurosci*. 2010; 40(3): 360-366.
- Gilmore TD. The Rel/NF-kappaB signal transduction pathway: introduction. *Oncogene*. 1999 22; 18(49): 6842-6844.
- Gladman SJ, Ward RE, Michael-Titus AT, Knight MM, Priestley JV. The effect of mechanical strain or hypoxia on cell death in subpopulations of rat dorsal root ganglion neurons in vitro. *Neuroscience*. 2010 1; 171(2): 577-587.
- Goldbart A, Row BW, Kheirandish L, Schurr A, Gozal E, Guo SZ, Payne RS, Cheng Z, Brittian KR, Gozal D. Intermittent hypoxic exposure during light phase induces changes in cAMP response element binding protein activity in the rat CA1 hippocampal region: water maze performance correlates. *Neuroscience*. 2003; 122(3): 585-590.
- Gozal D, Daniel JM, Dohanich GP. Behavioral and anatomical correlates of chronic episodic hypoxia during sleep in the rat. *J Neurosci*. 2001 1; 21(7): 2442-2450.
- Gozal D, Kheirandish-Gozal L. Neurocognitive and behavioral morbidity in children with sleep disorders. *Curr Opin Pulm Med*. 2007; 13(6):505-509.
- Gozal D, Nair D, Goldbart AD. Physical activity attenuates intermittent hypoxia-induced spatial learning deficits and oxidative stress. *Am J Respir Crit Care Med*. 2010 1; 182(1): 104-112.
- Gozal D, Row BW, Kheirandish L, Liu R, Guo SZ, Qiang F, Brittian KR. Increased susceptibility to intermittent hypoxia in aging rats: changes in proteasomal activity, neuronal apoptosis and spatial function. *J Neurochem*. 2003; 86(6): 1545-1552.
- Gozal E, Gozal D, Pierce WM, Thongboonkerd V, Scherzer JA, Sachleben LR Jr, Brittian KR, Guo SZ, Cai J, Klein JB. Proteomic analysis of CA1 and CA3 regions of rat hippocampus and differential susceptibility to intermittent hypoxia. *J Neurochem*. 2002; 83(2): 331-345.
- Greenberg H, Ye X, Wilson D, Htoo AK, Hendersen T, Liu SF. Chronic intermittent hypoxia activates nuclear factor-kappaB in cardiovascular tissues in vivo. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006 5; 343(2): 591-596.
- Gupta RM, Parvizi J, Hanssen AD, Gay PC. Postoperative complications in patients with obstructive sleep apnea syndrome undergoing hip or knee replacement: a case-control study. *Mayo Clin Proc*. 2001; 76(9): 897-905.
- Gutierrez H, Hale VA, Dolcet X, Davies A. NF-kappaB signalling regulates the growth of neural processes in the developing PNS and CNS. *Development*. 2005; 132(7): 1713-1726.
- Gutierrez H, O'Keefe GW, Gavaldà N, Gallagher D, Davies AM. Nuclear factor kappa B signaling either stimulates or inhibits neurite growth depending on the phosphorylation status of p65/RelA. *J Neurosci*. 2008 13; 28(33): 8246-8256.
- Haglid KG, Yang Q, Hamberger A, Bergman S, Widerberg A, Danielsen N. S-100beta stimulates neurite outgrowth in the rat sciatic nerve grafted with acellular muscle transplants. *Brain Res*. 1997 11; 753(2): 196-201.

-
- Handelman GJ; Pryor WA. Cap: Evaluation of antioxidant status in humans. Libro: Antioxidant Status, Diet, Nutrition, and Health. 1999. CRC Press.
- Hanisch UK, Johnson TV, Kipnis J. Toll-like receptors: roles in neuroprotection? Trends Neurosci. 2008; 31(4): 176-182.
- Hansen JD, Vojtech LN, Laing KJ. Sensing disease and danger: a survey of vertebrate PRRs and their origins. Dev Comp Immunol. 2011; 35(9): 886-897.
- Herrmann JE, Imura T, Song B, Qi J, Ao Y, Nguyen TK, Korsak RA, Takeda K, Akira S, Sofroniew MV. STAT3 is a critical regulator of astrogliosis and scar formation after spinal cord injury. J Neurosci. 2008 9; 28(28): 7231-7243.
- Hinojosa-Laborde C, Mifflin SW. Sex differences in blood pressure response to intermittent hypoxia in rats. Hypertension. 2005; 46(4): 1016-1021.
- Hirose M, Ishizaki T, Watanabe N, Uehata M, Kranenburg O, Moolenaar WH, Matsumura F, Maekawa M, Bito H, Narumiya S. Molecular dissection of the Rho-associated protein kinase (p160ROCK)-regulated neurite remodeling in neuroblastoma N1E-115 cells. J Cell Biol. 1998 29; 141(7): 1625-1636.
- Hofmann MA, Drury S, Fu C, Qu W, Taguchi A, Lu Y, Avila C, Kambham N, Bierhaus A, Nawroth P, Neurath MF, Slattery T, Beach D, McClary J, Nagashima M, Morser J, Stern D, Schmidt AM. RAGE mediates a novel proinflammatory axis: a central cell surface receptor for S100/calgranulin polypeptides. Cell. 1999 25; 97(7): 889-901.
- Hori O, Brett J, Slattery T, Cao R, Zhang J, Chen JX, Nagashima M, Lundh ER, Vijay S, Nitecki D, et al. The receptor for advanced glycation end products (RAGE) is a cellular binding site for amphotericin. Mediation of neurite outgrowth and co-expression of rage and amphotericin in the developing nervous system. J Biol Chem. 1995 27; 270(43): 25752-25761.
- Htoo AK, Greenberg H, Tongia S, Chen G, Henderson T, Wilson D, Liu SF. Activation of nuclear factor kappaB in obstructive sleep apnea: a pathway leading to systemic inflammation. Sleep Breath. 2006; 10(1): 43-50.
- http://www.ninds.nih.gov/disorders/brain_basics/ninds_neuron.htm
- Hu J, Castets F, Guevara JL, Van Eldik LJ. S100 beta stimulates inducible nitric oxide synthase activity and mRNA levels in rat cortical astrocytes. J Biol Chem. 1996 2; 271(5): 2543-2547.
- Hu J, Ferreira A, Van Eldik LJ. S100beta induces neuronal cell death through nitric oxide release from astrocytes. J Neurochem. 1997; 69(6): 2294-2301.
- Huttunen HJ, Kuja-Panula J, Rauvala H. Receptor for advanced glycation end products (RAGE) signaling induces CREB-dependent chromogranin expression during neuronal differentiation. J Biol Chem. 2002 11; 277(41): 38635-38646.
- Huttunen HJ, Kuja-Panula J, Sorci G, Agneletti AL, Donato R, Rauvala H. Coregulation of neurite outgrowth and cell survival by amphotericin and S100 proteins through receptor for advanced glycation end products (RAGE) activation. J Biol Chem. 2000 22; 275(51): 40096-40105.
- Ibegbu AO, Fyfe L, McBean D, Mullaney I. The Effects of Hypoxia and Opioid Receptor Agonists Treatment in Cortical B50 Neuronal Cells in Culture. J Biol Environ Sci. 2012, 6(18), 219-231.

