

Tesis Doctoral

El papel de la interacción entre neuronas y glía mediada por S100B/RAGE en la propagación del daño luego de la isquemia cerebral

Villarreal, Alejandro

2014-06-18

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:

Villarreal, Alejandro. (2014-06-18). El papel de la interacción entre neuronas y glía mediada por S100B/RAGE en la propagación del daño luego de la isquemia cerebral. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Villarreal, Alejandro. "El papel de la interacción entre neuronas y glía mediada por S100B/RAGE en la propagación del daño luego de la isquemia cerebral". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2014-06-18.

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

El papel de la interacción entre neuronas y glía mediada por S100B/RAGE en la propagación del daño luego de la isquemia cerebral

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

Lic. Alejandro Villarreal

Director de tesis: Dr. Alberto Javier Ramos

Consejero de Estudios: Prof. Dr. Dante Agustín Paz

Lugar de trabajo: Instituto de Biología Celular y Neurociencias Prof. E. De Robertis, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires.

Buenos Aires, 2014

Fecha de defensa: 18/06/2014

Titulo

El papel de la interacción entre neuronas y glía mediada por S100B/RAGE en la propagación del daño luego de la isquemia cerebral

Resumen

La isquemia cerebral es un grave problema para la Salud Pública en países emergentes como la Argentina. Aún no se conocen completamente los mecanismos celulares y moleculares que participan de la propagación del daño desde la zona del infarto isquémico (core) hacia las zonas cercanas del cerebro que se definen como área de la penumbra isquémica. Esta expansión del daño hacia zonas distales a la lesión isquémica original es lo que define el mal pronóstico de los pacientes.

Las moléculas asociadas al daño o DAMP (del inglés *Damage Associated Molecular Pattern*) como la proteína astrogliol S100B aumentan en el espacio extracelular luego de la isquemia y son capaces de activar la respuesta inmune innata mediada por los receptores de patrones moleculares (PRR, del inglés *Pattern Recognition Receptor*). Considerando que S100B ha demostrado tener acciones sobre astrocitos y neuronas en cultivo, nuestra hipótesis de trabajo propuso que la liberación local de S100B desde el core isquémico activaría el PRR RAGE, facilitando la respuesta inflamatoria, y extendería así el daño hacia el tejido cerebral circundante.

Utilizando un modelo de isquemia cerebral en animales de experimentación, administraciones intra-corticales de S100B purificada, cultivos puros neuronales y cultivos enriquecidos en astrocitos pudimos establecer que: i) S100B induce la sobrevida o muerte neuronal en neuronas expuestas a excitotoxicidad por glutamato en una forma dependiente de la dosis, de la expresión de RAGE y de la activación del factor de transcripción NF- κ B; ii) S100B facilita la conversión de los astrocitos hacia el fenotipo reactivo proinflamatorio en forma RAGE/NF- κ B dependiente; iii) S100B liberada desde un foco en el parénquima cerebral induce cambios en astrocitos similares a los observados días después de la lesión isquémica.

En función de nuestros resultados proponemos que en las zonas vecinas al core isquémico S100B tendría efectos neurodegenerativos directos o en forma secundaria promoviendo la conversión astrogliol hacia un fenotipo proinflamatorio activando la ruta RAGE/NF- κ B. Esta cascada intracelular emerge como un tentador blanco molecular para futuras estrategias terapéuticas.

Palabras claves: isquemia, astrocitos, glutamato, S100B, RAGE, NF κ B

Title

Role of S100B/RAGE mediated neuro-gliial crosstalk in damage propagation after brain ischemia.

Abstract

Brain ischemia represents a serious problem for Public Health in developing countries such as Argentina. The molecular and cellular mechanisms that participate in damage propagation from the ischemic infarct region (core) towards neighbor regions of the brain (defined as ischemic penumbra) are not fully understood. The penumbra damage determines the bad prognosis for patient outcome.

Damage associated molecular patterns (DAMPs) like astroglial protein S100B are increased in the extracellular space after ischemia and are capable of activating innate immune response by engaging pattern recognition receptors (PPR). Considering that S100B has shown to have effects on astrocytes and neurons *in vitro*, our work hypothesis proposed that local release of S100B from the ischemic core could activate the PRR receptor named RAGE, facilitating inflammatory response and expanding damage to the limiting regions of brain tissue.

Using an experimental model of brain ischemia in laboratory animals, intra-cortical infusions of purified S100B and neuronal or astroglial cultures we have been able to establish that: i) S100B promotes death or survival in neurons exposed to glutamate induced excitotoxicity in a dose dependent manner and requiring, RAGE expression and activation of transcription factor NF- κ B ii) S100B facilitates astrocyte conversion towards a reactive and proinflammatory phenotype in a RAGE/NF- κ B dependent manner; iii) S100B released from a focal spot in brain parenchyma induces changes on astrocytes that are similar to those observed in ischemic injury *in vivo*.

Based on our results we propose that S100B might have neurodegenerative effects directly on neurons or indirectly by promoting the astroglial conversion towards a pro-inflammatory phenotype after engaging the RAGE/NF- κ B pathway. This intracellular pathway emerges as a tempting molecular target for future therapeutic strategies.

Key words: ischemia, astrocytes, glutamate, S100B, RAGE, NF κ B

Abreviaturas

ADN	Acido desoxirribonucleico
Akt	Proteína kinasa B (PKB)
ARNm	Acido ribonucleico mensajero
ATP	Adenosina tri-fosfato
BrdU	Bromodeoxiuridina
DAMP	Patron molecular asociado al daño (del inglés <i>Damage Associated Molecular Pattern</i>)
DC	Devascularizacion cortical
DPL	Días post-lesión
Erk _{1/2}	Kinasas 1 y 2 reguladas por señales extracelulares (del inglés <i>Extracellular signal regulated kinases 1 and 2</i>)
GAPDH	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
GFAP	Proteína gliofibrilar acida (del inglés <i>Gliofibrilar Acidic Protein</i>)
HIF-1 α	Factor inducible por hipoxia 1 alfa (del inglés <i>Hypoxia Induced Factor 1 alpha</i>)
HMGB1	O anfoterina (del inglés <i>High mobility group box 1</i>)
IKK	Kinasas del Inhibidor kappaB
IL-1 β	Interleuquina 1 β
I κ B	Inhibidor kappaB
NF κ B	Factor Nuclear kappaB (del inglés <i>Nuclear Factor kappaB</i>)
NMDA	N-metil-D-aspartato
nNOS	Óxido nítrico sintasa neuronal
NO	Óxido nítrico
p65-NLS	Dominio de localización nuclear de la subunidad p65 de NF κ B
p75NTR	Receptor de neurotrofinas p75 (del inglés <i>neurotrophin receptor p75</i>)
p-Akt	Proteína kinasa B (PKB) fosforilada en serina 473
PBS	Buffer fosfato salino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (del inglés <i>polimerase chain reaction</i>)
P-Erk _{1/2}	Estado fosforilado de las kinasas Erk _{1/2}
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo (del inglés <i>phenylmethylsulfonyl fluoride</i>)
P-p65	Subunidad p65 fosforilada
PRR	Receptor de patrones moleculares (del inglés <i>pattern recognition receptor</i>)
RAGE	Receptor de productos avanzados de glicosilación (del inglés <i>receptor for advanced glycated end products</i>)
RAGE-FL	Receptor de productos avanzados de glicosilación versión nativa o "full

	<i>length</i> "
RAGE- Δ cyt	Versión truncada del receptor para productos avanzados de glicosilación. Dicha proteína recombinante carece del dominio de señalización intracelular, aunque conserva los dominios de unión a ligando y de anclaje a membrana
SP1	Proteína Especifica 1 (del inglés <i>specific protein 1</i>)
TLR2	Receptor de tipo toll 2 (del inglés <i>toll like receptor 2</i>)

Agradecimientos

Al Dr. Alberto Javier Ramos con quien trabajamos por más de ocho años, incluso antes de que su laboratorio tenga nombre. Él me dio la oportunidad de participar en distintos proyectos, con distintas personas y me enseñó a entender todos esos resultados como parte de un mismo proceso biológico. Dicho de otra manera, me enseñó a hacer un paso atrás y “mirar la *big picture*”. Todo esto contribuyó a mi formación y a lograr gran independencia de trabajo.

A mis compañeros del laboratorio de Neuropatología molecular. A la Dra. **Florencia Angelo**, porque además de colaborar directamente con mis experimentos de mesada ha sido una gran amiga durante todos estos años. Al Lic. **Gerardo Rosciszewski**, porque desde que entró hace dos años estamos trabajando juntos contribuyendo mutuamente en nuestros experimentos. A **Jerónimo Lukin, a la Med. Alicia Rossi y la Dra. Verónica Murta** por su apoyo, amistad y ayuda de todos los días. A **Rocío Seoane, el Dr. Rolando Avilés Reyes y la Lic. Agustina Gonzáles**, que pasaron por el laboratorio y también dejaron su gran cuota de amistad y trabajo. A la Lic. **Vanesa Cadena**, por su lectura de la versión final de esta tesis.

A CONICET, por haberme otorgado las becas de postgrado tipo I y II que permitieron dedicarme en forma exclusiva a mi tesis doctoral en el laboratorio del Dr. Ramos.

A todo el personal del Instituto de Biología Celular y Neurociencias Prof. Eduardo De Robertis porque el instituto fue mejorando día a día desde que entré gracias al esfuerzo de todos. A los bioteristas **Andrea Pecile, Manuel Ponce y Daniela Díaz Avalos** quienes siempre fueron muy amables, profesionales y nos ayudaron con el manejo de animales. Al personal de limpieza, al personal técnico y de secretaria. A los laboratorios del **Dr. Falzone, del Dr. Paratcha, Dra. Ledda, Dr. Medina y Dra. Viola, Dr Sciccolone, Dra. Sánchez, Dr. Carrasco y Dra. Brusco** por sus contribuciones en distintas técnicas o experimentos y consejos. **Al Lic. Luciano Fiore**, por las discusiones de mesada y pasillo.

A la Dra. Analía Reines y a su laboratorio, por todos sus consejos y por haberme enseñado a realizar cultivos primarios de neuronas corticales. **Al Bioq. Martin Codagnone** por las discusiones de mesada y charlas de pasillo.

A las organizaciones IBRO (*International Brain Research Organization*) e ISN (*International Society for Neurochemistry*) por financiar estadías en el exterior que me permitieron realizar tareas de investigación, participar en cursos y congresos internacionales

y conocer becarios e investigadores con gran trayectoria en el estudio de las células de la glía. Todo esto contribuyó en gran medida con mi formación científica.

Al Dr. Mariano Viapiano, a su laboratorio y al a Universidad de Columbus, Ohio (USA) por permitirme realizar una estadía corta de investigación en su laboratorio. Allí reforcé mis habilidades para trabajar con cultivos celulares y aprendí técnicas de PCR en tiempo real y de migración celular. El intenso mes de trabajo en su laboratorio también contribuyó significativamente con mi formación.

A la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, por haberme permitido realizar el doctorado en su dependencia. **Al Dr. Dante Paz** por ser mi consejero de tesis y a todo su laboratorio por los trámites en exactas. **A el personal encargado de las secretarías de departamento Claudio Lutterbeck, Ana Andrea Bondía y Luis Vazquez** por facilitar todo el trabajo administrativo en relación a cursos, tesis, etc., **A todo el personal docente** con quien realicé cursos de formación y capacitación.

A los médicos Luis Olivares y Marina Villarreal y a la Universidad Nacional de La Pampa, por haberme invitado repetidas veces a participar de las jornadas científicas llevadas a cabo en Santa Rosa.

A mi familia entera que es gigante. Siempre están interesados en mi trabajo y siempre me tienen en su abrazo.

A mis amigos por el apoyo de siempre (*el numero de amigos en esta lista tiende a infinito y fue omitida*). **Al Lic. Eduardo Valli**, por las largas discusiones sobre ciencia y experimentos. **Al Lic. Martin Dodes**, quien me enseñó y ayudó a utilizar el microscopio confocal con el cual se obtuvieron muchas de las imágenes presentadas en esta tesis. **A Pepe Dominicci** por toda la música.

A Dani porque es única, es mi compañera y camina conmigo.

Dedicatoria

A mis padres Estela y Diego
A mis hermanos Marce y Davito

Los resultados de este trabajo han sido parcialmente publicados en:

- **Villarreal A**, Avilés-Reyes RX, Angelo MF, Reines AG, Ramos AJ. S100B alters neuronal survival and dendrite extension via RAGE-mediated NF- κ B signaling. *J Neurochem.* 2011 Apr;117(2):321-32.
- **Villarreal A**, Seoane R, González TA, Rosciszewski G, Angelo MF, Rossi A, Barker P A, Ramos AJ. S100B protein activates a RAGE-dependent autocrine loop in astrocytes: Implications for its role in the propagation of reactive gliosis, (*J Neurochem.* 2014 Jun 12. doi: 10.1111/jnc.12790. [Epub ahead of print]).

Índice

1. Introducción	12
1.1 Epidemiología de la isquemia cerebral.....	13
1.2 Consecuencias de la isquemia a nivel celular y molecular.....	14
Efectos agudos.....	14
Excitotoxicidad por glutamato y pérdida neuronal.....	15
Astrocitos como reguladores de la homeostasis neuronal.....	16
Respuesta astrocitaria a la isquemia cerebral.....	18
1.3 Nuevos blancos moleculares para el diseño de estrategias neuroprotectoras.....	20
Barrera hematoencefálica y concepto de unidad neurovascular.....	20
Astrocitos como activadores de la inflamación	22
DAMPs como moléculas activadoras de la respuesta inmune innata.....	23
1.4 S100B como patrón molecular asociado al daño.....	24
S100B en la isquemia cerebral.....	24
Funciones intra y extracelulares de S100B	24
1.5 RAGE como receptor de patrones moleculares (PRR)	26
Funciones como receptor de membrana.....	26
RAGE en la isquemia cerebral.....	27
1.6 El factor de transcripción NF κ B como mediador de la respuesta celular.....	28
NF κ B en el sistema nerviosos central.....	28
NF κ B en la isquemia cerebral	30
Evidencia previa sobre interacción activación de NF κ B mediada por la interacción S100B/RAGE.....	30
2. Hipótesis y objetivos	32
3. Materiales y Métodos	34
3.1 Experimentos <i>in vivo</i>	35
Animales.....	35
Modelo de isquemia cerebral por Devascularización Cortical.....	35
Infusión intracortical de S100B.....	36
Fijación de animales por perfusión intracardiaca.....	37
Obtención y selección de cortes histológicos para inmunohistoquímica e inmunofluorescencia.....	37
Inmunohistoquímica de cortes en flotación.....	37
Inmunofluorescencia de cortes en flotación.....	38
Tinción de neuronas en degeneración con Fluor Jade B.....	39

Recuperación antigénica.....	39
Histoquímica para evaluar actividad de β -galactosidasa en cortes en flotación..	40
Inmunoblot de homogenatos de corteza.....	40
3.3 Experimentos <i>in vitro</i>	41
Cultivos primarios de neuronas corticales.....	41
Cultivos primarios de astrocitos corticales depletados de microglía.....	41
Exposición de astrocitos a peróxido de hidrogeno como modelo de stress oxidativo.....	42
Modelo injuria artificial <i>in vitro</i> o <i>Scratch Assay</i>	42
Fijación de cultivos celulares.....	42
Inmunofluorescencia de cultivos.....	43
Ensayo de proliferación por incorporación de BrdU.....	43
Inmunoblot de cultivos celulares.....	43
Extracción de RNA mensajero total a partir de cultivos celulares.....	44
Síntesis de cDNA a partir del RNAmensajero total y PCR.....	44
Electroforesis en geles de agarosa para visualización del producto de RT-PCR....	45
Generación de plásmidos bisstronicos RAGE/GFP y RAGE Δ cyt/GFP.....	45
Amplificación de plásmidos mediante transformación bacteriana.....	46
Transfección de cultivo primario.....	46
Análisis estadísticos.....	46
4. Resultados	48
4.1 Experimentos <i>in vivo</i> : Modelo de isquemia por devascularización cortical.....	49
Expresión de RAGE en el tejido isquémico.....	49
Activación de NF κ B en el tejido isquémico.....	54
4.2 Efectos de S100B sobre neuronas corticales expuestas estrés por excitotoxicidad.....	58
S100B promueve la muerte, sobrevivencia y extensión de neuritas en forma dependiente de RAGE.....	58
S100B promueve la activación de NF κ B en forma RAGE dependiente.....	61
4.3 Efectos de la exposición de S100B en astrocitos corticales.....	65
Expresión de RAGE y caracterización de cultivos primarios de astrocitos.....	65
S100B induce cambios en astrocitos hacia un fenotipo reactivo en forma dependiente de RAGE.....	67
S100B promueve la activación de NF κ B en forma dependiente de RAGE y dirige el fenotipo astrogliar hacia un perfil proinflamatorio.....	72

S100B promueve la sobrevida de astrocitos frente al estrés oxidativo.....	74
S100B facilita la repuesta astrogial <i>in vivo</i>	77
5. Discusión y conclusiones	80
5.1 La participación de S100B/RAGE en la respuesta celular y molecular a la isquemia.....	81
RAGE se expresa en neuronas y astrocitos en la zona afectada por la isquemia experimental	81
NFκB resulta activado en el tejido afectado por la isquemia.....	83
Posibles mecanismos moleculares de inducción de la expresión de RAGE en tejido isquémico	84
5.2 La excitotoxicidad aumenta la los efectos de S100B sobre neuronas.....	85
S100B modula la sobrevida neuronal en forma dependiente de RAGE.....	85
S100B activa a NFκB en forma dependiente de RAGE.....	86
5.3 Efectos autócrinos de S100B sobre astrocitos.....	87
S100B induce cambios en astrocitos hacia un fenotipo reactivo <i>in vitro</i> en forma dependiente de RAGE	87
S100B activa a NFκB en forma dependiente de RAGE.....	88
S100B promueve un perfil proinflamatorio en astrocitos.....	89
S100B promueve la sobrevida de astrocitos frente al estrés oxidativo.....	90
S100B promueve la gliosis reactiva <i>in vivo</i>	91
5.5 Conclusiones finales y proyección.....	92
La ruta de señalización S100B/RAGE/NFκB en la isquemia cerebral.....	92
Señalización por moléculas del tipo DAMP como posible blanco molecular de estrategias terapéuticas	95
6. Bibliografía	97
7. Apéndice	120
7.1 Materiales.....	121
Materiales para cultivo celular.....	121
Materiales para inmunohistoquímica e inmunofluorescencia.....	121
Materiales inmunoblots.....	121
Reactivos específicos.....	121
7.2 Anticuerpos.....	122
7.3 Reactivos para RT PCR.....	123
7.4 Primers para PCR.....	123

Introducción

1.1 Epidemiología de la isquemia cerebral

El concepto de isquemia hace referencia a la interrupción del flujo sanguíneo en algún tejido pudiendo conducir al infarto. Particularmente el cerebro es uno de los órganos más afectados cuando ocurre una disminución o interrupción del flujo sanguíneo debido a sus altos requerimientos energéticos. Las víctimas del infarto cerebral pueden, rápidamente, experimentar síntomas de parálisis y de problemas en el habla debidos a la isquemia. La mayoría de los episodios isquémicos son causados por trombosis o embolia, y alrededor del 15% de los infartos cerebrales son causados por hemorragias o arresto cardíaco. A pesar de que los problemas neurológicos ocurren segundos a minutos luego de la oclusión vascular, la evolución de la injuria isquémica y muerte celular continúa por horas y hasta días dependiendo de la vulnerabilidad de la región afectada, sus componentes celulares y de la perfusión sanguínea residual (Moskowitz y col., 2010).