-
- Jackson M, Gentleman S, Lennox G, Ward L, Gray T, Randall K, Morrell K, Lowe J. The cortical neuritic pathology of Huntington's disease. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 1995; 21(1): 18-26.
- Janero DR. Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. *Free Radic Biol Med.* 1990; 9(6): 515-540.
- Janeway CA Jr. The T cell receptor as a multicomponent signalling machine: CD4/CD8 coreceptors and CD45 in T cell activation. *Annu Rev Immunol.* 1992; 10: 645-674.
- Javaheri S, Smith J, Chung E. The prevalence and natural history of complex sleep apnea. *J Clin Sleep Med.* 2009 15; 5(3):205-211.
- Jeong E, Lee JY. Intrinsic and extrinsic regulation of innate immune receptors. *Yonsei Med J.* 2011; 52(3): 379-392.
- Jiang H, Fan D, Zhou G, Li X, Deng H. Phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor(LY294002) induces apoptosis of human nasopharyngeal carcinoma in vitro and in vivo. *J Exp Clin Cancer Res.* 2010 22; 29: 34.
- Jordan W, Berger C, Cohrs S, Rodenbeck A, Mayer G, Niedmann PD, von Ahsen N, Rütger E, Kornhuber J, Bleich S. CPAP-therapy effectively lowers serum homocysteine in obstructive sleep apnea syndrome. *J Neural Transm.* 2004; 111(6): 683-689.
- Jordan W, Cohrs S, Degner D, Meier A, Rodenbeck A, Mayer G, Pilz J, Rütger E, Kornhuber J, Bleich S. Evaluation of oxidative stress measurements in obstructive sleep apnea syndrome. *J Neural Transm.* 2006; 113(2): 239-254.
- Julien JP, Mushynski WE. Neurofilaments in health and disease. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol.* 1998; 61:1-23
- Jun J, Polotsky VY. Sleep disordered breathing and metabolic effects: Evidence from animal models. *Sleep Med Clin.* 2007; 2(2):263-277.
- Kawai T, Akira S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol.* 2010; 11(5): 373-384.
- Ke RH, Xiong J, Liu Y, Ye ZR. Adenosine A2a receptor induced gliosis via Akt/NF-kappaB pathway in vitro. *Neurosci Res.* 2009; 65(3): 280-285.
- Kheirandish L, Row BW, Li RC, Brittan KR, Gozal D. Apolipoprotein E-deficient mice exhibit increased vulnerability to intermittent hypoxia-induced spatial learning deficits. *Sleep.* 2005; 28(11): 1412-1417.
- Kim KK, Adelstein RS, Kawamoto S. Identification of neuronal nuclei (NeuN) as Fox-3, a new member of the Fox-1 gene family of splicing factors. *J Biol Chem.* 2009 6; 284(45): 31052-31061
- Kim SW, Lim CM, Kim JB, Shin JH, Lee S, Lee M, Lee JK. Extracellular HMGB1 released by NMDA treatment confers neuronal apoptosis via RAGE-p38 MAPK/ERK signaling pathway. *Neurotox Res.* 2011; 20(2): 159-169.
- Kinney HC, Burger PC, Harrell FE Jr, Hudson RP Jr. 'Reactive gliosis' in the medulla oblongata of victims of the sudden infant death syndrome. *Pediatrics.* 1983; 72(2): 181-187.
- Kizawa T, Nakamura Y, Takahashi S, Sakurai S, Yamauchi K, Inoue H. Pathogenic role of angiotensin II and oxidised LDL in obstructive sleep apnoea. *Eur Respir J.* 2009; 34(6): 1390-1398.

-
- Klein JB, Barati MT, Wu R, Gozal D, Sachleben LR Jr, Kausar H, Trent JO, Gozal E, Rane MJ. Akt-mediated valosin-containing protein 97 phosphorylation regulates its association with ubiquitinated proteins. *J Biol Chem.* 2005; 280(36): 31870-31881.
- Kleindienst A, McGinn MJ, Harvey HB, Colello RJ, Hamm RJ, Bullock MR. Enhanced hippocampal neurogenesis by intraventricular S100B infusion is associated with improved cognitive recovery after traumatic brain injury. *J Neurotrauma.* 2005; 22(6): 645-655.
- Kleindienst A, Ross Bullock M. A critical analysis of the role of the neurotrophic protein S100B in acute brain injury. *J Neurotrauma.* 2006; 23(8): 1185-1200.
- Kletsas D, Pratsinis H, Mariatos G, Zacharatos P, Gorgoulis VG. The proinflammatory phenotype of senescent cells: the p53-mediated ICAM-1 expression. *Ann N Y Acad Sci.* 2004; 1019: 330-332.
- Knutson KL, Spiegel K, Penev P, Van Cauter E. The metabolic consequences of sleep deprivation. *Sleep Med Rev.* 2007; 11(3): 163-178.
- Kobayashi T, Oku H, Komori A, Okuno T, Kojima S, Obayashi H, Sugiyama T, Hasegawa G, Fukui M, Nakamura N, Ikeda T. Advanced glycation end products induce death of retinal neurons via activation of nitric oxide synthase. *Exp Eye Res.* 2005; 81(6): 647-654.
- Kögel D, Peters M, König HG, Hashemi SM, Bui NT, Arolt V, Rothermundt M, Prehn JH. S100B potently activates p65/c-Rel transcriptional complexes in hippocampal neurons: Clinical implications for the role of S100B in excitotoxic brain injury. *Neuroscience.* 2004; 127(4): 913-920.
- Koh CG. Rho GTPases and their regulators in neuronal functions and development. *Neurosignals.* 2006-2007; 15(5): 228-237.
- Koh PO, Kang BI, Kim GS, Oh YS, Won CK. The effect of thrombin on astrocyte stellation with regional specificity. *J Vet Med Sci.* 2005; 67(10): 1047-1050.
- Koul D, Yao Y, Abbruzzese JL, Yung WK, Reddy SA. Tumor suppressor MMAC/PTEN inhibits cytokine-induced NF κ B activation without interfering with the IkappaB degradation pathway. *Biol Chem.* 2001 6; 276(14): 11402-11408.
- Kraiczi H, Magga J, Sun XY, Ruskoaho H, Zhao X, Hedner J. Hypoxic pressor response, cardiac size, and natriuretic peptides are modified by long-term intermittent hypoxia. *J Appl Physiol.* 1999; 87(6): 2025-2031.
- Kumagai Y, Akira S. Identification and functions of pattern-recognition receptors. *J Allergy Clin Immunol.* 2010; 125(5): 985-992.
- Kumar GK, Kim DK, Lee MS, Ramachandran R, Prabhakar NR. Activation of tyrosine hydroxylase by intermittent hypoxia: involvement of serine phosphorylation. *J Appl Physiol.* 2003; 95(2): 536-544.
- Kumar H, Kawai T, Akira S. Pathogen recognition in the innate immune response. *Biochem J.* 2009 28; 420(1): 1-16.
- Lal C, Strange C, Bachman D. Neurocognitive impairment in obstructive sleep apnea. *Chest.* 2012; 141(6):1601-1610.
- Lam AG, Koppal T, Akama KT, Guo L, Craft JM, Samy B, Schavocky JP, Watterson DM, Van Eldik LJ. Mechanism of glial activation by S100B: involvement of the transcription factor NF κ B. *Neurobiol Aging.* 2001 -; 22(5): 765-772.

-
- Lavie L, Dyugovskaya L, Lavie P. Sleep-apnea-related intermittent hypoxia and atherogenesis: adhesion molecules and monocytes/endothelial cells interactions. *Atherosclerosis*. 2005; 183(1): 183-184.
- Lavie L, Kraiczi H, Hefetz A, Ghandour H, Perelman A, Hedner J, Lavie P. Plasma vascular endothelial growth factor in sleep apnea syndrome: effects of nasal continuous positive air pressure treatment. *Am J Respir Crit Care Med*. 2002 15; 165(12): 1624-1628.
- Lavie L, Lavie P. Molecular mechanisms of cardiovascular disease in OSAHS: the oxidative stress link. *Eur Respir J*. 2009; 33(6): 1467-1484.
- Lavie L, Vishnevsky A, Lavie P. Evidence for lipid peroxidation in obstructive sleep apnea. *Sleep*. 2004 1; 27(1): 123-128.
- Lavie L. Obstructive sleep apnoea syndrome: an oxidative stress disorder. *Sleep Med Rev*. 2003; 7(1): 35-51.
- Lavie L. Oxidative stress inflammation and endothelial dysfunction in obstructive sleep apnea. *Front Biosci (Elite Ed)*. 2012 1; 4: 1391-1403.
- Lavie L. Oxidative stress: a unifying paradigm in obstructive sleep apnea and comorbidities. *Prog Cardiovas Dis* 2009; 4: 303–312.
- Lefebvre B, Godin-Ribuot D, Joyeux-Faure M, Caron F, Bessard G, Lévy P, Stanke-Labesque F. Functional assessment of vascular reactivity after chronic intermittent hypoxia in the rat. *Respir Physiol Neurobiol*. 2006 28; 150(2-3): 278-286.
- Lei Z, Ruan Y, Yang AN, Xu ZC. NMDA receptor mediated dendritic plasticity in cortical cultures after oxygen-glucose deprivation. *Neurosci Lett*. 2006 30; 407(3):224-229.
- Levy P, Bonsignore MR, Eckel J. Sleep, sleep-disordered breathing and metabolic consequences. *Eur Respir J* 2009; 34: 243–260.
- Lévy P, Pépin JL, Arnaud C, Tamsier R, Borel JC, Dematteis M, Godin-Ribuot D, Ribuot C. Intermittent hypoxia and sleep-disordered breathing: current concepts and perspectives. *Eur Respir J*. 2008; 32(4):1082-1095.
- Lévy P, Tamsier R, Minville C, Launois S, Pépin JL. Sleep apnoea syndrome in 2011: current concepts and future directions. *Eur Respir Rev*. 2011 1; 20(121):134-146.
- Li J, Bosch-Marce M, Nanayakkara A, Savransky V, Fried SK, Semenza GL, Polotsky VY. Altered metabolic responses to intermittent hypoxia in mice with partial deficiency of hypoxia-inducible factor-1alpha. *Physiol Genomics*. 2006 16; 25(3): 450-457.
- Li J, Thorne LN, Punjabi NM, Sun CK, Schwartz AR, Smith PL, Marino RL, Rodriguez A, Hubbard WC, O'Donnell CP, Polotsky VY. Intermittent hypoxia induces hyperlipidemia in lean mice. *Circ Res*. 2005 30; 97(7): 698-706.
- Li N, Karin M. Ionizing radiation and short wavelength UV activate NF-kappaB through two distinct mechanisms. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998 27; 95(22): 13012-13017.
- Li RC, Row BW, Gozal E, Kheirandish L, Fan Q, Brittian KR, Guo SZ, Sachleben LR Jr, Gozal D. Cyclooxygenase 2 and intermittent hypoxia-induced spatial deficits in the rat. *Am J Respir Crit Care Med*. 2003 15; 168(4): 469-475.

-
- Li S, Qian XH, Zhou W, Zhang Y, Feng J, Wan NS, Zhang Z, Guo R, Chen BY. Time-dependent inflammatory factor production and NF κ B activation in a rodent model of intermittent hypoxia. *Swiss Med Wkly*. 2011 30; 141: w13309
- Li XH, Lv BL, Xie JZ, Liu J, Zhou XW, Wang JZ. AGEs induce Alzheimer-like tau pathology and memory deficit via RAGE-mediated GSK-3 activation. *Neurobiol Aging*. 2012; 33(7): 1400-1410.
- Lind D, Franken S, Kappler J, Jankowski J, Schilling K. Characterization of the neuronal marker NeuN as a multiply phosphorylated antigen with discrete subcellular localization. *J Neurosci Res*. 2005 1; 79(3): 295-302.
- Ling Q, Sailan W, Ran J, Zhi S, Cen L, Yang X, Xiaoqun Q. The effect of intermittent hypoxia on bodyweight, serum glucose and cholesterol in obesity mice. *Pak J Biol Sci*. 2008 15 ;11(6): 869-875.
- Liu X, Ding X, Deshmukh G, Liederer BM, Hop CE. Use of the cassette-dosing approach to assess brain penetration in drug discovery. *Drug Metab Dispos*. 2012; 40(5): 963-969.
- Logvinoff C, Epstein AL. Intracellular Cre-mediated deletion of the unique packaging signal carried by a herpes simplex virus type 1 recombinant and its relationship to the cleavage-packaging process. *J Virol*. 2000; 74(18): 8402-8412
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 1951; 193(1): 265-275.
- Lu B. Acute and long-term synaptic modulation by neurotrophins. *Prog Brain Res*. 2004; 146: 1371-50.
- Lu Y, Christian K, Lu B. BDNF: a key regulator for protein synthesis-dependent LTP and long-term memory? *Neurobiol Learn Mem*. 2008; 89(3): 3123-23.
- Lukinovic-Skudar V, Banfic H, Visnjic D. Different effects of phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor LY294002 and Akt inhibitor SH-5 on cell cycle progression in synchronized HL-60 leukemia cells. *Period Biol*. 2011; 113(1). 61-67.
- Ma L, Carter RJ, Morton AJ, Nicholson LF. RAGE is expressed in pyramidal cells of the hippocampus following moderate hypoxic-ischemic brain injury in rats. *Brain Res*. 2003 21; 966(2): 167-174.
- Ma S, Mifflin SW, Cunningham JT, Morilak DA. Chronic intermittent hypoxia sensitizes acute hypothalamic-pituitary-adrenal stress reactivity and Fos induction in the rat locus coeruleus in response to subsequent immobilization stress. *Neuroscience*. 2008 17; 154(4): 1639-1647.
- Ma W, Lee SE, Guo J, Qu W, Hudson BI, Schmidt AM, Barile GR. RAGE ligand upregulation of VEGF secretion in ARPE-19 cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2007; 48(3): 1355-1361.
- Macey PM, Henderson LA, Macey KE, Alger JR, Frysinger RC, Woo MA, Harper RK, Yan-Go FL, Harper RM. Brain morphology associated with obstructive sleep apnea. *Am J Respir Crit Care Med*. 2002 15; 166(10): 1382-1387.
- Machuca I, Jacquemont B, Epstein A. Multiple adjacent or overlapping loci affecting the level of gC and cell fusion mapped by intratypic recombinants of HSV-1. *Virology*. 1986 15; 150(1): 117-125.
- Madrid LV, Mayo MW, Reuther JY, Baldwin AS Jr. Akt stimulates the transactivation potential of the RelA/p65 Subunit of NF-kappa B through utilization of the Ikappa B kinase and activation of the mitogen-activated protein kinase p38. *J Biol Chem*. 2001 1; 276(22): 18934-18940.

-
- Madrid LV, Wang CY, Guttridge DC, Schottelius AJ, Baldwin AS Jr, Mayo MW. Akt suppresses apoptosis by stimulating the transactivation potential of the RelA/p65 subunit of NF-kappaB. *Mol Cell Biol.* 2000; 20(5): 1626-1638.
- Maiti P, Singh SB, Muthuraju S, Veleri S, Ilavazhagan G. Hypobaric hypoxia damages the hippocampal pyramidal neurons in the rat brain. *Brain Res.* 2007 17; 1175: 1-9.
- Malow BA, Levy K, Maturen K, Bowes R. Obstructive sleep apnea is common in medically refractory epilepsy patients. *Neurology.* 2000 10; 55(7): 1002-1007.
- Manni R, Terzaghi M, Arbasino C, Sartori I, Galimberti CA, Tartara A. Obstructive sleep apnea in a clinical series of adult epilepsy patients: frequency and features of the comorbidity. *Epilepsia.* 2003; 44(6): 836-840.
- Mariggió MA, Fulle S, Calissano P, Nicoletti I, Fanó G. The brain protein S-100ab induces apoptosis in PC12 cells. *Neuroscience.* 1994; 60(1): 29-35.
- Marin JM, Carrizo SJ, Vicente E, Agusti AG. Long-term cardiovascular outcomes in men with obstructive sleep apnoea-hypopnoea with or without treatment with continuous positive airway pressure: an observational study. *Lancet.* 2005 19-25; 365(9464): 1046-1053.
- Marsh BJ, Williams-Karnesky RL, Stenzel-Poore MP. Toll-like receptor signaling in endogenous neuroprotection and stroke. *Neuroscience.* 2009 6; 158(3): 1007-1020.
- Mattila PM, Rinne JO, Helenius H, Róyttä M. Neuritic degeneration in the hippocampus and amygdala in Parkinson's disease in relation to Alzheimer pathology. *Acta Neuropathol.* 1999; 98(2): 157-164.
- Mattson MP, Meffert MK. Roles for NF-kappaB in nerve cell survival, plasticity, and disease. *Cell Death Differ.* 2006; 13(5): 852-860.
- Matzinger P. The danger model: a renewed sense of self. *Science.* 2002 12; 296(5566): 301-305.
- Matzinger P. Tolerance, danger, and the extended family. *Annu Rev Immunol.* 1994; 12: 991-1045.
- Mayne ST. Antioxidant nutrients and chronic disease: use of biomarkers of exposure and oxidative stress status in epidemiologic research. *J Nutr.* 2003; 133 Suppl 3: 933S-940S.
- McCord JM. The evolution of free radicals and oxidative stress. *Am J Med.* 2000 1; 108(8): 652-659.
- McGuire M, Bradford A. Chronic intermittent hypercapnic hypoxia increases pulmonary arterial pressure and haematocrit in rats. *Eur Respir J.* 2001; 18(2): 279-285.
- McKay LC, Janczewski WA, Feldman JL. Episodic hypoxia evokes long-term facilitation of genioglossus muscle activity in neonatal rats. *J Physiol.* 2004 15; 557(Pt 1): 13-18.
- McKenna JT, Tartar JL, Ward CP, Thakkar MM, Cordeira JW, McCarley RW, Strecker RE. Sleep fragmentation elevates behavioral, electrographic and neurochemical measures of sleepiness. *Neuroscience.* 2007 8; 146(4): 1462-1473.
- McNicholas WT. Obstructive sleep apnea and inflammation. *Prog Cardiovasc Dis.* 2009 -; 51(5): 392-399.
- Medzhitov R, Janeway C Jr. Innate immunity. *N Engl J Med.* 2000 3; 343(5): 338-344.