Actualmente el único tratamiento disponible para pacientes que sufrieron un episodio isquémico consiste en la administración del activador del plasminógeno tisular recombinante (tPA). Esta estrategia sólo es eficaz cuando se suministra dentro de una ventana temporal de 3 h desde que ocurre el episodio isquémico y solamente si no existe riesgo de hemorragia. Cabe destacar que, del total de pacientes que reciben atención médica, solo un reducido porcentaje acude a un servicio hospitalario especializado dentro de esa ventana temporal. Dentro de este pequeño grupo, solo algunos se encuentran aptos para recibir el tratamiento por lo que las estadísticas muestran que solo uno de cada 100 pacientes recibe el tratamiento (Katzan y col., 2004; Pandian y col., 2007). En situaciones de daño cerebral por arresto cardíaco o por hipoxia perinatal, es posible utilizar la hipotermia como estrategia protectora. Nuevamente, este tratamiento debe ser administrado inmediatamente luego de ocurrido el evento patológico. Respecto de la isquemia cerebral, se propone que la hipotermia en conjunto con la administración de tPA mejorarían aun más la sobrevivencia de pacientes afectados (Lyden y col., 2006; Hemmen y col., 2007; Yenari y col., 2010; Hemmen y col., 2010, Froehler y col., 2010).

En 2007, un estudio mostró que el 87% de las muertes a nivel mundial por infarto cerebral ocurren en países en vías de desarrollo (Strong y col., 2007). Particularmente, en Argentina existe un déficit en la atención, internación y cuidado a largo término de pacientes que sufrieron un infarto cerebral (Sposato y col., 2008). Es importante destacar que entre el 4 y el 17 % de los pacientes internados sufren un agravamiento en su cuadro luego de ser hospitalizados (Kelley y col., 1986; Cumber y col 2013). Esto puede deberse, como se detallará más adelante, a un déficit en el conocimiento actual acerca de cómo un daño causado por el evento isquémico inicial puede propagarse amplificando la muerte celular. En este trabajo de tesis nos propusimos estudiar el papel de S100B, una proteína de origen

astroglial cuyos niveles aumentan significativamente luego del infarto cerebral, en la expansión del daño isquémico. Para ello estudiamos los efectos de S100B sobre neuronas y astrocitos y las vías de señalización intracelular que resultan activadas.

1.2 Consecuencias de la isquemia a nivel celular y molecular

Efectos agudos

El cerebro consume un 20% del oxígeno y utiliza un 25% de la glucosa en sangre siendo uno de los órganos más sensibles a la isquemia. Debido a su alta excitabilidad las neuronas requieren de un alto suministro metabólico para sobrevivir tanto en condiciones de reposo como luego de ser activadas, momento en el cual llevan a cabo ciclos de despolarización y repolarización en ventanas temporales de milisegundos. Estos procesos dependen de un balance iónico generado por la enzima Na^+/K^+ ATPasa y vuelven a las neuronas extremadamente susceptibles a la disminución de los niveles de glucosa y oxígeno (Hutchins y col., 1998; Hofmeijer y col., 2012). El nivel de reducción del flujo sanguíneo influye directamente en la sobrevida neuronal, determinando así la severidad y magnitud de la injuria isquémica.

La lesión isquémica se origina a partir del punto donde la reducción del flujo sanguíneo es máxima. Esta región recibe el nombre de zona de infarto o núcleo (del inglés *core*) isquémico y allí se observa el mayor daño causado por necrosis de todos los tipos celulares. Este daño que ocurre inmediatamente luego de la interrupción del flujo sanguíneo es considerado irreversible. A partir del core isquémico el daño se expande en forma radial hacia regiones más distales amplificando el daño original. La región afectada en forma secundaria recibe el nombre de penumbra isquémica y rodea al core (Figura 1.1). En la penumbra las neuronas son el tipo celular más comprometido y sufren muerte por apoptosis y, si bien esta región se mantiene metabólicamente activa, no hay actividad eléctrica. También se observa una activación de los astrocitos y microglíocitos en respuesta a la isquemia. Operativamente se puede definir a la penumbra como un tejido isquémico, metabólicamente inestable y con riesgo a sufrir infarto aunque con posibilidad de ser rescatado. De no lograrse un rescate, este tejido será progresivamente reclutado por el core isquémico, el cual se verá expandido desde su tamaño original (Figura 1.1). Por último, el tejido viable que rodea externamente a la penumbra es el menos comprometido aunque recibe señales provenientes desde las regiones más afectadas (Hutchins y col., 1998; Mehta y col., 2008; Del Zoppo y col., 2011).

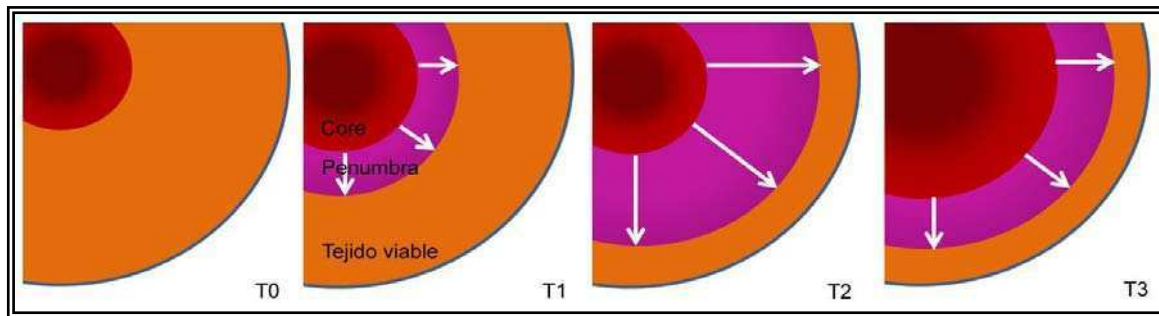


Figura 1.1: propagación del daño isquémico. El esquema ejemplifica la progresión temporal (T0-T3) del daño causado por un evento isquémico y el avance de las regiones afectadas por sobre el tejido viable.

El concepto de penumbra surgió a partir de estudios de imágenes en pacientes que sufrieron infarto cerebral y animales de experimentación sometidos a modelos de isquemia cerebral. Actualmente el diagnóstico por imágenes de pacientes con síntomas compatibles con un posible infarto cerebral es una herramienta clave para el manejo de su atención terapéutica (Astrup y col., 1979 y 1981; Del Zoppo y col., 2011; Zhang SJ. y col., 2013; Tong y col., 2014).

Existen distintos modelos de infarto cerebral que reproducen este tipo de lesión isquémica en animales, con importantes consecuencias en cuanto al comportamiento y la memoria. Recientemente se ha demostrado que la sola oclusión de un único capilar puede generar microinfartos con un consecuente déficit cognitivo (Shih y col., 2012).

Excitotoxicidad por glutamato y pérdida neuronal

La interrupción del flujo sanguíneo genera un desbalance metabólico celular que lleva a una reducción extrema de los niveles de ATP. Particularmente en las neuronas, la falta de energía trae como consecuencia una desregulación del gradiente iónico y una consecuente despolarización excesiva, lo que lleva a una liberación masiva de neurotransmisores. El glutamato es el neurotransmisor excitatorio más abundante y en condiciones normales, es liberado al espacio sináptico activando receptores específicos en la post-sinapsis. Particularmente la activación de receptores del tipo del tipo NMDA (del inglés *N-methyl-D-aspartate*) provoca la entrada de Ca^{2+} en la neurona postsináptica evocando distintas respuestas celulares. A partir de los estudios originales de Olney y colaboradores (1970) se ha propuesto que en situaciones patológicas como la isquemia, los elevados niveles de glutamato son responsables de la muerte neuronal por el fenómeno conocido como *“Excitotoxicidad por glutamato* (Drejer y col., 1985; Hutchins y col., 1998; Dawson y col., 2000; Lai y col., 2013).

En condiciones normales, los niveles de glutamato en el espacio extracelular son finamente regulados por los astrocitos, quienes tienen la capacidad de recaptarlo y transformarlo en glutamina. En situaciones de isquemia los niveles de glutamato superan la

capacidad de recaptación y sobreactivan receptores del tipo NMDA. Esto conduce a una entrada exacerbada de Ca^{2+} que lleva a una disfunción mitocondrial y consecuente muerte neuronal (Choi y col., 1985; Hutchins y col., 1998; Szydłowska y col., 2010; Hofmeijer y col., 2012). Si bien los mecanismos por los cuales el Ca^{2+} genera daños celulares aún no han sido dilucidados por completo, existen evidencias de que el aumento suprafisiológico de los niveles de Ca^{2+} , se correlaciona con un aumento en la producción de NO (Oxido Nítrico) por la nNOS (Oxido Nítrico Sintasa Neuronal). El NO al interactuar con el radical libre O_2^- (superóxido) forma el compuesto peroxinitrito, el cual es un potente oxidante capaz de causar nitrosilación y oxidación de proteínas, peroxidación lipídica y daño directo al ADN, causando así la muerte celular por estrés oxidativo. El NO también puede ser neurotóxico interactuando con la proteína GAPDH (gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa), una enzima clave en el proceso de glicólisis. Por otro lado se ha mostrado que el exceso de Ca^{2+} en estas condiciones induce una captación mitocondrial del ion, lo que produce un aumento de la especies reactivas del oxígeno y finalmente determina la disfunción mitocondrial (White y col., 1995; Lau y col., 2010; Kostandy., 2012).

La utilización de inhibidores de la apoptosis neuronal, antioxidantes o inhibidores de las vías glutamatérgicas como única estrategia terapéutica resultó no ser eficiente en la prevención de la muerte neuronal en las pruebas clínicas (Mehta y col., 2008). Dichas estrategias habían sido diseñadas específicamente a modo de bloquear ciertas cascadas intracelulares de señalización que conducen a la muerte neuronal por apoptosis. Como detallaremos más adelante, actualmente se conoce que el microambiente generado por otros tipos celulares como los astrocitos y la microglía, que también son afectados por la isquemia, es un punto a tener en cuenta en el diseño de estrategias neuroprotectoras. La difusión de moléculas tipo DAMP desde las zonas necróticas parece tener un rol fundamental en la activación de las células gliales y la inducción de un ambiente proinflamatorio que produce, en forma secundaria, una expansión de la muerte neuronal. Es parte de nuestra hipótesis considerar que S100B cumple un papel importante en dicho proceso.

Astrocitos como reguladores de la homeostasis neuronal

Los astrocitos son las células de la glía más abundantes y heterogéneas tanto en su morfología como en la expresión de marcadores moleculares, lo que dificulta agruparlas bajo una misma definición. Se llama astrocitos a todas las células macrogliales, no mielinizantes del SNC. Esta definición incluye tanto a los astrocitos fibrosos (en la sustancia blanca) y protoplasmáticos (en la sustancia gris) como a las células de Müller en la retina, a los tanicitos en el hipotálamo, a los pituicitos en la neurohipófisis, a los endoteliales, células del plexo coroideo y células del epitelio pigmentario de la retina. Todos estos tipos

celulares son muy diferentes entre sí, pero comparten una función principal: mantener la homeostasis del SNC (Zhang L. y col., 2010; Verkhratsky y col., 2012; Oberheim y col., 2012).

Se ha mostrado que los astrocitos participan en la regulación de los niveles extracelulares de iones, neurotransmisores y neurohormonas, la acumulación y liberación de sustratos metabólicos como el lactato para consumo neuronal. Dirigen la migración de células neurales durante el desarrollo y participan de la formación de conexiones sinápticas, dándole forma a la micro-arquitectura de la sustancia gris. Controlan la formación y mantenimiento de la barrera hematoencefálica y están directamente involucrados en la neurogénesis en adultos (Verkhratsky y col., 2012; Oberheim y col., 2012). Se ha demostrado también que los astrocitos son capaces de modular procesos sinápticos en forma directa mediante la liberación de moléculas que reciben el nombre de gliotransmisores como D-Serina, ATP, Adenosina, GABA, etc. En forma recíproca, los astrocitos pueden responder a neurotransmisores mediante cambios en sus niveles intracelulares de calcio. De aquí, surge el concepto de *sinapsis tripartita* (Figura 1.2). Cabe destacar que la habilidad de los astrocitos de integrar y procesar la información sináptica de diferentes terminales aporta complejidad y grados de libertad en la comunicación intracelular del cerebro, incrementando así el poder de procesamiento informático del SNC (Fields y col., 2002; Perea y col., 2009).

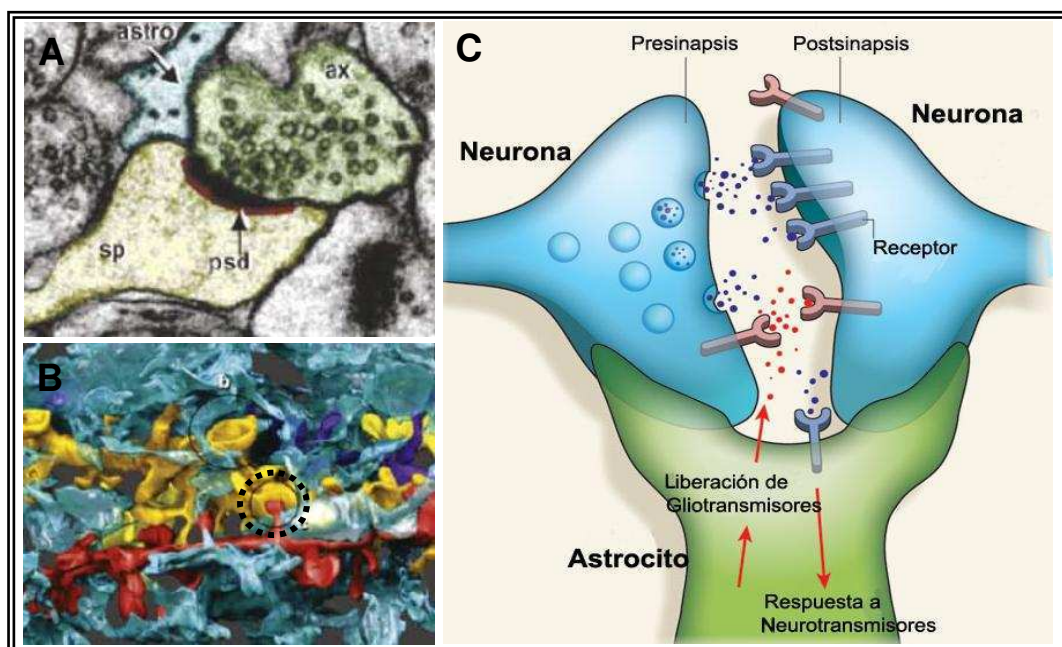


Figura 1.2: Sinapsis Tripartita. La imagen A muestra una fotomicrografía obtenida mediante microscopía electrónica. Se coloreó en azul la proyección astroglial que envuelve la sinapsis (verde-presinapsis y amarillo-postsinapsis). La imagen B es una representación tridimensional que muestra la forma en la que un astrocito (azul) envuelve conexiones sinápticas (ver círculo de líneas discontinuas) entre dos neuronas (rojo y amarillo). (Modificados de Perea y col., 2009). El esquema C representa un evento sináptico del cual participaría también un astrocito mediante la liberación de gliotransmisores. (Modificado de Allen y col., 2009).

En esta tesis prestaremos principal atención a los astrocitos protoplasmáticos de la corteza cerebral debido a que esta es la zona más afectada por el modelo de lesión isquémica utilizado. Los astrocitos protoplasmáticos presentan una morfología estrellada con proyecciones que abarcan dominios tridimensionales. Cada uno de estos dominios puede tener contacto con aproximadamente 140.000 sinapsis, por lo tanto, un solo astrocito puede contactar un gran número de sinapsis al mismo tiempo que contacta la pared de capilares sanguíneos mediante sus pies chupadores. Este tipo de arquitectura pone al astrocito en un lugar privilegiado para coordinar y regular la actividad sináptica y el flujo sanguíneo (Oberheim y col., 2012).

Los astrocitos también presentan gran heterogeneidad en cuanto al conjunto de genes que expresan. Estudios de expresión a nivel genómico identificaron genes que se expresan en forma diferencial en los distintos grupos de astrocitos. Entre los genes expresados por los astrocitos podemos encontrar: glicoproteínas de membrana, neuropéptidos, canales de sodio y de potasio, receptores metabotrópicos de glutamato, ionotrópicos de tipo NMDA, receptores de dopamina, de opioides, de oxitocina, de erbB y de adenosina, transportadores de glutamato y de glicina, óxido nítrico sintasa, monoamina oxidasa y GABA transaminasa. La expresión de estos genes le permite a los astrocitos sensor el microambiente en el cual se encuentra un astrocito y dan como resultado una notable capacidad de respuesta frente a una injuria (Zhang Y. y col., 2010; Sofroniew y col., 2010; Oberheim y col., 2012; Verkhratsky y col., 2012).

Respuesta astrocitaria a la isquemia cerebral

Los astrocitos responden en forma genérica a las injurias al SNC mediante un fenómeno conocido como astrogliosis o gliosis reactiva. Este fenómeno se evidencia a nivel morfológico por un aumento en el tamaño celular (hipertrofia) y en la complejidad de las proyecciones, acompañado de cambios en el transcriptoma astrogliar y un aumento en la tasa de división celular. En estas condiciones se observa, como consecuencia de la hipertrofia celular, una superposición de los dominios tridimensionales ocupados por astrocitos adyacentes (Wilhelmsson y col., 2006).

La astrogliosis es un proceso que ocurre en forma continua y progresiva en el tiempo, en el cual los astrocitos pueden alcanzar distintos estadios o niveles de activación. Dependiendo de la severidad del daño, los astrocitos pueden sufrir modificaciones morfológicas que van desde hipertrofia moderada (evidenciada por un incremento del tamaño celular, aumento del número de prolongaciones y una sobre-expresión de la proteína GFAP) hasta la formación de una cicatriz glial en condiciones más severas donde los astrocitos comienzan a filamentarse perdiendo por completo su morfología original y cubriendo así los bordes de la lesión (Figura 1.3).

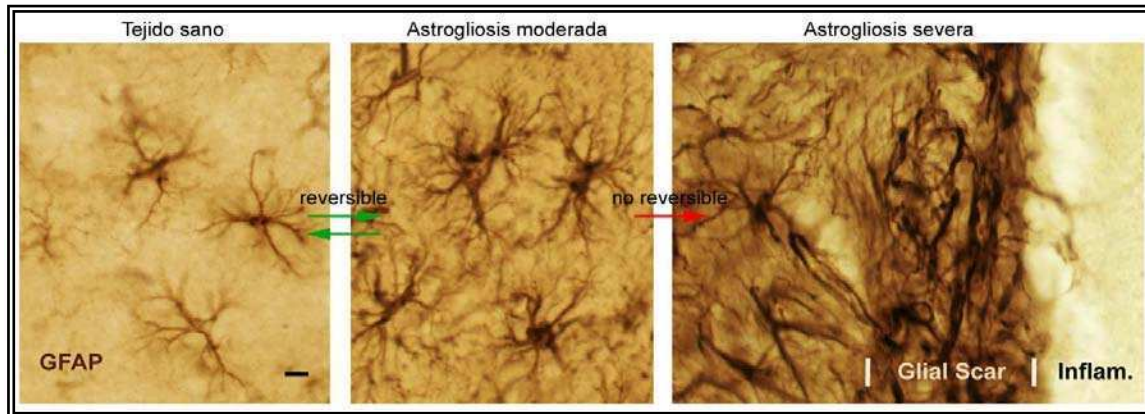


Figura 1.3: Cambios morfológicos de la gliosis reactiva. Las imágenes muestran distintos estadios alcanzados por astrocitos reactivos hasta la formación de la cicatriz glial (Glial scar). (Modificado de Sofroniew y col., 2009).

En simultáneo con la formación de la cicatriz glial, se observa una hiperplasia celular donde los astrocitos más afectados por la lesión comienzan a proliferar. Sin embargo, el aumento en el número total de astrocitos en la región afectada se debe también al reclutamiento de astrocitos desde las regiones menos afectadas mediante la activación de mecanismos de migración celular y al reclutamiento y diferenciación de células madre precursoras gliales (Sofroniew y col., 2009, 2010; Wanner y col., 2013). Comúnmente se utiliza el término astrogliosis reactiva cuando la respuesta astrocitaria cumple con los requisitos morfológicos anteriormente mencionados, sin embargo se ha demostrado que a nivel molecular la gliosis reactiva puede ser muy diferente según el origen del estímulo que la desencadene. Recientemente, un estudio llevado a cabo por Zamanian y colaboradores (2012), mostró que al menos el 50% de los genes activados en la gliosis reactiva son específicos al tipo de injuria.

El papel de la gliosis reactiva en la evolución del daño cerebral es aún motivo de fuerte debate en el área y parece tener un rol dual en cuanto a su participación en el destino neuronal. Algunos trabajos mostraron que los astrocitos proveen a las neuronas de soporte metabólico esencial durante una isquemia transitoria y que la falla en el funcionamiento normal de los astrocitos estaría contribuyendo al daño neuronal (Rossi y col., 2007). También se ha mostrado que la activación de astrocitos mediante estímulos determinados, puede conferirles propiedades protectoras, reparadoras y neuroregenerativas (Liberto y col., 2004; Li y col., 2008). En contraposición, se ha mostrado también que los astrocitos reactivos son capaces de promover muerte neuronal. Estos efectos se han adjudicado al observar que astrocitos reactivos aumentan la expresión de la enzima óxido nítrico sintasa, lo que conduce a una sobreproducción y liberación de óxido nítrico, con un consecuente aumento de la tasa de muerte neuronal (Hu y col., 1996 y 1997). Además, experimentos con animales *knock out* para los filamentos intermedios vimentina y GFAP, que no presentan

astrogliosis, logran una mejor regeneración axonal en lesiones de médula espinal (Privat y col., 2003).

Los astrocitos reactivos también pueden ser promotores de la respuesta inflamatoria luego de su activación. Este proceso involucraría liberación de citoquinas y otras moléculas capaces de activar la respuesta inmune innata con reclutamiento de células de la microglía pero también facilitando el infiltrado de leucocitos en la zona lesionada del SNC. Este punto ha despertado un interés particular al momento de diseñar estrategias protectoras que involucren el control de la inflamación y será comentado en detalle más adelante en esta sección.

En cuanto a la cicatriz glial (considerado el estadio más avanzado de gliosis reactiva), se ha mostrado que sería capaz de reducir el daño al generar una barrera en los márgenes del core isquémico, lo que limitaría la propagación inflamatoria. Sin embargo también se ha mostrado que su formación también impide el crecimiento axonal resultando perjudicial en las reconexiones neuronales luego del infarto cerebral (Sofroniew y col., 2009; Wanner y col., 2013).

Existen distintas moléculas cuyos niveles extracelulares aumentan considerablemente luego de la isquemia y que participan de la activación astrogliosa (Sofroniew y col., 2009). Es uno de nuestros objetivos conocer si la proteína S100B participa en la generación y/o propagación del proceso de astrogliosis.

1.3 Nuevos blancos moleculares para el diseño de estrategias neuroprotectoras

Barrera hematoencefálica y concepto de unidad neurovascular

Además de los efectos directos sobre los distintos tipos celulares mencionados anteriormente, la isquemia también inicia un proceso de inflamación, aumenta la permeabilidad vascular y puede causar hemorragias locales secundarias. Durante muchos años las neuronas fueron el principal sujeto de estudio a modo de comprender las funciones cerebrales. Actualmente se propone que esta visión *neurocéntrica* no es suficiente para comprender la complejidad del SNC en su totalidad. A pesar de los resultados alentadores obtenidos en animales, el intento por prevenir la muerte neuronal interviniendo en forma directa sobre las cascadas de señalización asociadas a la muerte neuronal luego de la isquemia no han logrado resultados clínicos favorables. Actualmente se propone que las estrategias terapéuticas deben estar dirigidas a mantener el correcto funcionamiento de todos los tipos celulares afectados por el daño isquémico (Del Zoppo., 2006; Mehta y col., 2008; Planas y col., 2012).

La barrera hematoencefálica está formada, en primer lugar, por una monocapa de células endoteliales unidas entre sí por uniones estrechas y adherentes que presentan

sistemas de transporte muy selectivos encargados de llevar sustancias desde la luz del capilar hacia el citoplasma. En contacto con la membrana basal de esta monocapa celular se encuentran pericitos y los pies terminales o chupadores de los astrocitos, término que hace referencia a una proyección astrocitaria que envuelve al capilar (Figura 1.4). Actualmente se considera que estos tipos celulares en conjunto con células de la microglía y neuronas, forman la *Unidad Neurovascular* (Del Zoppo, 2006). Este término hace referencia a un nuevo concepto de unidad funcional del SNC y plantea que la falla en cualquiera de sus componentes celulares puede alterar dramáticamente la funcionalidad del conjunto. Esta unidad funcional regula funciones esenciales como acoplamiento neurovascular, la permeabilidad vascular, la inactivación de neurotransmisores, el acoplamiento angiogénico y neurogénico, la regulación del flujo sanguíneo, etc. (Del Zoppo 2006, Rossi y col., 2007, Barres y col., 2008; Zlokovic., 2008). Se ha propuesto que las terapias para pacientes que sufrieron episodios de isquemia cerebral deberían estar dirigidas a la recuperación o restablecimiento funcional de la unidad neurovascular y mejora la estabilidad de los capilares afectados, la cual depende del resto de los tipos celulares anteriormente mencionados (Del Zoppo y col., 2010, 2011).

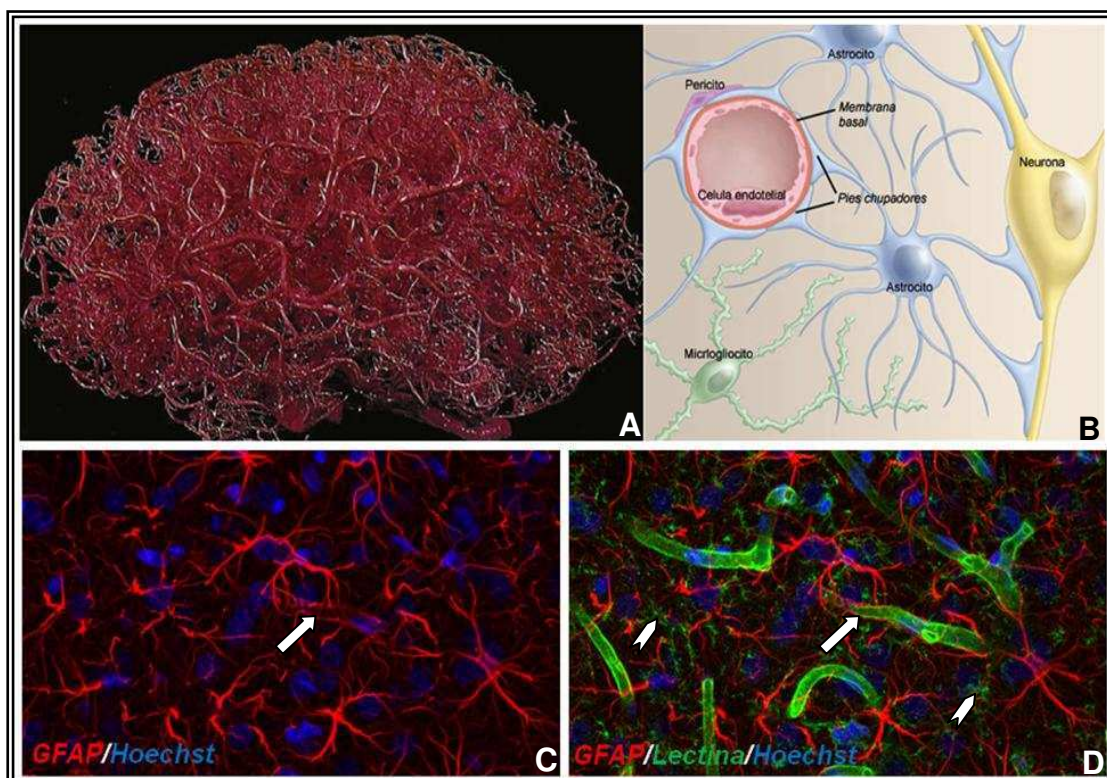


Figura 1.4: Barrera hematoencefálica y Unidad Neurovascular. Se muestra un esquema tridimensional de la irrigación cerebral (A) modificado de Barres y col., 2008 y un esquema detallando los componentes de la UN (B) modificado de Del Zoppo et al., 2006. La imagen de microscopía confocal de nuestra autoría (C) muestra astrocitos GFAP + en la corteza cerebral y la flecha señala un capilar envuelto por pies chupadores. La imagen D muestra el mismo campo y tinción que en C pero se agrega en verde la marca para lectina de tomate que permite la visualización de capilares y microglía (flecha y puntas de flecha respectivamente. En azul se observan los núcleos celulares teñidos con Hoechst.

Astroцитos como activadores de la inflamación

Toda injuria tisular, ya sea aguda o crónica, desencadena una respuesta inflamatoria como resultado de la activación del sistema inmune innato. Se considera que la activación prolongada de la respuesta inflamatoria es una de las principales causas de muerte neuronal en enfermedades neurodegenerativas crónicas, y representa un claro ejemplo de interacción entre el sistema nervioso e inmune (Amor y col., 2013).

Diferentes líneas de investigación han mostrado que la activación del sistema inmune aumenta el riesgo de mortalidad en pacientes que sufrieron infarto cerebral. Este hecho se correlaciona con la posibilidad de que la respuesta inflamatoria desencadenada luego del daño isquémico participe de la propagación del daño en forma secundaria. Si bien la inmunosupresión en animales mostró una mejora en la recuperación al daño isquémico, en humanos las terapias inmunosupresoras no mejoran sino que perjudican el tratamiento en pacientes debido a infecciones secundarias (Zhang y col., 2003; Kleinig y col., 2009; Iadecola y col., 2011; Kamel y col., 2012).

La respuesta inflamatoria mencionada involucra en primer lugar la activación y reclutamiento de la microglía a la zona afectada y, en segundo lugar, el reclutamiento e infiltración de células inflamatorias provenientes de la sangre como macrófagos, linfocitos T, neutrófilos y células dendríticas. Esta respuesta ocurre en forma progresiva y tiempo dependiente (Stevens y col., 2002; Gelderblom y col., 2009; Jin y col., 2010; Chamorro y col., 2012). Como mencionamos anteriormente, la gliosis reactiva alcanza estadios irreversibles y persistentes en el tiempo. Se ha propuesto también que en algún punto de esta conversión los astrocitos son capaces de responder a moléculas proinflamatorias. Más aún, los astrocitos reactivos son capaces de secretar interleuquinas que cumplen un papel fundamental en la activación de las células del sistema inmune y en su reclutamiento al sitio de lesión. De esta manera, los astrocitos reactivos serían capaces de sostener la respuesta inflamatoria por tiempos más prolongados, contribuyendo así a la propagación del daño (Han y col., 2001; Bajetto y col., 2001; Alter y col., 2003; Calderon y col., 2006; Mayo y col., 2012).

Si bien se ha propuesto que la respuesta inflamatoria participaría de la propagación del daño, el rol que cumplen los distintos tipos celulares reclutados es aún sujeto de intenso estudio. Cabe destacar que en el caso particular de la microglía, se ha demostrado que juegan un papel tanto neurotóxico como neuroprotector en la isquemia cerebral (Aloisi y col., 2001; Nakajima y col., 2001; Streit y col., 2002; Neumann y col., 2006).

El control de la respuesta inmune innata y de la respuesta glial emerge como una tentadora estrategia de neuroprotección.

DAMPs como moléculas activadoras de la respuesta inmune innata

Estudios desarrollados esencialmente en el área de inmunología han definido el concepto de DAMP (del inglés *Damage Associated Molecular Pattern*) para hacer referencia a un conjunto de moléculas endógenas, usualmente localizadas intracelularmente, que al ser liberadas al espacio extracelular tienen la capacidad de activar la respuesta inmune innata. Estas moléculas funcionan esencialmente como señales de alarma frente al daño tisular, alertando al sistema inmune innato. El repertorio de moléculas con funciones de DAMP es amplio y dentro del cual se incluyen: ácidos nucleicos, proteínas de shock térmico (HSPs), ATP (adenosina tri-fosfato), HMGB1, S100B, etc.