-
- Medzhitov R, Janeway CA Jr. Decoding the patterns of self and nonself by the innate immune system. *Science*. 2002 12; 296(5566): 298-300.
- Medzhitov R, Janeway CA Jr. Innate immunity: impact on the adaptive immune response. *Curr Opin Immunol*. 1997; 9(1): 4-9.
- Mehra R, Benjamin EJ, Shahar E, Gottlieb DJ, Nawabit R, Kirchner HL, Sahadevan J, Redline S. Association of nocturnal arrhythmias with sleep-disordered breathing: The Sleep Heart Health Study. *Am J Respir Crit Care Med*. 2006 15; 173(8): 910-916.
- Mémet S. NF-kappaB functions in the nervous system: from development to disease. *Biochem Pharmacol*. 2006 30; 72(9): 1180-1195.
- Mercurio F, Zhu H, Murray BW, Shevchenko A, Bennett BL, Li J, Young DB, Barbosa M, Mann M, Manning A, Rao A. IKK-1 and IKK-2: cytokine-activated IkkappaB kinases essential for NF-kappaB activation. *Science*. 1997 31; 278(5339): 860-866.
- Mollen KP, Anand RJ, Tsung A, Prince JM, Levy RM, Billiar TR. Emerging paradigm: toll-like receptor 4-sentinel for the detection of tissue damage. *Shock*. 2006; 26(5): 430-437.
- Mooe T, Gullsbj S, Rabben T, Eriksson P. Sleep-disordered breathing: a novel predictor of atrial fibrillation after coronary artery bypass surgery. *Coron Artery Dis*. 1996; 7(6): 475-478.
- Morgenthaler TI, Kagramanov V, Hanak V, Decker PA. Complex sleep apnea syndrome: is it a unique clinical syndrome? *Sleep*. 2006; 29(9):1203-1209.
- Morrell MJ, Jackson ML, Twigg GL, Ghiassi R, McRobbie DW, Quest RA, Pardoe H, Pell GS, Abbott DF, Rochford PD, Jackson GD, Pierce RJ, O'Donoghue FJ, Corfield DR. Changes in brain morphology in patients with obstructive sleep apnoea. *Thorax*. 2010; 65(10): 908-914.
- Mrak RE, Griffinbc WS. The role of activated astrocytes and of the neurotrophic cytokine S100B in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*. 2001; 22(6): 915-922.
- Mullen RJ, Buck CR, Smith AM. NeuN, a neuronal specific nuclear protein in vertebrates. *Development*. 1992; 116(1): 201-211.
- Nácher M, Farré R, Montserrat JM, Torres M, Navajas D, Bulbena O, Serrano-Mollar A. Biological consequences of oxygen desaturation and respiratory effort in an acute animal model of obstructive sleep apnea (OSA). *Sleep Med*. 2009; 10(8): 892-897.
- Naëgelé B, Launois SH, Mazza S, Feuerstein C, Pépin JL, Lévy P. Which memory processes are affected in patients with obstructive sleep apnea? An evaluation of 3 types of memory. *Sleep*. 2006; 29(4): 533-544.
- Naëgele B, Pepin JL, Levy P, Bonnet C, Pellat J, Feuerstein C. Cognitive executive dysfunction in patients with obstructive sleep apnea syndrome (OSAS) after CPAP treatment. *Sleep*. 1998 15; 21(4): 392-397.
- Naëgelé B, Thouvard V, Pépin JL, Lévy P, Bonnet C, Perret JE, Pellat J, Feuerstein C. Deficits of cognitive executive functions in patients with sleep apnea syndrome. *Sleep*. 1995; 18(1): 43-52.
- Nair D, Zhang SX, Ramesh V, Hakim F, Kaushal N, Wang Y, Gozal D. Sleep fragmentation induces cognitive deficits via nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase-dependent pathways in mouse. *Am J Respir Crit Care Med*. 2011 1; 184(11): 1305-1312.

-
- Nanduri J, Wang N, Yuan G, Khan SA, Souvannakitti D, Peng YJ, Kumar GK, Garcia JA, Prabhakar NR. Intermittent hypoxia degrades HIF-2alpha via calpains resulting in oxidative stress: implications for recurrent apnea-induced morbidities. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009 Jan 27;106(4):1199-204.
- Neary JT, Kang Y, Tran M, Feld J. Traumatic injury activates protein kinase B/Akt in cultured astrocytes: role of extracellular ATP and P2 purinergic receptors. *J Neurotrauma*. 2005a; 22(4): 491-500.
- Neary JT, Kang Y. Signaling from P2 nucleotide receptors to protein kinase cascades induced by CNS injury: implications for reactive gliosis and neurodegeneration. *Mol Neurobiol*. 2005a; 31(1-3): 95-103.
- Negishi M, Katoh H. Rho family GTPases as key regulators for neuronal network formation. *J Biochem*. 2002; 132(2): 157-166.
- Neuzeret PC, Gormand F, Reix P, Parrot S, Sastre JP, Buda C, Guidon G, Sakai K, Lin JS. A new animal model of obstructive sleep apnea responding to continuous positive airway pressure. *Sleep*. 2011 1; 34(4):541-548.
- Newton K, Dixit VM. Signaling in innate immunity and inflammation. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2012 1; 4(3).
- Nguyen MD, Julien JP, Rivest S. Innate immunity: the missing link in neuroprotection and neurodegeneration? *Nat Rev Neurosci*. 2002; 3(3): 216-227.
- Nguyen MD, Julien JP, Rivest S. Innate immunity: the missing link in neuroprotection and neurodegeneration? *Nat Rev Neurosci*. 2002; 3(3): 216-27.
- Nishi M, Whitaker-Azmitia PM, Azmitia EC. Enhanced synaptophysin immunoreactivity in rat hippocampal culture by 5-HT 1A agonist, S100b, and corticosteroid receptor agonists. *Synapse*. 1996; 23(1): 1-9.
- Oakes KD, Van Der Kraak GJ. Utility of the TBARS assay in detecting oxidative stress in white sucker (*Catostomus commersoni*) populations exposed to pulp mill effluent. *Aquat Toxicol*. 2003 29; 63(4): 447-463.
- O'Donoghue FJ, Wellard RM, Rochford PD, Dawson A, Barnes M, Ruehland WR, Jackson ML, Howard ME, Pierce RJ, Jackson GD. Magnetic resonance spectroscopy and neurocognitive dysfunction in obstructive sleep apnea before and after CPAP treatment. *Sleep*. 2012 1; 35(1): 41-48.
- Okun E, Griffioen KJ, Mattson MP. Toll-like receptor signaling in neural plasticity and disease. *Trends Neurosci*. 2011; 34(5): 269-281.
- Olive C. Pattern recognition receptors: sentinels in innate immunity and targets of new vaccine adjuvants. *Expert Rev Vaccines*. 2012; 11(2): 237-256.
- Ostendorp T, Leclerc E, Galichet A, Koch M, Demling N, Weigle B, Heizmann CW, Kroneck PM, Fritz G. Structural and functional insights into RAGE activation by multimeric S100B. *EMBO J*. 2007 22; 26(16): 3868-3878.
- Pack AI. Obstructive sleep apnea. *Adv Intern Med*. 1994; 39: 517-567.
- Park GH, Ryu JR, Shin CY, Choi MS, Han BH, Kim WK, Kim HC, Ko KH. Evidence that protease-activated receptor-2 mediates trypsin-induced reversal of stellation in cultured rat astrocytes. *Neurosci Res*. 2006; 54(1): 15-23.