Estas moléculas cumplen diversas funciones celulares y comparten la característica de ser liberadas en forma pasiva al espacio extracelular por células que sufrieron muerte por necrosis aumentando así sus niveles extracelulares en las regiones del tejido dañado (Figura 1.5). Algunas de estas moléculas se liberan también en forma activa desde células vivas que han sufrido stress celular. Una vez en el espacio extracelular los DAMPs son capaces de interactuar con receptores de superficie conocidos como Receptores de Patrones moleculares o PRR (del inglés *Pattern Recognition Receptor*) y desencadenar la activación de cascadas intracelulares proinflamatorias (Hajime y col., 2008; Bianchi y col., 2008; Hirsiger y col., 2012; Rosin y col., 2011, Amor y col., 2013).

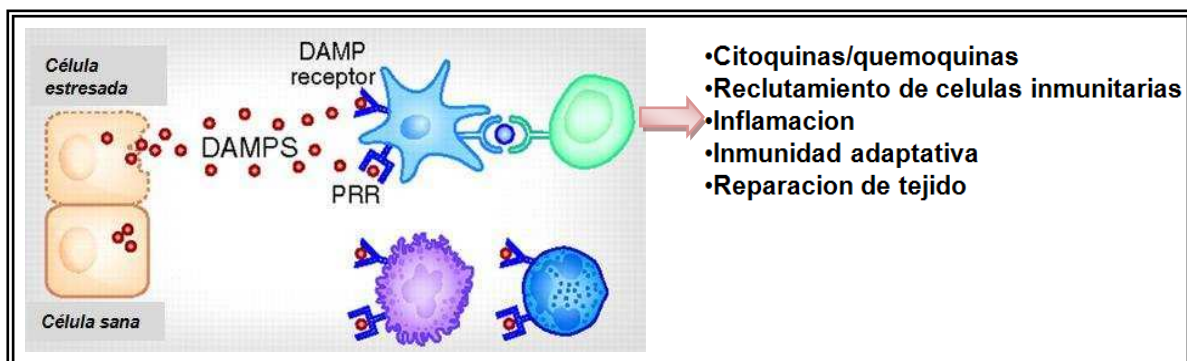


Figura 1.5: Activación de la respuesta inmune innata por secreción de DAMPs. El esquema muestra células que sufrieron necrosis y descargan su contenido al espacio extracelular. Algunas de estas moléculas son ligandos para los receptores de patrones moleculares (PRR) y la unión ligando-receptor activa y recluta células del sistema inmune al tejido lesionado (Modificado de Rosin y col., 2011).

La modulación de la interacción DAMP/PRR o sus cascadas intracelulares representa una de las novedosas estrategias de neuroprotección que se han propuesto en los últimos años

1.4 S100B como Patrón Molecular Asociado al Daño

S100B en la isquemia cerebral

S100B es una proteína soluble de origen astrogial. Pertenece a la familia de proteínas de unión a Ca^{2+} del tipo *EF-Hand*, junto con otras proteínas del tipo S100. Normalmente se encuentra formando homodímeros con un peso de 20 KDa y constituye un 0,5% del contenido proteico citoplasmático de astrocitos. El gen S100B humano se localiza en el cromosoma 21q22.3 y fue clonado por primera vez en 1990 (Alloret y col., 1988 y 1990). En el SNC se expresa en astrocitos, oligodendrocitos en maduración, progenitores neurales y ependimocitos. Cabe destacar que por su abundancia, los astrocitos son la principal fuente de producción de S100B.

Situaciones patológicas como la isquemia, la injuria traumática cerebral, la apnea del sueño, enfermedades neurodegenerativas e incluso desordenes psiquiátricos (por ejemplo en esquizofrenia) han sido asociadas a un aumento de la expresión y secreción de S100B (Rothermundt y col., 2001 y 2003; Hayakata y col., 2004). En el terreno clínico, la concentración sanguínea de S100B en plasma es utilizada como indicador de daño cerebral (Rothoerl y col., 2000). Más específicamente, estudios realizados en pacientes han mostrado que el aumento en los niveles séricos de S100B se correlaciona en mayor medida con una isquemia del tipo hemorrágica y en menor medida con la isquemia causada por obstrucción arterial. El aumento de S100B sérica es indicador de un peor pronóstico clínico (Dassan y col 2009; Ahmad y col., 2012; Montaner y col., 2012).

En animales de experimentación se ha observado un incremento de la expresión de S100B en astrocitos reactivos en los bordes de la lesión isquémica, un fenómeno que precede a la expansión del daño (Matsui y col., 2002, Ramos y col., 2004). En animales transgénicos, la sobreexpresión de S100B genera una exacerbación del daño isquémico acompañado de una mayor astrogliosis en la zona de penumbra (Mori y col., 2008) mientras que la administración de ácido arúndico, que previene la sobreproducción de S100B por parte de astrocitos, disminuye el daño isquémico tardío (Asano y col., 2005).

Estudios en ratas sometidas al paradigma de isquemia cerebral por devascularización cortical (modelo utilizado en nuestro laboratorio - ver materiales y métodos) evidenciaron que existe una sobreproducción de S100B por parte de astrocitos reactivos con un consecuente aumento de sus niveles en plasma sanguíneo (Ramos y col., 2004).

Funciones intra y extracelulares de S100B

Como comentamos anteriormente, la localización intracelular de S100B es citoplasmática, siendo liberada al medio extracelular en forma activa por un mecanismo de

secreción no clásico (compartido con las interleuquinas) como respuesta a diferentes estímulos o puede ser liberada en forma pasiva cuando un astrocito sufre muerte por necrosis liberando su contenido citoplasmático al espacio extracelular (Davey y col., 2001; Gerlach y col., 2006., Leite y col., 2009; Guerra y col., 2011). En estas situaciones se considera que S100B se comporta como un DAMP (Sorci y col., 2010) que una vez liberado puede desencadenar distintos tipos de respuestas celulares, sobre neuronas y glia.

La participación de S100B en la regulación de procesos intracelulares ha sido ampliamente estudiada y algunas de estas funciones se resumen en la figura 1.6 (Donato y col., 2009; Sorci y col., 2010, 2013).

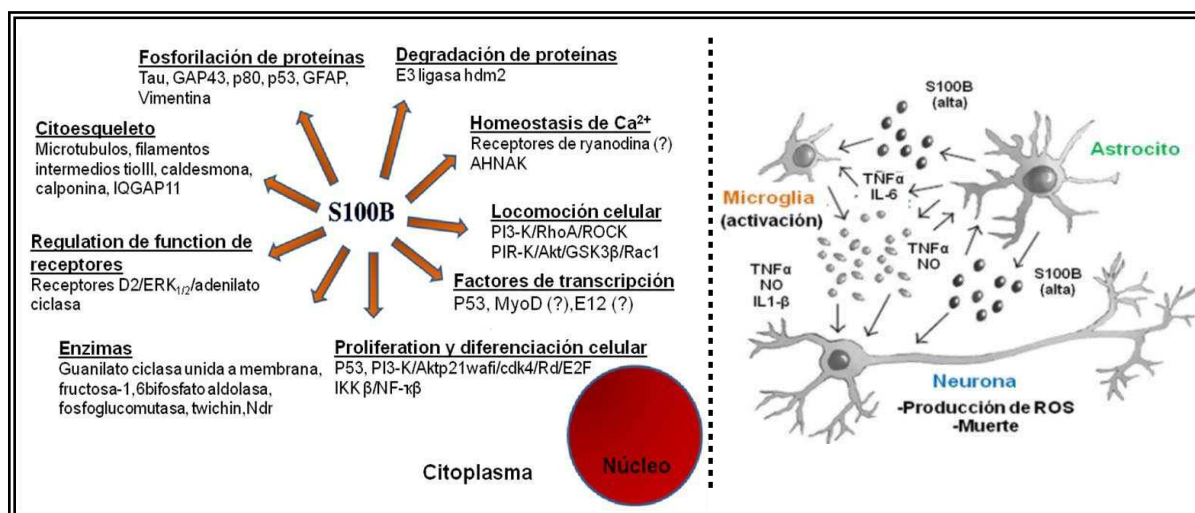


Figura 1.6: funciones intracelulares y extracelulares de S100B. El esquema muestra un resumen de los procesos intracelulares de los que participa S100B (izquierda) (modificado de Donato y col., 2009) y la señalización parácrina de S100B sobre microglía y neurona (derecha) (modificado de Sorci y col., 2010).

A nivel extracelular, y particularmente sobre células del SNC, distintos trabajos muestran que S100B tendría efectos sobre microglía, neuronas y astrocitos (Figura 1.6). La mayor parte de la evidencia obtenida proviene de experimentos *in vitro* ya que resulta muy difícil modular artificialmente la señalización extracelular de S100B *in vivo* sin interferir con sus funciones intracelulares. En general, se ha estudiado la respuesta celular mediante el agregado de S100B exógena al medio de cultivo.

Se ha mostrado que S100B, actuando junto con citoquinas proinflamatorias, funciona como un activador de la microglía, promoviendo también su migración en forma RAGE dependiente (Bianchi y col., 2007, 2008, 2011). En relación a este punto, se mostró que la sobreexpresión de S100B se correlaciona con una respuesta inflamatoria exacerbada luego de la infusión intraventricular de β-amiloide (Craft y col., 2005). Por otro lado, estudios *in vitro* también mostraron que S100B promueve el crecimiento de neuritas en neuronas de

los ganglios de la raíz dorsal (DRG) (Van Eldik y col., 1991) y protege neuronas hipocámpales del daño inducido por la privación de glucosa (Barger y col., 1995). Kogel y colaboradores (2004) mostraron que la preincubación con S100B promueve la supervivencia neuronal frente a un posterior daño por excitotoxicidad por exposición al compuesto NMDA. La concentración de S100B alcanzada en el espacio extracelular sería clave para determinar efectos deletéreos o benéficos de S100B.

Experimentos con células gliales, mostraron que S100B promueve la incorporación de ³H-timidina lo que indicaría un aumento de la proliferación (Selinfreund y col., 1991) y que la exposición a S100B recombinante producida en bacterias induce un aumento en la expresión de la enzima óxido nítrico sintasa y consecuente producción de NO. Ponath y colaboradores (2007) mostraron que cultivos primarios de astrocitos responden a S100B aumentando la expresión de ciertos genes relacionados a la respuesta inflamatoria.

Se ha descrito además que S100B es ligando del receptor de patrones moleculares RAGE, quien reclutaría adaptadores intracelulares para activar cascadas de señalización luego de la interacción entre ambas proteínas (ver más adelante). Es importante destacar que solo uno de los trabajos mencionados, en relación a las funciones extracelulares de S100B (Ponath y col., 2007), mostró expresión del receptor RAGE (en astrocitos) en cultivo mientras que ninguno de ellos comprobó la dependencia de los efectos de S100B respecto de RAGE realizando experimentos de pérdida de función.

1.5 RAGE como receptor de patrones moleculares (PRR)

Funciones como receptor de membrana

El receptor RAGE fue originalmente caracterizado como una proteína de superficie en células endoteliales que era capaz de unir productos avanzados de glicosilación participando así de la respuesta celular durante estadios avanzados de diabetes (Schmidt y col., 1992). Luego de ser clonado, RAGE fue caracterizado como miembro de la superfamilia de inmunoglobulinas con un fragmento extracelular de unión a ligando y una porción citoplasmática necesaria para la activación de cascadas de señalización intracelulares (Neeper y col., 1992). A pesar de no tener un dominio de autofosforilación, el dominio intracelular de RAGE puede reclutar proteínas adaptadoras, como Diaphanous 1, pudiendo así desencadenar distintas cascadas de señalización específicas (Hudson y col., 2008).

El receptor RAGE puede ser encontrado en distintos tejidos de un organismo adulto, sin embargo, la expresión de su RNA mensajero en cerebro adulto normal es apenas detectable mientras que los niveles de proteína son indetectables (Brett y col., 1993). Se ha encontrado que RAGE se expresa en el cerebro durante el desarrollo participando de la migración neuronal y extensión de neuritas, mientras que en cerebro adulto su expresión se

observa sólo en situaciones patológicas. Una vez expresado en adultos, se propone que RAGE podría interactuar con distintos ligandos (Figura 1.7) teniendo un rol clave en la respuesta inflamatoria. La expresión de RAGE ha sido ampliamente asociada a enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson, la epilepsia e incluso al estado patológico de la isquemia cerebral (Hori y col., 1995; Hofmann y col., 1999; Basta y col., 2002; Chou y col., 2004, Sims y col., 2010; Ramasamy y col., 2009). En modelos experimentales de apnea del sueño también se ha demostrado que la expresión de RAGE se correlacionaría con el patrón de daño neuronal (Avilés Reyes y col., 2010; Burckhardt y col., 2008). El papel que cumple RAGE en situaciones patológicas es aún sujeto de intenso debate debido a que ha mostrado participar tanto de la muerte como de la sobrevivencia neuronal. (Schmidt AM. y col., 2000; Rong y col., 2005; Yan y col., 2009; Sathe y col., 2012, Iori y col., 2013).

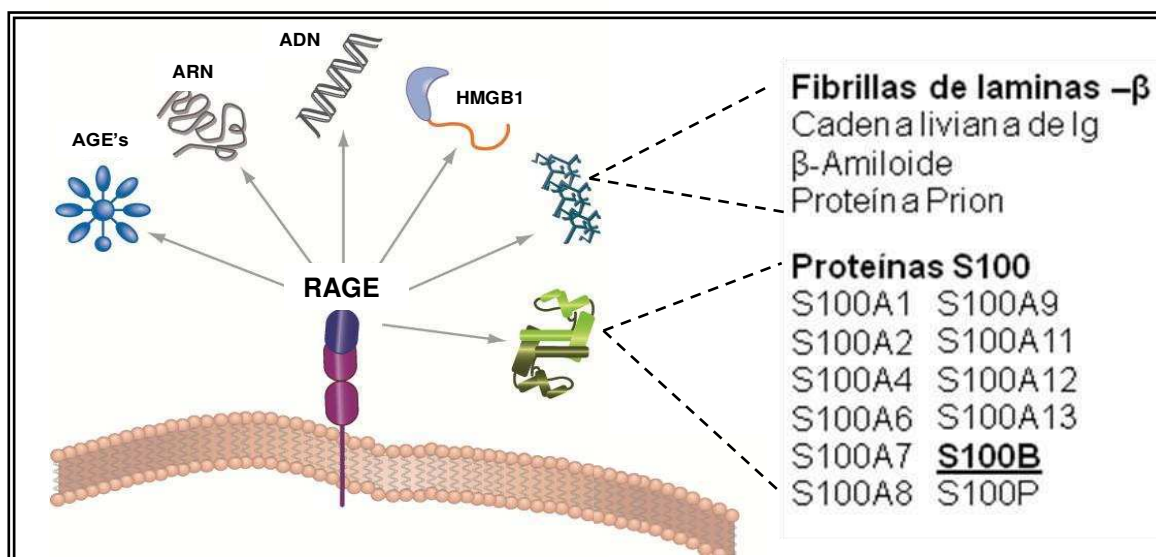


Figura 1.7: Ligandos conocidos para el receptor RAGE. El esquema resume los principales ligandos que han sido reconocidos como capaces de interactuar y activar al receptor RAGE (Modificado de Sims y col., 2010).

RAGE en la isquemia cerebral

En el caso particular de la isquemia cerebral se ha encontrado una sobreexpresión del receptor RAGE tanto en estudios postmortem de cerebros humanos como en cerebros de ratas sujetas a un modelo experimental de isquemia (Zhai y col., 2008).

Mediante utilización de animales transgénicos, se ha observado que la sobreexpresión de RAGE en neuronas favorece el daño isquémico (Hassid y col., 2009), mientras que el bloqueo de RAGE o el knock out del receptor en animales, reduce el daño isquémico (Muhammad y col., 2008). Este último trabajo muestra además que la expresión

de RAGE es importante para la activación de macrófagos infiltrantes mediando la señalización por DAMPs, dejando en claro la participación de este receptor en la respuesta inflamatoria luego de un evento isquémico.

Existe consenso de que la interacción de RAGE con alguno de sus ligandos, promueve la activación y translocación nuclear del factor de transcripción NF κ B, también relacionado a la respuesta inflamatoria y a la sobrevida neurona (Bierhaus y col., 2006).

1.6 El factor de transcripción NF κ B como mediador de la respuesta celular

NF κ B en el Sistema Nervioso Central

NF κ B es un factor de transcripción inducible, de expresión ubicua y altamente conservado en la evolución. Este factor se encuentra formado por la combinación de dos subunidades a partir de siete posibles (p105, p100, p50, p52, RELA o p65, c-REL y RELB). En condiciones de reposo, el dímero NF κ B se localiza en el citoplasma unido a una proteína conocida como I κ B (Inhibidor Kappa B). Ante determinadas señales, la proteína I κ B es fosforilada por las quinasas de I κ B llamadas I κ Ks lo que lleva a su ubiquitinización y posterior degradación mediada por el proteosoma (Figura 1.8). Una vez libre, el dímero NF κ B expone su dominio de translocación nuclear (NLS, del inglés *nuclear localization signal*), lo que le permite la migración al núcleo luego de ser reconocido dicho dominio por importinas nucleares (Chen y col., 2004; Pasparakis y col., 2006; Niederberge y col., 2013). Dentro del núcleo, NF κ B puede unirse a secuencias blanco en la región regulatoria de distintos genes. Dependiendo de la conformación del dímero, NF κ B puede actuar tanto como regulador positivo como negativo de la expresión génica ya que algunas subunidades no poseen dominio de transactivación (Figura 1.8). También existen otras variables que pueden influir en la actividad transcripcional de este factor como el período de tiempo en que permanece activo, la cantidad de factor translocado al núcleo y las modificaciones postraduccionales que puedan sufrir las subunidades (Chen y col., 2004; Hayden y col., 2012; Napetschnig y col., 2013).

Si bien NF κ B participa de la activación de la respuesta inflamatoria, también puede modular la diferenciación, proliferación y sobrevida celular y es por esto que su desregulación puede traer consecuencias severas. En el caso particular del Sistema Nervioso Central, se ha mostrado mediante ensayos con animales transgénicos que reportan la actividad de NF κ B, que este factor de transcripción tiene actividad transcripcional constitutiva en neuronas (Schmidt U. y col., 1996; Bhakar y col., 2002).

En neuronas, NF κ B puede ser encontrado en el soma pero también en las dendritas y parece participar de mecanismos moleculares que modulan la plasticidad sináptica y la arborización neuronal. En este caso, NF κ B actuaría como mediador entre un evento

sináptico y la transcripción génica. La evidencia mencionada sumada a estudios de cognición en animales deja en claro que NF κ B cumple un papel importante en los procesos de formación de la memoria (Mattson y col., 2001; Gutiérrez y col., 2005; Boccia y col., 2007; Kaltschmidt y col., 2009., Federman y col., 2013).

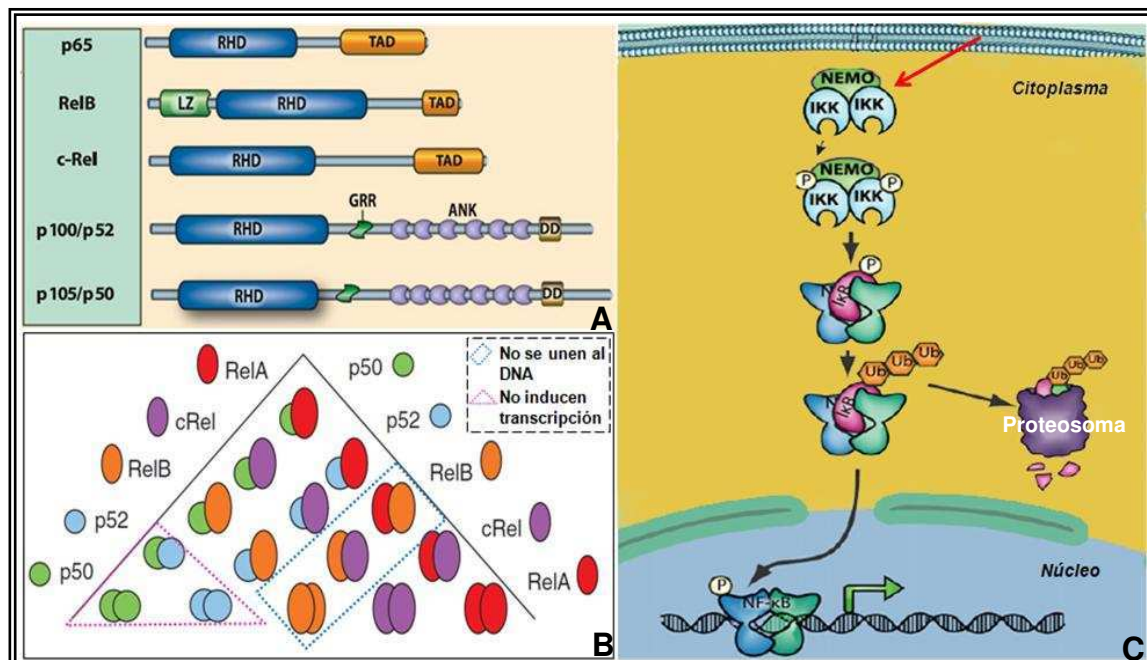


Figura 1.8: Subunidades de NF κ B, activación y translocación nuclear. El esquema A muestra los 5 genes que codifican para las 7 subunidades de NF κ B indicando sus dominios de transactivación (TAD) y de dimerización (RHD) (modificado de Mathew y col., 2012). El esquema B muestra los 15 potenciales dímeros formados por las subunidades más comunes de los cuales solo 9 pueden unirse al DNA e inducir transcripción (modificado de O'Dea y col., 2010).

NF κ B también modula la expresión de genes asociados a la regulación de la apoptosis. Llamativamente, dependiendo de la duración del estímulo y, de la conformación del dímero este factor de transcripción puede inducir la expresión tanto de genes antiapoptóticos (ej.: cIAPs, BCL2s, TRAF1/TRAF2, y superóxido dismutasa o SOD), como de genes proapoptóticos (ej.: BIM y Noxa) (Wang CY. y col., 1998; Mattson y col., 2006; Inta y col., 2006). Se ha mostrado que mientras la actividad basal constitutiva de NF κ B es necesaria para la supervivencia neuronal, una sobreactivación también puede inducir eventos de apoptosis (Bhakar y col., 2002; Inta y col. 2006; Sarnico y col., 2009).

A diferencia de lo observado en neuronas, las células de la glía no mostraron tener actividad constitutiva de NF κ B y su activación inducida ha sido asociada a la respuesta glial a eventos patológicos (Schmidt U. y col., 1996., Kaltschmidt y col., 2009). En experimentos con animales transgénicos donde la activación de NF κ B está inhibida específicamente en astrocitos se observó una atenuación de la respuesta inflamatoria en un modelo de lesión

de médula espinal acompañada de una mejor recuperación funcional (Brambilla y col., 2005, 2009). Además, resultados *in vitro* con cultivos primarios de astrocitos expuestos a LPS sugirieron que la activación de NF κ B conduce a la expresión de genes proinflamatorios (Gorina y col., 2011).

Algunos trabajos realizados *in vitro* sugieren que la exposición a S100B parecería inducir activación de NF κ B tanto en cultivos primarios de neuronas (Alexanian y col., 1999; Kogel y col., 2004) como en astrocitos (Lam y col., 2001; Ponath y col., 2007) aunque en ningún caso se demostró si dicho efecto estaría mediado por RAGE, o por algún otro receptor.

NF κ B en la isquemia cerebral

Se ha observado un aumento de la actividad de NF κ B en distintos modelos de isquemia cerebral en animales (Gabriel y col., 1999; Pizzi y col., 2009) y una sobreexpresión de la subunidad p65 de NF κ B en tejido isquémico humano (Terai y col., 1996).

La actividad de NF κ B en estas situaciones patológicas ha sido asociada a un mayor daño isquémico dado que el bloqueo global de la expresión de algunas de sus subunidades mejora la recuperación al daño (Nurmi y col., 2004; Inta y col., 2006). Se ha mostrado que estos efectos deletéreos de NF κ B serían dependientes de la activación de las IKKs mencionadas anteriormente y su control se ha propuesto como estrategia neuroprotectora (Herrmann y col., 2005; Schwaninger y col., 2006). Se ha mostrado también que luego de la isquemia cerebral existe un recambio en la combinación de subunidades que conforman al dímero NF κ B en neuronas y que las nuevas combinaciones estarían participando de la muerte neuronal, aunque en ciertos casos, pueden promover también supervivencia. Cabe destacar que la subunidad p65 se mantiene estable y participa tanto de la función protectora como deletérea de NF κ B (Sarnico y col., 2009; Pizzi y col., 2009).

Evidencia previa sobre la activación de NF κ B mediada por la interacción S100B/RAGE.

Mencionamos que S100B sería capaz de evocar una respuesta celular tanto en neuronas como en astrocitos. Sin embargo, solo un trabajo realizado por Huttunen y colaboradores (2000), utilizando una línea celular de neuroblastoma, mostró que S100B mejora la supervivencia celular en condiciones normales de cultivo y promueve extensión de neuritas en forma dependiente de RAGE. Utilizando el mismo sistema de líneas celulares Huttunen y colaboradores (1999) habían previamente mostrado que la interacción de RAGE con otro ligando (anfoterina, actualmente denominada HMGB-1) promueve la activación de NF κ B. Si bien estas líneas de neuroblastoma (N18) permiten una eficiente transfección y expresión de proteínas, solo representan, en el mejor de los casos, un modelo de diferenciación neuronal (Huttunen y col., 2002). Es por eso que en este trabajo de tesis

decidimos utilizar cultivos primarios para evaluar si los efectos de S100B sobre neuronas y astrocitos están mediados por el receptor RAGE en condiciones en las que este receptor se expresa.

Hipótesis y Objetivos

El objetivo general de este trabajo de tesis fue analizar los mecanismos moleculares que subyacen a los procesos celulares de muerte y sobrevida neuronal en el estado patológico de la isquemia cerebral, con el objetivo de evidenciar nuevos blancos moleculares que permitan el desarrollo de estrategias de neuroprotección de mayor accesibilidad y efectividad clínica. En particular, nos propusimos estudiar si el aumento en los niveles extracelulares de S100B, compatible con su rol como DAMP, es suficiente para evocar la respuesta de muerte neuronal y de activación astrogliar observada en la penumbra isquémica y si dichos efectos están mediados por el receptor de patrones moleculares RAGE y su efector NFκB.

Nuestra hipótesis de trabajo propone que S100B liberada desde el foco isquémico en forma de gradiente sería capaz de condicionar el destino de los distintos tipos celulares afectados por un evento isquémico. La respuesta celular estaría probablemente mediada por RAGE y la activación de NFκB.

Para intentar poner a prueba esta hipótesis, en este trabajo de tesis nos propusimos los siguientes objetivos específicos:

1) Evaluación de la activación de la ruta S100B>RAGE>NFκB *in vivo* en animales sometidos a una isquemia experimental. Estudiar la expresión de RAGE y activación de NFκB luego de la isquemia, en neuronas y astrocitos afectados por la lesión. Realizar ensayos de ganancia de función mediante la inyección intracortical de S100B.

2) Evaluación de la comunicación neuro-glial dependiente de S100B>RAGE>NFκB *in vitro*. Estudiar la respuesta neuronal a la proteína astrogliar S100B utilizando cultivos primarios de neuronas corticales expuestas a glutamato. Evaluar parámetros de muerte y sobrevida, extensión de neuritas, expresión de RAGE y la activación de NFκB

3) Evaluación de la respuesta astrogliar a la activación de la ruta S100B>RAGE *in vitro* en cultivos astrogliales. Estudiar la respuesta de astrocitos a la proteína S100B. Evaluar cambios morfológicos, proliferación, expresión de RAGE, activación de NFκB y la sobrevida a estrés oxidativo.

Materiales y Métodos

3.1 Experimentos *in vivo*

Animales

Se utilizaron ratas machos de la cepa Wistar (250-300 g) 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 temperatura 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 desarrollaron 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 las recomendaciones de la *Society for Neuroscience* (SFN). Para evaluar la actividad de NF κ B contamos también con ratones reportadores NF κ B-LacZ generosamente cedidos por el Dr. Phillip Barker (Montreal Neurological Institute, McGill University). Estos ratones transgénicos presentan el gen que codifica para la enzima β -galactosidasa río abajo de 6 secuencias de unión a NF κ B ubicadas en tándem. En los ratones NF κ B-Lac Z, la enzima β -galactosida se expresa como consecuencia de la unión de NF κ B a su región promotora. Esta enzima tiene como sustrato al reactivo X-gal con el cual reacciona dando como producto un precipitado de color azul que permite evidenciar células en las que NF κ B resulto activado (Bhakar y col., 2002).

Modelo de isquemia cerebral por devascularización cortical

El modelo de devascularización cortical (DC) ha sido extensamente usado en la literatura (Maysinger y col., 1994; Figueiredo y col., 1993; Ramos y col., 2004). Brevemente, la cirugía fue realizada en ratas anestesiadas intraperitonealmente con ketamina-xilazina (90 – 10 mg/kg) por vía intraperitoneal. Los animales fueron colocados en un marco estereotáxico con el fin de mantener fija la cabeza del animal y la cirugía se realizó bajo lupa. Utilizando un bisturí de 15 mm se disecó el músculo temporal y la fascia hasta exponer el cráneo el cual fue trepanado hasta lograr una abertura de 2x2 mm aproximadamente entre la sutura coronal y a línea del bregma en un solo hemisferio del cerebro. Luego, mediante la utilización de una aguja de 27G, se realizaron cortes sobre la piamadre a modo de generar un daño sobre los vasos sanguíneos superficiales que irrigan la corteza cerebral, lo que produce una isquemia cortical focal permanente y muy localizada (Figura 3.1). Durante todo el procedimiento se utilizaron hisopos estériles con solución salina estéril con el fin de eliminar la sangre debido a la pequeña hemorragia generada. Una vez verificado el cese de la hemorragia (usualmente no más de 50 segundos) la incisión en la piel se cerró con el músculo temporal y la fascia utilizando un pegamento cutáneo.

Durante la cirugía y recuperación de la anestesia la temperatura de los animales fue controlada y mantenida con calefacción si así era requerido. Luego de la recuperación, los animales fueron colocados en jaulas individuales.

La lesión solo se realizó en el hemisferio derecho, por lo que el hemisferio contralateral fue utilizado como control, de esta manera contamos con el nivel basal de expresión de las proteínas de interés en los distintos animales y la morfología normal de sus células. Esta metodología, sin embargo, no descarta la posibilidad de que la difusión de moléculas solubles desde la zona lesionada pueda tener efectos sobre el hemisferio contralateral. Los animales sometidos a cirugía fueron divididos en distintos grupos y fueron sacrificados a distintos tiempos luego de la DC, típicamente 2-6 h o 1-3-7 o 14 días post lesión.

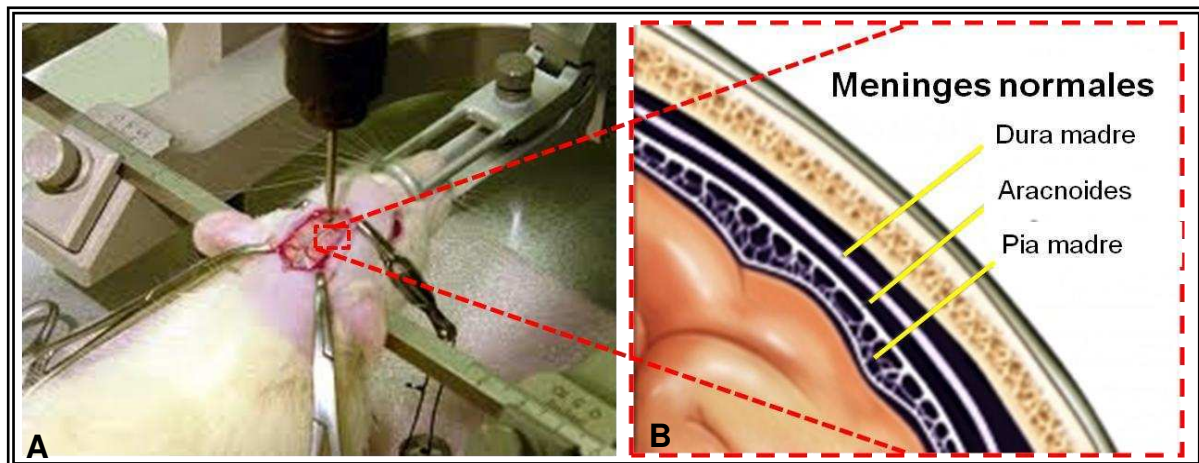


Figura 3.1: Isquemia cerebral por Devascularización Cortical. Se muestra una fotografía de una ratita sujeta en marco estereotáxico (A) y un esquema (B) que simula una ampliación del sitio de cirugía donde se realizó el corte de las meninges.

Infusión intracortical de S100B

Los animales fueron anestesiados con una solución de ketamina-xilazina (90-10 mg/kg) administrada intraperitonealmente y sujetados en marco estereotáxico. Las meninges fueron expuestas tal cual se describió para la devascularización cortical pero en este caso solo se realizó un único corte y de muy pequeña magnitud, suficiente para poder alcanzar la corteza cerebral con la aguja de la jeringa Hamilton (Hamilton company). Las coordenadas estereotáxicas utilizadas para la infusión fueron: antero-posterior (desde el Bregma): -0.39; medio-lateral (desde la sutura media): +0.25; dorso-ventral (desde la Pia Madre): 0.1 según el atlas de Paxinos and Watson., (1982). La inyección solo se realizó en un hemisferio. Experimentos similares para estudiar la respuesta astrogliar han sido realizados por Sipos y colaboradores (2007).