-
- Park JG, Ramar K, Olson EJ. Updates on definition, consequences, and management of obstructive sleep apnea. *Mayo Clin Proc.* 2011; 86(6): 549-554.
- Park JS, Bateman MC, Goldberg MP. Rapid alterations in dendrite morphology during sublethal hypoxia or glutamate receptor activation. *Neurobiol Dis.* 1996; 3(3):215-227.
- Paul CE, Vereker E, Dickson KM, Barker PA. A pro-apoptotic fragment of the p75 neurotrophin receptor is expressed in p75NTRExonIV null mice. *J Neurosci.* 2004 25; 24(8): 1917-23.
- Paxinos G and Watson C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*, 6th Ed, Elsevier, San Diego, 2007.
- Peng YJ, Overholt JL, Kline D, Kumar GK, Prabhakar NR. Induction of sensory long-term facilitation in the carotid body by intermittent hypoxia: implications for recurrent apneas. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2003 19; 100(17): 10073-10078.
- Peng YJ, Yuan G, Ramakrishnan D, Sharma SD, Bosch-Marce M, Kumar GK, Semenza GL, Prabhakar NR. Heterozygous HIF-1alpha deficiency impairs carotid body-mediated systemic responses and reactive oxygen species generation in mice exposed to intermittent hypoxia. *J Physiol.* 2006 1; 577(Pt 2): 705-716.
- Peppard PE, Young T, Palta M, Skatrud J. Prospective study of the association between sleep-disordered breathing and hypertension. *N Engl J Med.* 2000 11; 342(19): 1378-1384.
- Phillips SA, Olson EB, Morgan BJ, Lombard JH. Chronic intermittent hypoxia impairs endothelium-dependent dilation in rat cerebral and skeletal muscle resistance arteries. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2004; 286(1): H388-393.
- Piccinini AM, Midwood KS. DAMPening inflammation by modulating TLR signalling. *Mediators Inflamm.* 2010; 2010.
- Pichiule P, Chavez JC, Schmidt AM, Vannucci SJ. Hypoxia-inducible factor-1 mediates neuronal expression of the receptor for advanced glycation end products following hypoxia/ischemia. *J Biol Chem.* 2007 14; 282(50): 36330-36340.
- Pikul J, Leszczynski DE. Butylated hydroxytoluene addition improves the thiobarbituric acid assay for malonaldehyde from chicken plasma fat. *Nahrung.* 1986; 30(7): 673-678.
- Ponath G, Schettler C, Kaestner F, Voigt B, Wentker D, Arolt V, Rothermundt M. Autocrine S100B effects on astrocytes are mediated via RAGE. *J Neuroimmunol.* 2007; 184(1-2): 214-222.
- Poo MM. Neurotrophins as synaptic modulators. *Nat Rev Neurosci.* 2001; 2(1): 24-32.
- Prabhakar NR, Kumar GK, Nanduri J. Intermittent hypoxia-mediated plasticity of acute O2 sensing requires altered red-ox regulation by HIF-1 and HIF-2. *Ann N Y Acad Sci.* 2009; 1177: 162-168.
- Punjabi NM, Ahmed MM, Polotsky VY, Beamer BA, O'Donnell CP. Sleep-disordered breathing, glucose intolerance, and insulin resistance. *Respir Physiol Neurobiol.* 2003 16; 136(2-3): 167-178.
- Punjabi NM, Shahar E, Redline S, Gottlieb DJ, Givelber R, Resnick HE. Sleep-disordered breathing, glucose intolerance, and insulin resistance: the Sleep Heart Health Study. *Am J Epidemiol.* 2004 15; 160(6): 521-530.
- Punjabi NM. The epidemiology of adult obstructive sleep apnea. *Proc Am Thorac Soc.* 2008 15; 5(2): 136-143.

-
- Qin J, Goswami R, Dawson S, Dawson G. Expression of the receptor for advanced glycation end products in oligodendrocytes in response to oxidative stress. *J Neurosci Res.* 2008 15; 86(11): 2414-2422.
- Rae C, Bartlett DJ, Yang Q, Walton D, Denotti A, Sachinwalla T, Grunstein RR. Dynamic changes in brain bioenergetics during obstructive sleep apnea. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2009; 29(8):1421-1428.
- Rai V, Maldonado AY, Burz DS, Reverdatto S, Yan SF, Schmidt AM, Shekhtman A. Signal transduction in receptor for advanced glycation end products (RAGE): solution structure of C-terminal rage (ctRAGE) and its binding to mDia1. *J Biol Chem.* 2012 10; 287(7): 5133-5144.
- Ramakers GJ, Moolenaar WH. Regulation of astrocyte morphology by RhoA and lysophosphatidic acid. *Exp Cell Res.* 1998 15; 245(2):252-262.
- Ramanathan L, Gozal D, Siegel JM. Antioxidant responses to chronic hypoxia in the rat cerebellum and pons. *J Neurochem.* 2005; 93(1): 47-52.
- Rammes A, Roth J, Goebeler M, Klempt M, Hartmann M, Sorg C. Myeloid-related protein (MRP) 8 and MRP14, calcium-binding proteins of the S100 family, are secreted by activated monocytes via a novel, tubulin-dependent pathway. *J Biol Chem.* 1997 4; 272(14): 9496-9502.
- Ramos A, Ho WC, Forte S, Dickson K, Boutilier J, Favell K, Barker PA. Hypo-osmolar stress induces p75NTR expression by activating Sp1-dependent transcription. *J Neurosci.* 2007 7 ;27(6):1498-1506.
- Ramos AJ, Rubio MD, Defagot C, Hirschberg L, Villar MJ, Brusco A. The 5HT1A receptor agonist, 8-OH-DPAT, protects neurons and reduces astroglial reaction after ischemic damage caused by cortical devascularization. *Brain Res.* 2004 31; 1030(2): 201-220.
- Ramos AJ, Tagliaferro P, López EM, Pecci Saavedra J, Brusco A. Neuroglial interactions in a model of para-chlorophenylalanine-induced serotonin depletion. *Brain Res.* 2000 10; 883(1):1-14.
- Realì C, Scintu F, Pillai R, Donato R, Michetti F, Sogos V. S100b counteracts effects of the neurotoxicant trimethyltin on astrocytes and microglia. *J Neurosci Res.* 2005 1; 81(5): 677-686.
- Redline S, Yenokyan G, Gottlieb DJ, Shahar E, O'Connor GT, Resnick HE, Diener-West M, Sanders MH, Wolf PA, Geraghty EM, Ali T, Lebowitz M, Punjabi NM. Obstructive sleep apnea-hypopnea and incident stroke: the sleep heart health study. *Am J Respir Crit Care Med.* 2010 15; 182(2): 269-277.
- Reeves RH, Yao J, Crowley MR, Buck S, Zhang X, Yarowsky P, Gearhart JD, Hilt DC. Astrocytosis and axonal proliferation in the hippocampus of S100b transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994 7; 91(12): 5359-5363.
- Reinke C, Bevans-Fonti S, Drager LF, Shin MK, Polotsky VY. Effects of different acute hypoxic regimens on tissue oxygen profiles and metabolic outcomes. *J Appl Physiol.* 2011; 111(3): 881-890.
- Ridder DA, Schwaninger M. NF-kappaB signaling in cerebral ischemia. *Neuroscience.* 2009 6; 158(3): 995-1006.
- Robertson CL, Puskar A, Hoffman GE, Murphy AZ, Saraswati M, Fiskum G. Physiologic progesterone reduces mitochondrial dysfunction and hippocampal cell loss after traumatic brain injury in female rats. *Exp Neurol.* 2006; 197(1):235-243.

-
- Roche S, Koegl M, Courtneidge SA. The phosphatidylinositol 3-kinase alpha is required for DNA synthesis induced by some, but not all, growth factors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994 13; 91(19): 9185-9189.
- Rong LL, Gooch C, Szabolcs M, Herold KC, Lalla E, Hays AP, Yan SF, Yan SS, Schmidt AM. RAGE: a journey from the complications of diabetes to disorders of the nervous system - striking a fine balance between injury and repair. *Restor Neurol Neurosci*. 2005; 23(5-6): 355-365.
- Rong LL, Trojaborg W, Qu W, Kostov K, Yan SD, Gooch C, Szabolcs M, Hays AP, Schmidt AM. Antagonism of RAGE suppresses peripheral nerve regeneration. *FASEB J*. 2004a; 18(15): 1812-1817.
- Rong LL, Yan SF, Wendt T, Hans D, Pachydaki S, Bucciarelli LG, Adebayo A, Qu W, Lu Y, Kostov K, Lalla E, Yan SD, Gooch C, Szabolcs M, Trojaborg W, Hays AP, Schmidt AM. RAGE modulates peripheral nerve regeneration via recruitment of both inflammatory and axonal outgrowth pathways. *FASEB J*. 2004b; 18(15): 1818-1825.
- Rose CR, Blum R, Kafitz KW, Kovalchuk Y, Konnerth A. From modulator to mediator: rapid effects of BDNF on ion channels. *Bioessays*. 2004; 26(11): 1185-1194.
- Rosin DL, Okusa MD. Dangers within: DAMP responses to damage and cell death in kidney disease. *J Am Soc Nephrol*. 2011; 22(3): 416-425.
- Row BW, Kheirandish L, Neville JJ, Gozal D. Impaired spatial learning and hyperactivity in developing rats exposed to intermittent hypoxia. *Pediatr Res*. 2002; 52(3): 449-453.
- Row BW, Liu R, Xu W, Kheirandish L, Gozal D. Intermittent hypoxia is associated with oxidative stress and spatial learning deficits in the rat. *Am J Respir Crit Care Med*. 2003 1; 167(11): 1548-1553.
- Ryan S, McNicholas WT, Taylor CT. A critical role for p38 map kinase in NF-kappaB signaling during intermittent hypoxia/reoxygenation. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007 13; 355(3): 728-733.
- Ryan S, Taylor CT, McNicholas WT. Predictors of elevated nuclear factor-kappaB-dependent genes in obstructive sleep apnea syndrome. *Am J Respir Crit Care Med*. 2006 1; 174(7): 824-830.
- Ryan S, Taylor CT, McNicholas WT. Selective activation of inflammatory pathways by intermittent hypoxia in obstructive sleep apnea syndrome. *Circulation*. 2005 25; 112(17): 2660-2667.
- Ryu BR, Lee YA, Won SJ, Noh JH, Chang SY, Chung JM, Choi JS, Joo CK, Yoon SH, Gwag BJ. The novel neuroprotective action of sulfasalazine through blockade of NMDA receptors. *J Pharmacol Exp Ther*. 2003; 305(1): 48-56.
- Saarelainen S, Lehtimäki T, Jaakola O, Poussa T, Nikkilä M, Solakivi T, Nieminen MM. Autoantibodies against oxidised low-density lipoprotein in patients with obstructive sleep apnoea. *Clin Chem Lab Med*. 1999; 37(5): 517-520.
- Sarnico I (a), Lanzillotta A, Benarese M, Alghisi M, Baiguera C, Battistin L, Spano P, Pizzi M. NF-kappaB dimers in the regulation of neuronal survival. *Int Rev Neurobiol*. 2009a; 85: 351-362.
- Sarnico I (b), Lanzillotta A, Boroni F, Benarese M, Alghisi M, Schwaninger M, Inta I, Battistin L, Spano P, Pizzi M. NF-kappaB p50/RelA and c-Rel-containing dimers: opposite regulators of neuron vulnerability to ischaemia. *J Neurochem*. 2009b; 108(2): 475-485.
- Satoh S, Kawasaki K, Hitomi A, Ikegaki I, Asano T. Fasudil protects cultured N1E-115 cells against lysophosphatidic acid-induced neurite retraction through inhibition of Rho-kinase. *Brain Res Bull*. 2011 1; 84(2): 174-177.

-
- Savransky V, Nanayakkara A, Li J, Bevans S, Smith PL, Rodriguez A, Polotsky VY. Chronic intermittent hypoxia induces atherosclerosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2007 15; 175(12):1290-1297.
- Sawaguchi T, Franco P, Kato I, Shimizu S, Kadhim H, Groswasser J, Sottiaux M, Togari H, Kobayashi M, Nishida H, Sawaguchi A, Kahn A. Interaction between apnea, prone sleep position and gliosis in the brainstems of victims of SIDS. *Forensic Sci Int.* 2002 14; 130 Suppl: S44-52.
- Schenk H, Vogt M, Dröge W, Schulze-Osthoff K. Thioredoxin as a potent costimulus of cytokine expression. *J Immunol.* 1996 15; 156(2): 765-771.
- Schmidt-Ott KM, Xu AD, Tuschick S, Liefeldt L, Kresse W, Verkhatsky A, Kettenmann H, Paul M. Hypoxia reverses dibutyryl-cAMP-induced stellation of cultured astrocytes via activation of the endothelin system. *FASEB J.* 2001; 15(7):1227-1229.
- Schmitt A, Bigl K, Meiners I, Schmitt J. Induction of reactive oxygen species and cell survival in the presence of advanced glycation end products and similar structures. *Biochim Biophys Acta.* 2006; 1763(9): 927-936.
- Schulz R, Mahmoudi S, Hattar K, Sibelius U, Olschewski H, Mayer K, Seeger W, Grimminger F. Enhanced release of superoxide from polymorphonuclear neutrophils in obstructive sleep apnea. Impact of continuous positive airway pressure therapy. *Am J Respir Crit Care Med.* 2000; 162(2 Pt 1): 566-570.
- Selinfreund RH, Barger SW, Pledger WJ, Van Eldik LJ. Neurotrophic protein S100 beta stimulates glial cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991 1; 88(9): 3554-3558.
- Semenza GL, Prabhakar NR. HIF-1-dependent respiratory, cardiovascular, and redox responses to chronic intermittent hypoxia. *Antioxid Redox Signal.* 2007; 9(9): 1391-1396.
- Semenza GL, Prabhakar NR. The role of hypoxia-inducible factors in oxygen sensing by the carotid body. *Adv Exp Med Biol.* 2012; 758: 1-5.
- Semenza GL. Hydroxylation of HIF-1: oxygen sensing at the molecular level. *Physiology (Bethesda).* 2004; 19: 176-182.
- Semenza GL. Oxygen-dependent regulation of mitochondrial respiration by hypoxia-inducible factor 1. *Biochem J.* 2007 1; 405(1): 1-9.
- Semenza GL. Oxygen-regulated transcription factors and their role in pulmonary disease. *Respir Res.* 2000; 1(3): 159-162.
- Sen J, Belli A. S100B in neuropathologic states: the CRP of the brain? *J Neurosci Res.* 2007 15; 85(7): 1373-1380.
- Shan X, Chi L, Ke Y, Luo C, Qian S, Gozal D, Liu R. Manganese superoxide dismutase protects mouse cortical neurons from chronic intermittent hypoxia-mediated oxidative damage. *Neurobiol Dis.* 2007; 28(2): 206-215.
- Shanmugam N, Kim YS, Lanting L, Natarajan R. Regulation of cyclooxygenase-2 expression in monocytes by ligation of the receptor for advanced glycation end products. *J Biol Chem.* 2003 12; 278(37): 34834-34844.
- Sharp FR, Beraud M. HIF1 and oxygen sensing in the brain. *Nat Rev Neurosci.* 2004; 5(6): 437-448.

-
- Shivakrupa R, Bernstein A, Watring N, Linnekin D. Phosphatidylinositol 3'-kinase is required for growth of mast cells expressing the kit catalytic domain mutant. *Cancer Res.* 2003 1; 63(15): 4412-4419.
- Simmons S, Pruitt B. Sounding the alarm for patients with obstructive sleep apnea. *Nursing.* 2012; 42(4): 34-41.
- Sirisinha S. Insight into the mechanisms regulating immune homeostasis in health and disease. *Asian Pac J Allergy Immunol.* 2011; 29(1): 1-14.
- Siyam MA, Benhamou D. Difficult endotracheal intubation in patients with sleep apnea syndrome. *Anesth Analg.* 2002; 95(4): 1098-1102, table of contents.
- Sizemore N, Leung S, Stark GR. Activation of phosphatidylinositol 3-kinase in response to interleukin-1 leads to phosphorylation and activation of the NF-kappaB p65/RelA subunit. *Mol Cell Biol.* 1999; 19(7): 4798-4805.
- Slipczuk L, Bekinschtein P, Kathe C, Cammarota M, Izquierdo I, Medina JH. BDNF activates mTOR to regulate GluR1 expression required for memory formation. *PLoS One.* 2009 Jun 23;4(6):e6007.
- Sofroniew MV. Molecular dissection of reactive astrogliosis and glial scar formation. *Trends Neurosci.* 2009; 32(12): 638-647.
- Song D, Fang G, Mao SZ, Ye X, Liu G, Gong Y, Liu SF. Chronic intermittent hypoxia induces atherosclerosis by NF-kB-dependent mechanisms. *Biochim Biophys Acta.* 2012; 1822(11): 1650-1659.
- Sorci G, Bianchi R, Riuzzi F, Tubaro C, Arcuri C, Giambanco I, Donato R. S100B Protein, A Damage-Associated Molecular Pattern Protein in the Brain and Heart, and Beyond. *Cardiovasc Psychiatry Neurol.* 2010.
- Soro-Paavonen A, Watson AM, Li J, Paavonen K, Koitka A, Calkin AC, Barit D, Coughlan MT, Drew BG, Lancaster GI, Thomas M, Forbes JM, Nawroth PP, Bierhaus A, Cooper ME, Jandeleit-Dahm KA. Receptor for advanced glycation end products (RAGE) deficiency attenuates the development of atherosclerosis in diabetes. *Diabetes.* 2008; 57(9):2461-2469.
- Spiegel K, Leproult R, Van Cauter E. Impact of sleep debt on metabolic and endocrine function. *Lancet.* 1999 23; 354(9188): 1435-1439.
- Spiegel K, Tasali E, Penev P, Van Cauter E. Brief communication: Sleep curtailment in healthy young men is associated with decreased leptin levels, elevated ghrelin levels, and increased hunger and appetite. *Ann Intern Med.* 2004 7; 141(11): 846-850.
- Steiner J, Bernstein HG, Bogerts B, Gos T, Richter-Landsberg C, Wunderlich MT, Keilhoff G. S100B is expressed in, and released from, OLN-93 oligodendrocytes: Influence of serum and glucose deprivation. *Neuroscience.* 2008 23; 154(2): 496-503.
- Suzuki YJ, Forman HJ, Sevanian A. Oxidants as stimulators of signal transduction. *Free Radic Biol Med.* 1997; 22(1-2): 269-285.
- Svatikova A, Wolk R, Lerman LO, Juncos LA, Greene EL, McConnell JP, Somers VK. Oxidative stress in obstructive sleep apnoea. *Eur Heart J.* 2005; 26(22): 2435-2439.
- Taheri S, Lin L, Austin D, Young T, Mignot E. Short sleep duration is associated with reduced leptin, elevated ghrelin, and increased body mass index. *PLoS Med.* 2004; 1(3): e62.
- Takeuchi O, Akira S. Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell.* 2010 19; 140(6): 805-820.