Fijación de animales por perfusión intracardiaca

Los animales fueron anestesiados con una solución de ketamina-xilazina (90 – 10 mg/kg) administrada intraperitonealmente y perfundidos a través del ventrículo izquierdo con 50 ml de solución salina conteniendo 5000 UI/L de heparina con el objetivo de lavar el sistema circulatorio. Luego se perfundieron con 300 ml de solución fijadora conteniendo paraformaldehído 4% (p/v) en *buffer* fosfato 0.1M; pH 7.4. Una vez finalizada la fijación se disecaron los cerebros y se post-fijaron por inmersión en la misma solución fijadora durante 3 h a temperatura ambiente. Luego los cerebros se mantuvieron en una solución de 5% (p/v) de sacarosa en *buffer* fosfato 0.1M, pH 7.4 por 18 h para luego ser pasados a una solución de sacarosa 30% (p/v) en *buffer* fosfato 0.1M, pH 7.4 por otras 48 h para lograr la crioprotección del órgano. Por último, los cerebros fueron rápidamente congelados a -80 °C por 3 h y luego almacenados a 20 °C hasta ser seccionados en criostato.

Obtención y selección de cortes histológicos para inmunohistoquímica/inmunofluorescencia.

En criostato se cortaron secciones de tejido de 50 µm de espesor las cuales fueron colocándose en forma seriada en placas *multiwell*. De esta manera, se logró obtener una representación completa de la lesión o zona de interés en cada pocillo o de la placa. Las secciones fueron preservadas a -20 °C en solución crioprotectora compuesta por fosfato de sodio 0.05M, etilen glicol 30% (v/v) y glicerol 20% (v/v) hasta ser utilizadas en ensayos histológicos.

Inmunohistoquímica de cortes en flotación

Secciones de los distintos grupos experimentales fueron procesadas simultáneamente bajo las mismas condiciones utilizando placas *multiwell*. Para cada ensayo se utilizaron todos los cortes de un pocillo de la placa *multiwell* original (donde la lesión o zona de interés está representada en su totalidad) y se colocaron en un pocillo de una nueva placa. Allí fueron lavados una vez en PBS y otra vez en agua destilada para luego ser deshidratados por sucesivos pasajes en alcoholes de graduación creciente (25%, 50%, 70%, 96% y 100%). Terminados los pasos de deshidratación se inhibió la peroxidasa endógena incubando en una solución de peróxido de hidrogeno 0.03% (v/v) en metanol durante 30 minutos en agitación a temperatura ambiente. Luego los cortes fueron rehidratados por sucesivos pasajes en alcoholes de graduación decreciente (100%, 96%, 70%, 50% y 25%), agua y posteriormente permeabilizados con una solución de Tritón 1% en PBS durante 60 minutos en agitación a temperatura ambiente. Posteriormente se realizó el bloqueo de sitios inespecíficos incubando los cortes con una solución conteniendo suero normal equino (SNE) 3% (v/v) y Tritón 0,5% (v/v) en PBS durante 60 minutos en agitación a temperatura ambiente para luego incubar con los anticuerpos primarios diluidos en una

solución de SNE 1% (v/v) y Tritón 0,3% (v/v) en PBS por 5 h a temperatura ambiente seguido de 48 h a 4°C en agitación lenta. (Ver dilución de anticuerpos primarios en tabla 7.2 del Apéndice). Luego los cortes fueron lavados 3 veces con una solución de Tritón 0.025% (v/v) en PBS (PBS-X) e incubados durante 4 horas en agitación a temperatura ambiente con anticuerpos secundarios específicos conjugados a biotina y diluidos 1:500 en solución de SNE 1% (v/v) y Tritón 0.3% (v/v) en PBS. Posteriormente los cortes fueron lavados 3 veces con PBS-X e incubados con el complejo extravidina-peroxidasa diluido 1:500 en una solución de SNE 1% (v/v) y Tritón 0.3% (v/v) en PBS, manteniéndose en agitación por 60 minutos a temperatura ambiente. Se lavaron los cortes 3 veces con PBS-X y 1 vez con *buffer* acetato 0.1M pH 5.5. El revelado se llevó a cabo por incubación de los cortes 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 los cortes se agregó 1 ml de la solución de revelado (DAB-níquel) a la que se hizo reaccionar con 3.5 µl de peróxido de hidrogeno (stock: 30%v/v). La reacción se detuvo 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 o deshidratados por pasajes en alcoholes crecientes, lavados en xilol y finalmente cubiertos con Permount (Bálsamo de Canadá sintético) y cubreobjetos.

Las secciones de tejido animal procesadas para inmunohistoquímica fueron visualizadas en microscopio óptico de transmisión Zeiss Axiophot equipado con cámara digital Olympus Q5. Las fotomicrografías capturadas fueron almacenadas en formato digital hasta posterior análisis.

Inmunofluorescencia de cortes en flotación

Los cortes fueron seleccionados como se indicó para inmunohistoquímica y lavados con PBS. Luego fueron permeabilizados incubándolos con una solución de Tritón 1% (v/v) en PBS durante 60 minutos en agitación. Posteriormente se realizó el bloqueo de sitios inespecíficos incubando los cortes con una solución conteniendo SNE 3% (v/v) y Tritón 0.5% (v/v) en PBS durante 60 minutos en agitación a temperatura ambiente para luego incubar con los anticuerpos primarios diluidos en una solución de SNE 1% (v/v) y Tritón 0.3% (v/v) en PBS por 5 h a temperatura ambiente seguido de 48 h a 4°C en agitación lenta. (Ver dilución de anticuerpos primarios en tabla 7.1 del Apéndice). Los cortes fueron lavados 3 veces con PBS-X e incubados durante 4 h a temperatura ambiente con anticuerpos secundarios específicos conjugados a fluoroforos del tipo *Alexa Fluor 594 y 488* (Jackson). Los anticuerpos secundarios fueron diluidos 1:800 en una solución de SNE 3% (v/v) y Tritón 0.3% (v/v) en PBS. Luego se realizaron 3 lavados con PBS-X seguido de una incubación con el colorante fluorescente Hoechst 33342 (2 µg/ml) en PBS durante 30

minutos en agitación a temperatura ambiente. Por último, los cortes fueron lavados 2 veces con PBS, montados en portaobjetos de vidrios y cubiertos con glicerol 30% (v/v) en PBS. Luego se colocó el cubreobjetos y se realizó el sellado.

Las secciones de tejido animal procesadas para inmunofluorescencia fueron visualizadas en microscopio invertido Olympus IX81 y equipado con cámara digital DP71. Las fotomicrografías capturadas fueron almacenadas en formato digital hasta posterior análisis. Para cada campo se obtuvieron 3 fotomicrografías, una correspondiente a cada canal (Rojo/Verde/Azul). La fotocomposición o *merge* de los tres canales fue realizada mediante el uso del software NIH-ImageJ 1.4.

Alternativamente, algunas las secciones de tejido animal procesadas para inmunofluorescencia fueron visualizadas en microscopio confocal Olympus FV-1000/IX81. En este caso se obtuvieron 11 imágenes contiguas en el eje Z de 1µm de espesor para cada canal (Rojo/Verde/Azul). Cada una de las imágenes corresponde a un plano focal del eje Z. Las fotomicrografías de microscopia confocal mostradas en la sección de resultados corresponden a la proyección de los 11 planos focales. La fotocomposición o *merge* de los tres canales fue realizada mediante el uso del software NIH-ImageJ 1.4.

Tinción de neuronas en degeneración con Fluorojade B

Con el fin de estudiar la muerte neuronal en la zona de la lesión, realizamos ensayos de tinción con Fluorojade B (Millipore), para detectar neuronas en degeneración (Schmued y col., 1997). Las secciones de cerebro fijadas fueron expuestas a distintas soluciones en el siguiente orden: 1) NaOH (hidróxido de sodio) 1%/EtOH 80% (etanol); 2) EtOH 70%; 3) H₂O MiliQ; 4) KMnO₄ (permanganato de potasio) 0.06%; 5) H₂O MiliQ; 6) Reactivo Fluorojade B; y 7) H₂O MiliQ. Luego las secciones se dejaron escurrir por 15 seg y se secan a 50 °C por 15 min. Por último, se realizó un pasaje por xilol y para luego se cubiertas utilizando en el mismo medio de montaje utilizado en fluorescencia. Las secciones de tejido animal procesadas fueron visualizadas en microscopio invertido Olympus IX81 computarizado y equipado con cámara digital de video DP71. Las fotomicrografías capturadas fueron almacenadas en formato digital hasta posterior análisis. Esta misma técnica ya ha sido utilizada para visualizar neuronas en degeneración luego de la isquemia (Butler y col., 2002).

Recuperación antigénica

Debido a la fijación de los tejidos utilizando paraformaldehido, ciertas proteínas pierden antigenicidad y no pueden ser reconocidas por anticuerpos específicos. Con el fin de detectar el antígeno p65-NLS (señal de localización nuclear de la subunidad p65 de NFκB) realizamos un protocolo de recuperación o rescate antigénico que ha sido

ampliamente utilizado en la bibliografía (Shi y col., 1993; Morgan y col., 1994; Pellicer y col., 1994; Brown y col., 1995; Kanai y col., 1998). Previo a ser procesados según el protocolo de inmunohistoquímica descrito anteriormente, los cortes fueron incubados en una solución de *buffer* citrato 0.01 M a 90 °C en baño térmico durante 20 minutos. Luego se removieron del baño y se dejaron enfriar por 20 minutos a temperatura ambiente. El *buffer* citrato contiene ácido cítrico 10 mM, Tween 20 0.05 % v/v, pH 6.

Histoquímica para evaluar actividad de β -galactosidasa en cortes en flotación

Los ratones NF κ B-LacZ fueron sometidos al modelo de isquemia por devascularización cortical, fijados por perfusión intracardíaca a 3DPL y sus cerebros fueron disecados y seccionados de la misma forma antes descrita para ratas Wistar. Para evaluar la actividad de β -galactosidasa, se seleccionaron secciones de cerebro y se dejaron secar a temperatura ambiente por 1 h y luego fueron sumergidas en la solución *rinse* (Na₂HPO₄ 80 mM, NaH₂PO₄ 20mM, MgCl₂ 2 mM, Nonidet P40 0.2%, sodium deoxycholate 1 mg/ml) por 30 min a temperatura ambiente. Luego se reemplazó la solución de *rinse* con la solución de tinción con X-gal (solución de *rinse*, K₃ [Fe(CN)₆] 5 mM, K₄[Fe(CN)₆] 5 mM y 4-chloro-5-bromo-3-indolyl- β -galactoside 800 μ g/ml) durante 18 h a 37 °C. Por último, los cortes fueron montados según lo descrito anteriormente en el protocolo de inmunohistoquímica. Las secciones de procesadas mediante esta técnica fueron visualizadas en microscopio óptico de transmisión Zeiss Axiophot equipado con cámara digital Olympus Q5. Las fotomicrografías capturadas fueron almacenadas en formato digital hasta posterior análisis.

Inmunoblot de homogenatos de corteza

Animales sometidos a isquemia por DC fueron anestesiados con ketamina-xilazina (90 – 10 mg/kg i.p.) y sacrificados a 3, 7 o 14 DPL. Rápidamente y trabajando sobre hielo, se disecaron los cerebros y se extrajo por animal un fragmento de la corteza isquemia y otro de igual tamaño de la corteza control. El tejido fue conservado en tubos tipo *Eppendorf* a -80°C hasta ser homogeneizados.

Para la homogeneización, se agregó a cada tubo 1 ml de *buffer* de homogeneización (10mM Tris, pH 8.0 150 mM NaCl, 1% NP-40, 10% glicerol) al cual se le añadió un cocktail de inhibidores de proteasas al 10% (Sigma) y PMSF al 5%. La muestra fue colocada en un *potter* de vidrio para realizar la disgregación mecánica utilizando un homogeneizador eléctrico. Luego se realizó una centrifugación a 14000 RPM por 10 minutos a 4°C para obtener un pellet que contenía la fracción nuclear y de membranas y un sobrenadante con la fracción citoplasmática. La concentración de proteína total se determinó mediante el método de Lowry (Lowry y col., 1951) y luego el contenido proteico de las muestras fue normalizado antes de sembrarlas en los geles para electroforesis. Las muestras fueron

desnaturalizadas, separadas por electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS y transferidas a una membrana de nitrocelulosa de 0.22 μm . El bloqueo de sitios de unión inespecífica se realizó con una solución de leche en polvo descremada al 5% en TBST (10mM Tris, pH 8.0 150mM NaCl, 2 % Tween 20) por dos horas a temperatura ambiente y con agitación. Luego de quitar la solución de bloqueo, se incubó con los anticuerpos específicos diluidos en solución de bloqueo durante toda la noche a 4°C y con agitación suave. Luego de tres lavados con TBST las membranas fueron incubadas con los anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa diluidos en solución de bloqueo durante 2 horas, a temperatura ambiente y con agitación. Por último se lavó tres veces con TBST. Las bandas inmunorreactivas fueron detectadas usando un sistema de quimioluminiscencia (ECL Pierce) y placas radiográficas (AGFA). Por último las placas radiográficas fueron digitalizadas utilizando un scanner y la cuantificación de la densidad óptica de cada banda se realizó utilizando el *software* Gelpro32 Analyzer.

3.2 Experimentos *in vitro*

Cultivos primarios de neuronas corticales

Se realizó según lo descrito por Lucido y col. (2009) y Reines y col. (2012). Se disecaron las cortezas de embriones de rata de 18^{vo} día de gestación. Se realizó una primera disgregación con tripsina 0.25x (Invitrogen) durante 20 minutos a 37°C en baño térmico. La tripsina fue neutralizada incubando con suero fetal ovino 10% (v/v) en DMEM, y sucesivos lavados con DMEM. Posteriormente se realizó una disgregación mecánica del tejido mediante el empleo de pipetas pasteur de cultivo. Luego se realizó una centrifugación seguido de la resuspensión celular empleando medio Neurobasal (Invitrogen) suplementado con B27 2% (v/v) (Gibco) y glutamina. Antes de sembrar en placas recubiertas con poli-L-lisina, la densidad celular fue estimada mediante la cuantificación de número total de células utilizando la cámara de Neubauer en microscopio invertido de contraste de fase. El número de células utilizado fue variable según los objetivos de cada experimento. Luego de 7 días *in vitro* (DIV), los cultivos neuronales fueron expuestos a los distintos tratamientos según se indica en cada experimento.

Cultivos primarios de astrocitos corticales depletados de microglía

Los cultivos se realizaron según lo descrito por Neumann y colaboradores (1997); y Ponath y colaboradores (2007) con algunas modificaciones. Se disecaron cortezas de ratas en estadio de 3-4 días post natal. El tejido fue disgregado mecánicamente empleando tijeras de cirugía estériles y pipetas pasteur de cultivo. Luego de sucesivos lavados en medio de cultivo DMEM sin suero, las células fueron centrifugadas y resuspendidas en

medio DMEM completo DMEM + suero fetal bovino 10% + L-glutamina 2 mM + penicilina/estreptomicina 100 µg/ml para ser sembradas en botellas de cultivo de 25 cm² recubiertas con poli-L lisina. El medio fue reemplazado por medio completo cada 48 h hasta alcanzar el 100% de confluencia (7-9 días). Luego las botellas fueron mantenidas en agitación (145 RPM) durante 48 h para eliminar la microglía que crece por encima de la monocapa de astrocitos. Por último, los astrocitos que permanecen adheridos a la botella de cultivo fueron nuevamente incubados en medio DMEM completo por otras 48 h antes de ser tripsinizados y resembrados en placas multiwell para realizar experimentos. Luego de la tripsinización y antes de sembrar, la densidad celular fue estimada mediante la cuantificación de número total de células utilizando la cámara de Neubauer en microscopio invertido de contraste de fase. El número de células utilizado fue variable según los objetivos de cada experimento. Ensayos de inmunofluorescencia mostraron que más de un 95% de las células obtenidas mediante este protocolo fueron inmunopositivas para GFAP, confirmando el enriquecimiento de astrocitos.

Exposición de astrocitos a peróxido de hidrogeno (H₂O₂) como modelo de stress oxidativo

Los astrocitos fueron sembrados en placas multiwell y crecidos hasta alcanzar una confluencia de aproximadamente 85%. Los astrocitos fueron pretratados con S100B vehículo por 18 h en presencia o ausencia de los inhibidores de Erk 1/2 (PD 98059, 25µM), Akt (LY 294002, 10µM); NFκB (Bay 117082, 5µM) o vehículo. Luego, el medio fue reemplazado por Optimem libre de suero con o sin H₂O₂ (200 µM). Luego de 2 h los cultivos fueron fijados para inmunofluorescencia.

Modelo injuria artificial *in vitro* o *Scratch Assay*

Los astrocitos fueron sembrados en placas multiwell y crecidos hasta alcanzar una confluencia del 100%. En ese momento se realizó una herida artificial o *scratch* mediante la utilización de un tip plástico estéril. Para realizar el *Scratch*, la punta del tip se puso en contacto con la superficie de la placa y se deslizó trazando una trayectoria a lo largo del diámetro del *well*. Luego, visualizando los cultivos en microscopio invertido, corroboramos la ausencia total de células en el trayecto marcado por el tip. Para ensayos de inmunofluorescencia se realizó un único scratch por well. Luego de media hora el medio fue reemplazado por medio fresco con S100B o vehículo y se incubó por 24 h.