-
- Tan KC, Chow WS, Lam JC, Lam B, Wong WK, Tam S, Ip MS. HDL dysfunction in obstructive sleep apnea. *Atherosclerosis*. 2006; 184(2): 377-382.
- Tanabe K, Bonilla I, Winkles JA, Strittmatter SM. Fibroblast growth factor-inducible-14 is induced in axotomized neurons and promotes neurite outgrowth. *J Neurosci*. 2003 22; 23(29): 9675-9686.
- Tasali E, Leproult R, Ehrmann DA, Van Cauter E. Slow-wave sleep and the risk of type 2 diabetes in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008 22; 105(3): 1044-1049.
- Taylor CT. Interdependent roles for hypoxia inducible factor and nuclear factor-kappaB in hypoxic inflammation. *J Physiol*. 2008 1; 586(Pt 17): 4055-4059.
- Toffoli S, Roegiers A, Feron O, Van Steenbrugge M, Ninane N, Raes M, Michiels C. Intermittent hypoxia is an angiogenic inducer for endothelial cells: role of HIF-1. *Angiogenesis*. 2009; 12(1): 47-67.
- Tomasevic N, Jia Z, Russell A, Fujii T, Hartman JJ, Clancy S, Wang M, Beraud C, Wood KW, Sakowicz R. Differential regulation of WASP and N-WASP by Cdc42, Rac1, Nck, and PI(4,5)P2. *Biochemistry*. 2007 20; 46(11): 3494-3502.
- Toth C, Schmidt AM, Tuor UI, Francis G, Foniok T, Brussee V, Kaur J, Yan SF, Martinez JA, Barber PA, Buchan A, Zochodne DW. Diabetes, leukoencephalopathy and rage. *Neurobiol Dis*. 2006; 23(2): 445-461.
- Tramontina F, Tramontina AC, Souza DF, Leite MC, Gottfried C, Souza DO, Wofchuk ST, Gonçalves CA. Glutamate uptake is stimulated by extracellular S100B in hippocampal astrocytes. *Cell Mol Neurobiol*. 2006; 26(1): 81-86.
- Trautmann A. Extracellular ATP in the immune system: more than just a "danger signal". *Sci Signal*. 2009 3; 2(56): pe6.
- Tsatsanis C, Androulidaki A, Venihaki M, Margioris AN. Signalling networks regulating cyclooxygenase-2. *Int J Biochem Cell Biol*. 2006; 38(10): 1654-1661.
- Ueda S, Gu XF, Whitaker-Azmitia PM, Naruse I, Azmitia EC. Neuro-glial neurotrophic interaction in the S-100 beta retarded mutant mouse (Polydactyly Nagoya). I. Immunocytochemical and neurochemical studies. *Brain Res*. 1994 7; 633(1-2): 275-283.
- Ueda S, Kokotos Leonardi ET, Bell J 3rd, Azmitia EC. Serotonergic sprouting into transplanted C-6 gliomas is blocked by S-100 beta antisense gene. *Brain Res Mol Brain Res*. 1995; 29(2): 365-368.
- Ueda S, Saitoh Y, Koibuchi N, Ishizuya-Oka A. Local disturbance of neuronal migration in the S-100beta-retarded mutant mouse. *Cell Tissue Res*. 1997; 289(3): 547-551.
- Unal-Cevik I, Kiliç M, Gürsoy-Ozdemir Y, Gurer G, Dalkara T. Loss of NeuN immunoreactivity after cerebral ischemia does not indicate neuronal cell loss: a cautionary note. *Brain Res*. 2004 23; 1015(1-2): 169-174.
- Valham F, Mooe T, Rabben T, Stenlund H, Wiklund U, Franklin KA. Increased risk of stroke in patients with coronary artery disease and sleep apnea: a 10-year follow-up. *Circulation*. 2008 26; 118(9): 955-960.
- Valipour A, Litschauer B, Mittermayer F, Rauscher H, Burghuber OC, Wolzt M. Circulating plasma levels of vascular endothelial growth factor in patients with sleep disordered breathing. *Respir Med*. 2004; 98(12): 1180-1186.

-
- Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol.* 2007; 39(1): 44-84.
- van Beijnum JR, Buurman WA, Griffioen AW. Convergence and amplification of toll-like receptor (TLR) and receptor for advanced glycation end products (RAGE) signaling pathways via high mobility group B1 (HMGB1). *Angiogenesis.* 2008; 11(1): 91-99.
- Van Eldik LJ, Christie-Pope B, Bolin LM, Shooter EM, Whetsell WO Jr. Neurotrophic activity of S-100 beta in cultures of dorsal root ganglia from embryonic chick and fetal rat. *Brain Res.* 1991 1; 542(2):280-285.
- Van Eldik LJ, Staecker JL, Winningham-Major F. Synthesis and expression of a gene coding for the calcium-modulated protein S100 beta and designed for cassette-based, site-directed mutagenesis. *J Biol Chem.* 1988 5; 263(16): 7830-7837.
- Van Eldik LJ, Wainwright MS. The Janus face of glial-derived S100B: beneficial and detrimental functions in the brain. *Restor Neurol Neurosci.* 2003; 21(3-4): 97-108.
- van Loo G, De Lorenzi R, Schmidt H, Huth M, Mildner A, Schmidt-Supprian M, Lassmann H, Prinz MR, Pasparakis M. Inhibition of transcription factor NF-kappaB in the central nervous system ameliorates autoimmune encephalomyelitis in mice. *Nat Immunol.* 2006; 7(9): 954-961.
- van Uden P, Kenneth NS, Rocha S. Regulation of hypoxia-inducible factor-1alpha by NF-kappaB. *Biochem J.* 2008 15; 412(3): 477-484.
- Veasey SC, Davis CW, Fenik P, Zhan G, Hsu YJ, Pratico D, Gow A. Long-term intermittent hypoxia in mice: protracted hypersomnolence with oxidative injury to sleep-wake brain regions. *Sleep.* 2004 15; 27(2): 194-201.
- Villarreal A, Aviles Reyes RX, Angelo MF, Reines AG, Ramos AJ. S100B alters neuronal survival and dendrite extension via RAGE-mediated NF-kB signaling. *J Neurochem.* 2011; 117(2): 321-332.
- Villarreal A; Seoane R, Gonzalez Torres MA, Angelo MF, Aviles Reyes RX, Rossi AR, Barker P; Ramos AJ. S100B is a Damage Associated Molecular Pattern protein (DAMP) that promotes reactive gliosis in a RAGE-dependent manner. *En redacción.* 2013
- Volgin DV, Kubin L. Chronic intermittent hypoxia alters hypothalamic transcription of genes involved in metabolic regulation. *Auton Neurosci.* 2006 30; 126-127: 93-99.
- Wahl C, Liptay S, Adler G, Schmid RM. Sulfasalazine: a potent and specific inhibitor of nuclear factor kappa B. *J Clin Invest.* 1998 1; 101(5):1163-1174.
- Wainwright MS, Craft JM, Griffin WS, Marks A, Pineda J, Padgett KR, Van Eldik LJ. Increased susceptibility of S100B transgenic mice to perinatal hypoxia-ischemia. *Ann Neurol.* 2004; 56(1): 61-67.
- Walmsley SR, Print C, Farahi N, Peyssonnaud C, Johnson RS, Cramer T, SobolewskiA, Condliffe AM, Cowburn AS, Johnson N, Chilvers ER. Hypoxia-induced neutrophil survival is mediated by HIF-1alpha-dependent NF-kappaB activity. *J Exp Med.* 2005 3; 201(1): 105-115.
- Wang B, Yan B, Song D, Ye X, Liu SF. Chronic intermittent hypoxia down-regulates endothelial nitric oxide synthase expression by an NF-kB-dependent mechanism. *Sleep Med.* 2012 21. pii: S1389-9457(12)00398-X.