Fijación de cultivos celulares

Luego de distintos tiempos de realizados los tratamientos, los cultivos fueron fijados con una solución compuesta de paraformaldehído al 4% y sacarosa al 4% en PBS, durante

15 minutos a temperatura ambiente. Luego se hicieron 3 lavados con PBS y se conservaron los cultivos en una solución de 0.3% (v/v) de Kathon (conservante) en PBS a 4°C.

Inmunofluorescencia de cultivos

Las células fijadas fueron permeabilizadas con Tritón X-100 al 1% (v/v) en PBS por 15 minutos a temperatura ambiente. Se lavó nuevamente con PBS y se procedió con el bloqueo de sitios inespecíficos incubando con una solución de suero normal equino (SNE) al 5% en PBS por 30 minutos a temperatura ambiente. Luego se incubó con anticuerpos diluidos en solución de bloqueo durante 18 h a 4°C (ver anticuerpos y diluciones en Tabla 7.1 del apéndice). Posteriormente se realizaron tres lavados con PBS y las células fueron incubadas con los anticuerpos secundarios específicos conjugados a fluoróforos del tipo *Alexa Fluor 594 y 488* (Jackson) diluidos en solución de bloqueo durante 4 h, a temperatura ambiente y en oscuridad. Luego se realizaron 3 lavados con PBS seguido de una incubación con el colorante fluorescente Hoechst 33342 (2 µg/ml) en PBS durante 30 minutos. Por último se realizaron tres lavados en PBS y las células se observaron en un microscopio invertido de fluorescencia Olympus IX81.

Ensayo de proliferación por incorporación de BrdU

En los experimentos indicados se añadió al medio de cultivo bromodioxiuridina (BrdU) 600 ng/ml. Este es un análogo del nucleótido timidina el cual se incorpora al ADN durante su replicación en la fase S del ciclo celular por células en proliferación. Previo a comenzar el ensayo de inmunofluorescencia detallado anteriormente, los cultivos fueron fijados y posteriormente incubados con una solución de HCl 0.5 N en PBS durante 30 min a temperatura ambiente, lo que permitió la desnaturalización parcial del ADN y una mejor exposición de la BrdU incorporada. Por último se incubó durante 5 minutos con una solución neutralizante de *buffer* borato 0.1 M. La incorporación de BrdU fue detectada mediante el protocolo de inmunofluorescencia para células en cultivo utilizando un anticuerpo específico. Una vez obtenidas las imágenes de fluorescencia se cuantificó el número total de células inmunopositivas para GFAP (con y sin marca para BrdU) y se calculó el porcentaje de células inmunopositivas para GFAP que además presentaban marca nuclear para BrdU.

Inmunoblot de cultivos celulares

Las células fueron lavadas y lisadas con buffer de lisis (10mM Tris, pH 8.0 150 mM NaCl, 1% NP-40, 10% glicerol) al cual se le añadió una mezcla de inhibidores de proteasas (SIGMA) (todo el procedimiento fue realizado sobre hielo). Posteriormente se realizó una homogeneización utilizando micropipeta con tip de 200 µl. Luego los homogenatos fueron centrifugados (14000 RPM) a 4°C con el fin de obtener por separado las fracciones solubles

y nucleares. La concentración de proteína total se determinó mediante el método de Lowry (Lowry y col., 1951) y luego el contenido proteico de las muestras fue normalizado antes de sembrarlas en los geles para electroforesis. Las muestras fueron desnaturalizadas, separadas por electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS y transferidas a una membrana de nitrocelulosa. El bloqueo de sitios de unión inespecífica se realizó con una solución de leche en polvo descremada al 5% en TBST (10mM Tris, pH 8,0 150mM NaCl, 2 % Tween 20) por dos horas a temperatura ambiente y con agitación. Luego de quitar la solución de bloqueo, se incubó con anticuerpos monoclonales de ratón o policlonales de conejo diluídos en solución de bloqueo durante toda la noche a 4°C y con agitación suave. Luego de tres lavados con TBST las membranas fueron incubadas con los anticuerpos secundarios, conjugados a peroxidasa, diluídos en solución de bloqueo durante 2 horas, a temperatura ambiente y con agitación. Por último se lavó tres veces con TBST. Las bandas inmunorreactivas fueron detectadas usando un sistema de quimioluminiscencia (ECL Pierce) y placas radiográficas AGFA en cuarto oscuro. Por último las placas radiográficas fueron digitalizadas utilizando un scanner y a cuantificación de la densidad óptica de cada banda se realizó utilizando el *software* Gelpro32 Analyzer para PC.

Extracción de RNA mensajero total a partir de cultivos celulares

La extracción de RNA a partir de cultivos primarios de astrocitos se realizó mediante la utilización del RNeasy mini kit (Qiagen) según las instrucciones del fabricante. Los tratamientos para determinar cambios en los niveles de RNA mensajero se realizaron en placas de petri de 60 cm² donde los astrocitos habían alcanzado confluencia. El protocolo de extracción y purificación consistió en coleccionar astrocitos a diferentes tiempos luego de la exposición a S100B para luego lisar las células utilizando *buffer* RLT (600 µl por placa con 6 µl de β-mercapto etanol) y sucesivos pasajes por jeringa y vórtex. Se añadió al lisado celular un volumen de 600 µl de etanol al 70% y se transfirió la mezcla a una columna de purificación adaptada a un tubo colector (Qiagen) y se sometió a centrifugación. Luego se realizaron sucesivas centrifugaciones utilizando buffers de lavado provistos por el kit. En el último paso se realizó el lavado de la columna con un volumen de 40 µl de H₂O milliQ libre de RNAsas a modo de eluir el RNA. El eluido fue recogido y guardado a -80°C hasta su uso para la síntesis de cDNA. Una alícuota de 4 µl del RNA eluido fue utilizada para determinar concentración y pureza midiendo absorbancia a 260 y 280 nm en espectrofotómetro de luz ultravioleta (Eppendorf).

Síntesis de cDNA a partir del RNAmensajero total y PCR

La reacción de síntesis de cDNA se realizó utilizando el kit comercial *Omniscript Reverse Transcription* (Quiagen) con *primers OligodT* (Applied Biosystem), según las

instrucciones del fabricante (Ver reactivos en la Tabla 7.2 del Apéndice). La reacción de PCR se realizó utilizando la enzima Taq Polimerasa (Inbio High Way, Tandil, Argentina) con modificaciones específicas para cada set de primers.

Los primers utilizados fueron provistos por Invitrogen y se detallan en la tabla 7.3 del apéndice. La secuencia de cada set de primers fue obtenida a partir de las citas mencionadas en la tabla 7.3 y su especificidad fue corroborada mediante el uso de software disponible en la web: *UCSC Genome Bioinformatics* y *NIH Primer Blast*.

Electroforesis en geles de agarosa para visualización del producto de RT-PCR

Un volumen de 9 μ l de la reacción fue mezclado con 1 μ l de buffer de siembra y sembrado en un gel de agarosa 2% para separación electroforética. Los geles de agarosa se prepararon en *buffer TAE* con bromuro de etidio para la visualización del ADN en transiluminador (Gel Doc Ez Imager, Biorad). En paralelo se sembró un marcador de peso molecular (*ladder*) para corroborar el tamaño de los productos esperados de PCR (Inbio HighWay).

Las imágenes de los geles adquiridas con el equipo fueron almacenadas en computadora para posterior análisis. La cuantificación de las bandas se realizó mediante el cálculo de densidad óptica utilizando el software Gelpro32 Analyzer para PC.

Generación de plásmidos bisstrónicos RAGE/GFP y RAGE Δ cyt/GFP

Para los estudios de pérdida y ganancia de función se desarrollaron una serie de plásmidos bisstrónicos que contenían wtRAGE/GFP (*full length*) o RAGE Δ cyt/GFP (Angelo y col., 2014). Los plásmidos pcDNA3 conteniendo la versión de wtRAGE o Δ cyt fueron generosamente cedidos por el Dr. Henry Huttunen (Neuroscience Center, University of Helsinki), una vez recibidos fueron reconstituidos y amplificados mediante transformación bacteriana. Los fragmentos correspondientes a las isoformas de RAGE fueron posteriormente subclonados en plásmidos amplicon pA-EUA2, obteniéndose así los plásmidos pA-EUA2-RAGE-FL y pA-EUA2-RAGE- Δ cyt. Estos vectores contienen la secuencia codificante para la proteína verde fluorescente (GFP) controlado por un promotor de HSV. Dicho gen se expresa en forma bisstrónica con el fragmento de RAGE y permite visualizar las células que efectivamente incorporaron el plásmido ya que la eficiencia de transfección en astrocitos primarios es menor al 30%. La correcta inserción de los fragmentos fue confirmada por secuenciación y la expresión tanto de GFP como de RAGE fue verificada en células COS-7.

Amplificación de plásmidos mediante transformación bacteriana.

Se transformaron bacterias *Escherichia coli* DH5- α (Invitrogen) mediante el protocolo de *shock* térmico. Para ello una alícuota de 50 μ l de bacterias competentes fueron descongeladas en hielo e incubadas con 5 μ l de ADN plasmídico reconstituido por 30 min. El tubo conteniendo las bacterias y el plásmido fue incubado a 42°C por 60 seg y luego puesto en hielo por 2 min. Posteriormente se añadieron al tubo 300 μ l de medio SOC precalentado. Las bacterias se incubaron a 37 °C en agitación durante 1 h y luego se sembraron 100 μ l de bacterias en placas con LB-agar (sólido) conteniendo ampicilina. Luego de 24 h a 37 °C, se seleccionó una colonia aislada y se usó para inocular 30 ml de LB líquido con ampicilina (50 μ g/ μ l) durante otras 24 h en agitación. Cuando el cultivo alcanzó una densidad óptica de 0.6 se realizó la purificación del plásmido según el protocolo de centrifugaciones de Wizard *Plus* SV Minipreps, DNA Purification System (Promega) o Quiagen MidiPrep.

Transfección de cultivo primario

Realizamos transfecciones de los plásmidos RAGE/GFP y RAGE Δ cyt en cultivos confluentes (80%) utilizando el método de transfección con Lipofectamina 2000 (Invitrogen). Los experimentos de transfección fueron realizados en placas *multiwell* de 24 pocillos. Para ello, se reemplazó el medio completo con medio OptiMem libre de suero (Gibco) durante 1 hora. Luego se extrajo el medio OptiMem y las células fueron incubadas con la mezcla que se describe a continuación durante 18 h: Por cada pocillo a transfectar se preparó A) 50 μ l de OptiMem + 1.5 μ l de lipofectamina y B) 50 μ l de OptiMem + 1 μ g de ADN plasmídico. Las soluciones A y B fueron incubadas en forma separada durante 5 minutos y luego se realizó una mezcla de ambas soluciones (A+B) la cual se incubó por otros 20 minutos.

Luego de las 18 h de incubación con la mezcla que contiene el ADN y lipofectamina, el medio fue reemplazado nuevamente por medio completo por otras 24 h. Transcurrido este tiempo, se realizó la incubación con las distintas dosis de S100B. Las células transfectadas fueron fácilmente reconocidas debido a la expresión de la proteína GFP. Realizamos ensayos de inmunofluorescencia para estudiar la colocalización de la marca GFP con GFAP y así confirmamos que las células transfectadas eran efectivamente astrocitos.

Análisis estadísticos

Los datos en cada gráfico son presentados como la media y su desvío estándar. La comparación estadística de los diferentes grupos se realizó mediante ANOVA de una vía seguido del post- test de Student-Newman-Keuls. En los casos en donde solo se compararon dos tratamientos, la diferencia entre estos fue evaluada mediante una prueba

de t-test. Un $p < 0.05$ fue considerado estadísticamente significativo. Los asteriscos ubicados sobre las barras muestran diferencias con distintos grados de significancia entre los distintos grupos (*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$). Los grupos comparados se indican en cada experimento así como también alguna variación en los símbolos utilizados.

Resultados

4.1 Experimentos *in vivo*: Modelo de isquemia por devascularización cortical

Expresión de RAGE en el tejido isquémico

Como comentamos en la sección introducción, distintos trabajos han demostrado que el receptor RAGE se expresa luego de la isquemia cerebral. Estos resultados se basan en ensayos de inmunoblot y PCR, y sólo en algunos casos se observó expresión neuronal del receptor mediante ensayos de inmunohistoquímica (Zhai y col., 2008). Nos propusimos estudiar la expresión del receptor RAGE en el modelo de isquemia por devascularización cortical y analizar en que tipo celular se encuentra.

En primer lugar realizamos una caracterización de la respuesta astrogliar a la isquemia por devascularización cortical (DC) a modo de correlacionar dichos eventos con los posibles cambios en la expresión de RAGE. Como se observa en la figura 4.1, este modelo de isquemia experimental genera una lesión muy focalizada en la corteza cerebral. Si bien el tamaño original del core necrótico se amplifica en el tiempo, tal como se observa en la clínica de los pacientes, hemos observado que existe cierta variabilidad entre los animales, que depende el daño original causado durante la cirugía pero también de la variabilidad entre los vasos colaterales que irrigan la zona isquémica. Por otro lado, hemos encontrado que la respuesta astrogliar observada (descrita a continuación) es muy particular dependiendo del tiempo transcurrido luego de la isquemia. Dicha respuesta es independiente del tamaño original del core necrótico.

Mientras que a 1DPL no se observa una respuesta astrogliar marcada, la inmunomarcación para GFAP muestra cambios progresivos en el tiempo desde una gliosis moderada en 3DPL hasta alcanzar la formación de la cicatriz glial a 14DPL (Figuras 4.1 y 4.2).

En 3DPL, observamos un claro aumento de la expresión de GFAP respecto del hemisferio control al mismo tiempo que observamos mayor reactividad astrogliar en las regiones que rodean al core necrótico (Figura 4.1). En 7DPL se observa un estadio intermedio de astrogliosis donde la expresión de GFAP es máxima (Figura 4.1) y los astrocitos adoptan una morfología del tipo glía radial o filamentosa con sus prolongaciones dirigidas hacia el core de la lesión (Figura 4.2). Los cambios en el fenotipo astrogliar se ven acompañados de un aumento en la expresión de vimentina.

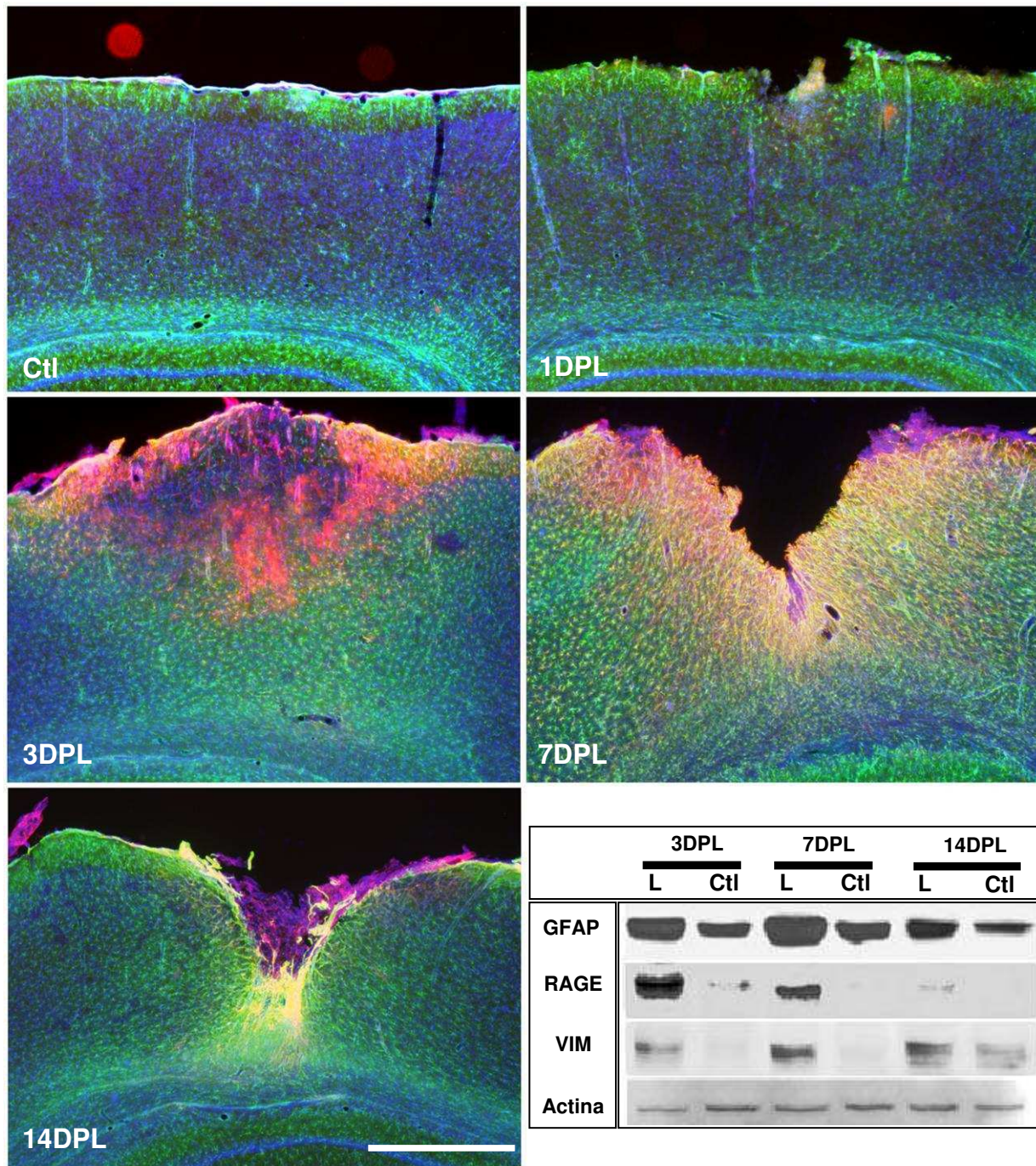


Figura 4.1: Expresión de marcadores astrogliales y del receptor RAGE en isquemia. Las fotomicrografías muestran la expresión de GFAP (verde) y nestina (rojo) a distintos días luego de inducida la lesión por DC. Los núcleos celulares se marcaron con Hoechst (azul). (Barra = 1000 μ m). El ensayo de inmunoblot muestra la abundancia de GFAP, RAGE y vimentina a distintos tiempos luego de inducida la lesión. En todos los casos se compara el hemisferio lesionado (L) contra el hemisferio contralateral del mismo animal (Ctl).