-
- Wang GL, Jiang BH, Rue EA, Semenza GL. Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995 6; 92(12): 5510-5514.
- Wang L, Li S, Jungalwala FB. Receptor for advanced glycation end products (RAGE) mediates neuronal differentiation and neurite outgrowth. *J Neurosci Res*. 2008 1; 86(6):1254-1266.
- Wang Y, Guo SZ, Bonen A, Li RC, Kheirandish-Gozal L, Zhang SX, Brittan KR, Gozal D. Monocarboxylate transporter 2 and stroke severity in a rodent model of sleep apnea. *Neurosci*. 2011 13; 31(28):10241-10248.
- Wang Y, Zhang SX, Gozal D. Reactive oxygen species and the brain in sleep apnea. *Respir Physiol Neurobiol*. 2010 31; 174(3): 307-316.
- Wang Z, Li DD, Liang YY, Wang DS, Cai NS. Activation of astrocytes by advanced glycation end products: cytokines induction and nitric oxide release. *Acta Pharmacol Sin*. 2002; 23(11): 974-980.
- Ward CP, McCoy JG, McKenna JT, Connolly NP, McCarley RW, Strecker RE. Spatial learning and memory deficits following exposure to 24 h of sleep fragmentation or intermittent hypoxia in a rat model of obstructive sleep apnea. *Brain Res*. 2009 19; 1294: 128-137.
- Weber CK, Liptay S, Wirth T, Adler G, Schmid RM. Suppression of NF-kappaB activity by sulfasalazine is mediated by direct inhibition of IkappaB kinases alpha and beta. *Gastroenterology*. 2000; 119(5):1209-1218.
- Whitaker-Azmitia PM, Wingate M, Borella A, Gerlai R, Roder J, Azmitia EC. Transgenic mice overexpressing the neurotrophic factor S-100 beta show neuronal cytoskeletal and behavioral signs of altered aging processes: implications for Alzheimer's disease and Down's syndrome. *Brain Res*. 1997 21; 776(1-2): 51-60.
- Wilhelmsson U, Bushong EA, Price DL, Smarr BL, Phung V, Terada M, Ellisman MH, Pekny M. Redefining the concept of reactive astrocytes as cells that remain within their unique domains upon reaction to injury. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006 14; 103(46): 17513-17518.
- Williams A, Scharf SM. Obstructive sleep apnea, cardiovascular disease, and inflammation--is NF-kappaB the key? *Sleep Breath*. 2007; 11(2): 69-76.
- Winnicki M, Shamsuzzaman A, Lanfranchi P, Accurso V, Olson E, Davison D, Somers VK. Erythropoietin and obstructive sleep apnea. *Am J Hypertens*. 2004; 17(9): 783-786.
- Winningham-Major F, Staecker JL, Barger SW, Coats S, Van Eldik LJ. Neurite extension and neuronal survival activities of recombinant S100 beta proteins that differ in the content and position of cysteine residues. *J Cell Biol*. 1989; 109(6 Pt 1): 3063-3071.
- Winocur G, Roder J, Lobaugh N. Learning and memory in S100-beta transgenic mice: an analysis of impaired and preserved function. *Neurobiol Learn Mem*. 2001; 75(2): 230-243.
- Wyler AR, Weymuller EA Jr. Epilepsy complicated by sleep apnea. *Ann Neurol*. 1981; 9(4): 403-404.
- Xia Y, Choi HK, Lee K. Recent advances in hypoxia-inducible factor (HIF)-1inhibitors. *Eur J Med Chem*. 2012; 49: 24-40.
- Xie H, Leung KL, Chen L, Chan YS, Ng PC, Fok TF, Wing YK, Ke Y, Li AM, Yung WH. Brain-derived neurotrophic factor rescues and prevents chronic intermittent hypoxia-induced impairment of hippocampal long-term synaptic plasticity. *Neurobiol Dis*. 2010; 40(1): 155-162.

-
- Xie H, Yung WH. Chronic intermittent hypoxia-induced deficits in synaptic plasticity and neurocognitive functions: a role for brain-derived neurotrophic factor. *Acta Pharmacol Sin.* 2012; 33(1): 5-10.
- Xu W, Chi L, Row BW, Xu R, Ke Y, Xu B, Luo C, Kheirandish L, Gozal D, Liu R. Increased oxidative stress is associated with chronic intermittent hypoxia-mediated brain cortical neuronal cell apoptosis in a mouse model of sleep apnea. *Neuroscience.* 2004; 126(2): 313-323.
- Yagi K. A simple fluorometric assay for lipoperoxide in blood plasma. *Biochem Med.* 1976; 15(2): 212-216.
- Yamauchi M, Kimura H, Strohl KP. Mouse models of apnea: strain differences in apnea expression and its pharmacologic and genetic modification. *Adv Exp Med Biol.* 2010; 669: 303-307.
- Yamauchi M, Nakano H, Maekawa J, Okamoto Y, Ohnishi Y, Suzuki T, Kimura H. Oxidative stress in obstructive sleep apnea. *Chest.* 2005; 127(5): 1674-1679.
- Yamauchi M, Tamaki S, Tomoda K, Yoshikawa M, Fukuoka A, Makinodan K, Koyama N, Suzuki T, Kimura H. Evidence for activation of nuclear factor kappaB in obstructive sleep apnea. *Sleep Breath.* 2006; 10(4): 189-193.
- Yan SD, Chen X, Fu J, Chen M, Zhu H, Roher A, Slattery T, Zhao L, Nagashima M, Morser J, Migheli A, Nawroth P, Stern D, Schmidt AM. RAGE and amyloid-beta peptide neurotoxicity in Alzheimer's disease. *Nature.* 1996 22; 382(6593): 685-691.
- Yang H, Wang H, Czura CJ, Tracey KJ. The cytokine activity of HMGB1. *J Leukoc Biol.* 2005; 78(1): 1-8.
- Yaron A, Hatzubai A, Davis M, Lavon I, Amit S, Manning AM, Andersen JS, Mann M, Mercurio F, Ben-Neriah Y. Identification of the receptor component of the I κ B α -ubiquitin ligase. *Nature.* 1998 10; 396(6711): 590-594.
- Yonekura H, Yamamoto Y, Sakurai S, Watanabe T, Yamamoto H. Roles of the receptor for advanced glycation endproducts in diabetes-induced vascular injury. *J Pharmacol Sci.* 2005; 97(3):305-311.
- Young T, Palta M, Dempsey J, Skatrud J, Weber S, Badr S. The occurrence of sleep-disordered breathing among middle-aged adults. *N Engl J Med.* 1993 29; 328(17): 1230-1235.
- Young T, Shahar E, Nieto FJ, Redline S, Newman AB, Gottlieb DJ, Walsleben JA, Finn L, Enright P, Samet JM; Sleep Heart Health Study Research Group. Predictors of sleep-disordered breathing in community-dwelling adults: the Sleep Heart Health Study. *Arch Intern Med.* 2002 22; 162(8): 893-900.
- Yuan G, Nanduri J, Bhasker CR, Semenza GL, Prabhakar NR. Ca²⁺/calmodulin kinase-dependent activation of hypoxia inducible factor 1 transcriptional activity in cells subjected to intermittent hypoxia. *J Biol Chem.* 2005 11; 280(6): 4321-4328.
- Yuan G, Nanduri J, Khan S, Semenza GL, Prabhakar NR. Induction of HIF-1 α expression by intermittent hypoxia: involvement of NADPH oxidase, Ca²⁺ signaling, prolyl hydroxylases, and mTOR. *J Cell Physiol.* 2008; 217(3):674-685
- Zamanian JL, Xu L, Foo LC, Nouri N, Zhou L, Giffard RG, Barres BA. Genomic analysis of reactive astrogliosis. *J Neurosci.* 2012 2; 32(18): 6391-6410.
- Zandi E, Rothwarf DM, Delhase M, Hayakawa M, Karin M. The I κ B kinase complex (IKK) contains two kinase subunits, IKK α and IKK β , necessary for I κ B phosphorylation and NF- κ B activation. *Cell.* 1997 17; 91(2): 243-252.

-
- Zhan G, Fenik P, Pratico D, Veasey SC. Inducible nitric oxide synthase in long-term intermittent hypoxia: hypersomnolence and brain injury. *Am J Respir Crit Care Med.* 2005a 15; 171(12): 1414-1420.
- Zhan G, Serrano F, Fenik P, Hsu R, Kong L, Pratico D, Klann E, Veasey SC. NADPH oxidase mediates hypersomnolence and brain oxidative injury in a murine model of sleep apnea. *Am J Respir Crit Care Med.* 2005b 1; 172(7): 921-929.
- Zhang W, Potrovita I, Tarabin V, Herrmann O, Beer V, Weih F, Schneider A, Schwaninger M. Neuronal activation of NF-kappaB contributes to cell death in cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2005; 25(1): 30-40.