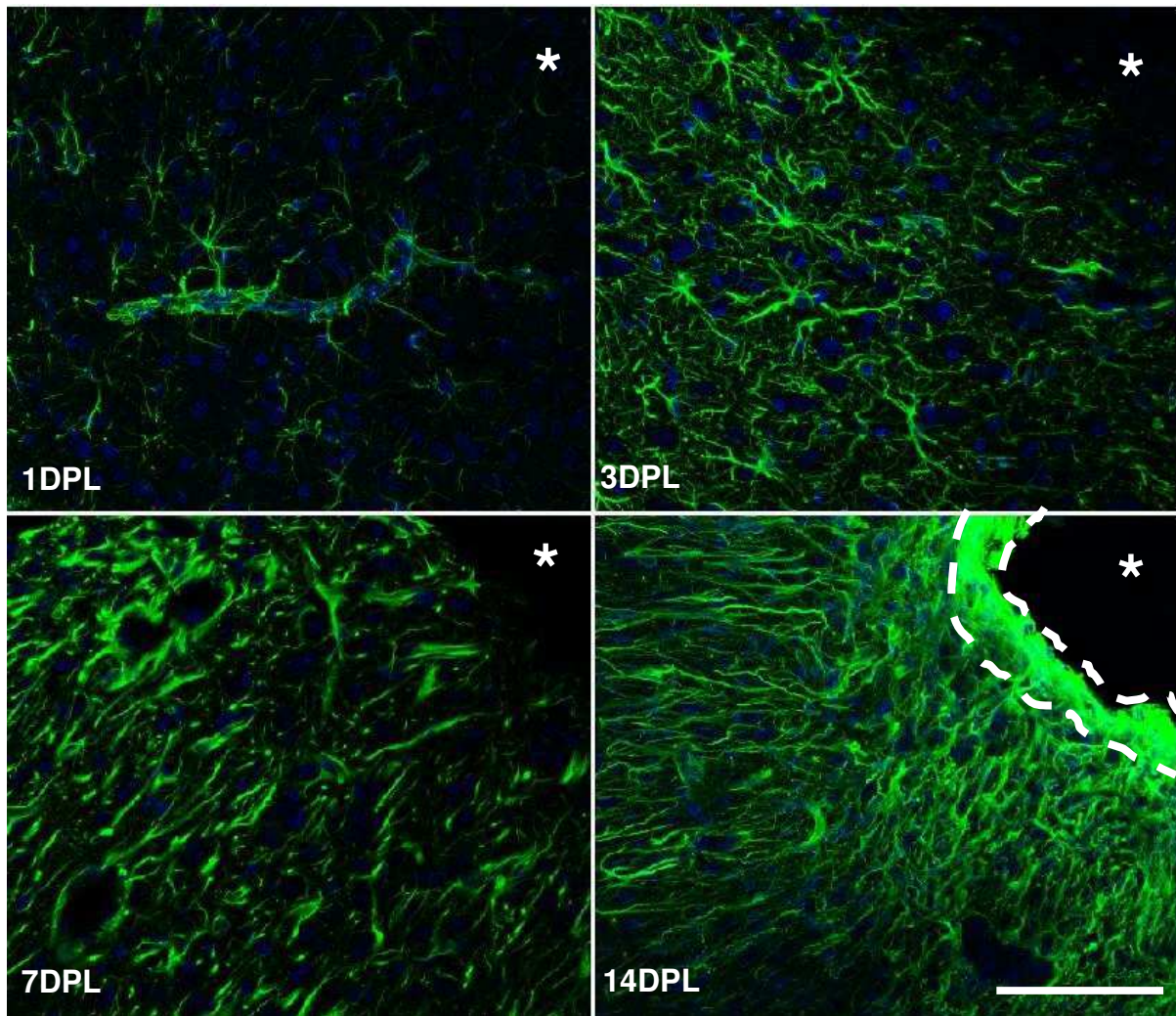


Figura 4.2: Cambios morfológicos astrogliales en la isquemia. Se muestran fotomicrográficas de alto aumento obtenidas en microscopio confocal, de astrocitos cercanos a la lesión isquémica señalada por el asterisco. El color verde corresponde a la inmunomarcación para GFAP y el azul a los núcleos marcados con Hoechst. Línea de puntos en 14DPL marca los límites de la cicatriz glial. (Barra = 30 μ m).

Observamos también que los astrocitos reactivos cercanos a la lesión presentan una sobreexpresión de la proteína nestina (Figuras 4.1 y 4.3). Esta proteína es expresada por precursores neuronales y gliales, pero su expresión decae luego de la diferenciación celular. En corteza de cerebro adulto, su expresión se observa solamente en células endoteliales de los capilares sanguíneos (Shin y col., 2013 y Figura 4.3). Es importante destacar que la expresión de nestina a 3DPL está limitada a astrocitos muy cercanos a la lesión, mientras que a 7 días es posible encontrar astrocitos positivos para nestina en regiones más alejadas, lo que indicaría que las señales que activaron a los astrocitos se propagarían a regiones no afectadas directamente por la isquemia (Figura 4.3).

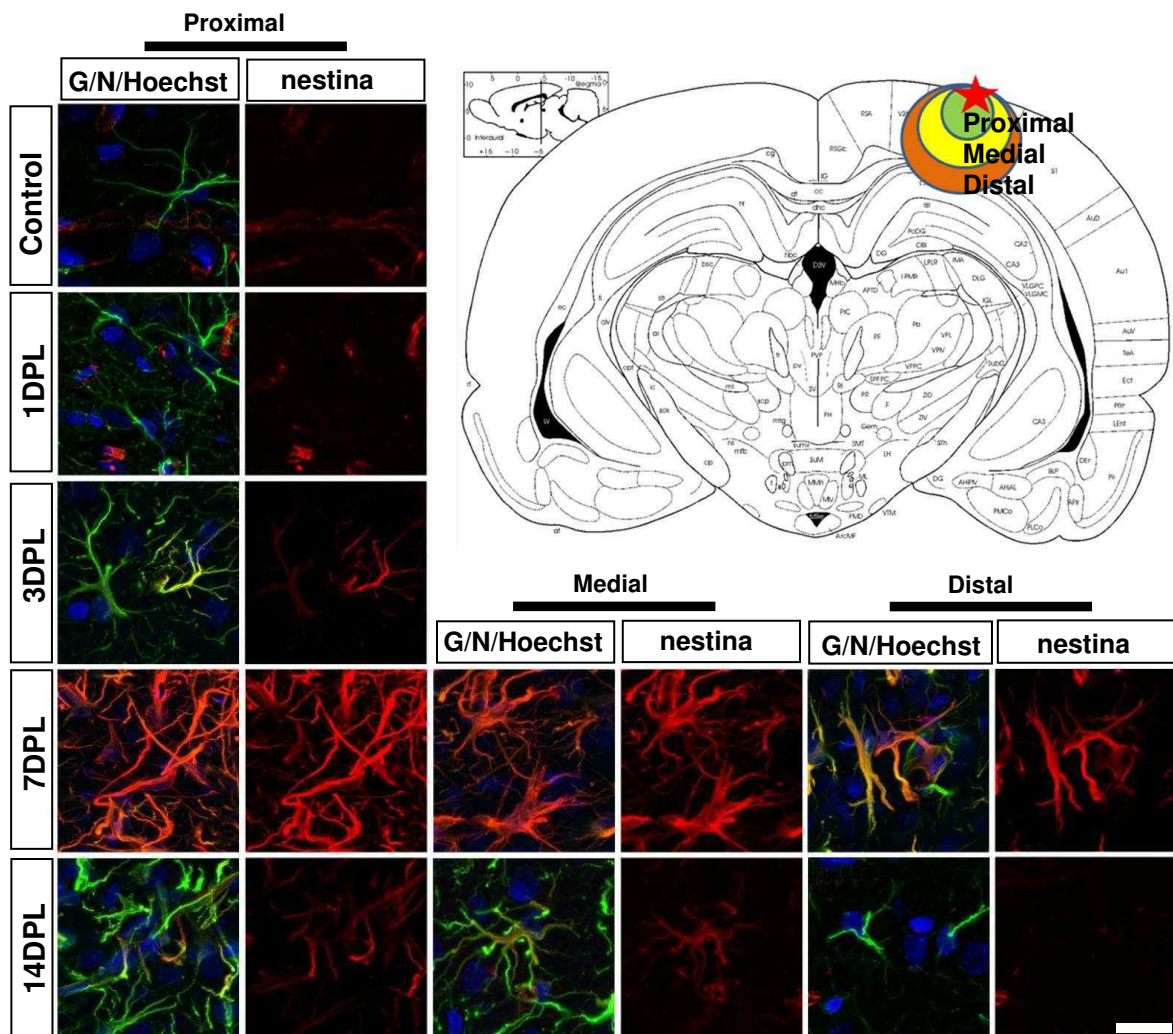


Figura 4.3: Expresión de marcadores astroglicales en la isquemia. Se muestran fotomicrográficas de muy alto aumento de astrocitos a distintos tiempos luego de inducida la lesión obtenidas en microscopio confocal. Realizamos inmunomarcación para GFAP en verde (G) y nestina en rojo (N). Para los tiempos indicados se muestran astrocitos que rodean el core isquémico (proximal). Para 7 y 14DPL se muestra además astrocitos ubicados a distancias más lejanas del core isquémico (medial y distal). Los núcleos se tiñeron con Hoechst en azul. (Barra = 15 μ m). El esquema modificado de Paxinos y col., 2007 indica la ubicación de las zonas nombradas como proximal, medial y distal.

También, como era esperable, observamos en este modelo que existe muerte neuronal por necrosis mediante una tinción con FluorojadeB (la técnica evidencia neuronas en degeneración por necrosis) principalmente a 1DPL (Figura 4.4).

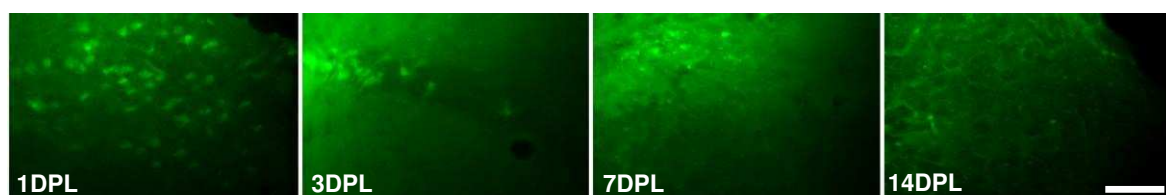


Figura 4.4: Neurodegeneración en la isquemia. Se muestran fotomicrográficas de células positivas para la marcación con el reactivo Fluorojade B (verde). (Barra = 50 μ m).

En cuanto a la expresión RAGE encontramos un máximo a 3DPL en ensayos de inmunoblot (Figura 4.1). Habiendo mostrado que, al igual que en otros modelos, la expresión de RAGE aumenta luego de la devascularización cortical, nos propusimos estudiar el tipo celular en el que se expresa. Realizamos ensayos de inmunohistoquímica a distintos tiempos luego de inducida la lesión y observamos a 3DPL que las células inmunopositivas para RAGE presentan morfología neuronal, astrogliar y microglial (Figura 4.5).

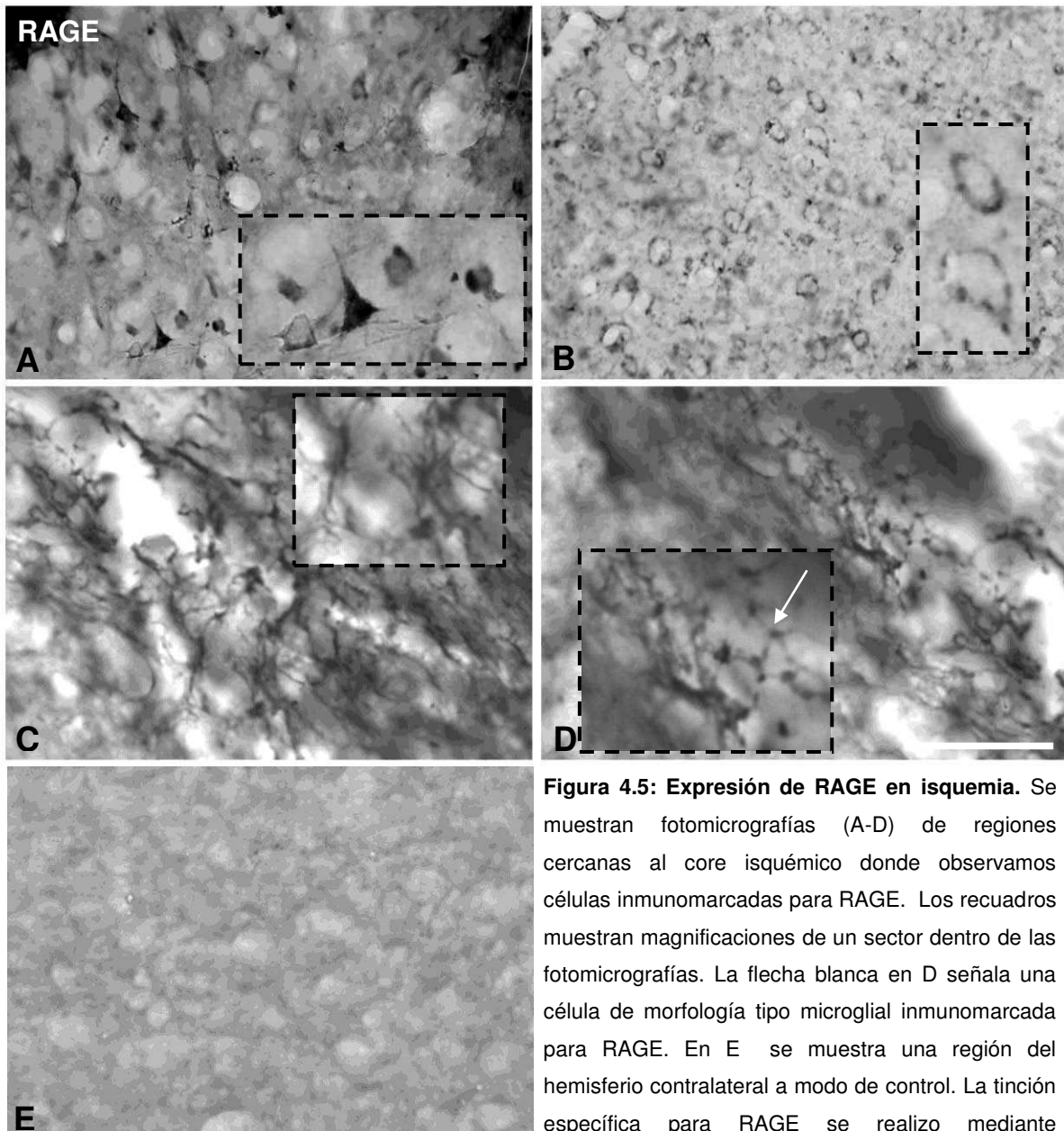


Figura 4.5: Expresión de RAGE en isquemia. Se muestran fotomicrografías (A-D) de regiones cercanas al core isquémico donde observamos células inmunomarcadas para RAGE. Los recuadros muestran magnificaciones de un sector dentro de las fotomicrografías. La flecha blanca en D señala una célula de morfología tipo microglial inmunomarcada para RAGE. En E se muestra una región del hemisferio contralateral a modo de control. La tinción específica para RAGE se realizó mediante inmunocitoquímica (DAB-níquel). (Barra = 30 μ m). Se muestran cortes de animales 3DPL.

Si bien la morfología de las células inmunopositivas para RAGE resulta ser muy evidente, nos propusimos confirmar el tipo celular en el que se expresa RAGE realizando ensayos de inmunofluorescencia de doble marcado utilizando a GFAP como marcador astrogial y enolasa específica de neurona (NSE) como marcador neuronal (Persson y col., 1987; Ahmad y col., 2012). Observamos que efectivamente RAGE se expresa tanto en células inmunopositivas para GFAP como para NSE a 3DPL (Figura 4.6). Nuevamente destacamos que la inmunomarcación para RAGE solo es detectada en sectores cercanos a la lesión isquémica. Observamos además células inmunopositivas para RAGE que parecen estar infiltrando desde la periferia (Figura 4.6).

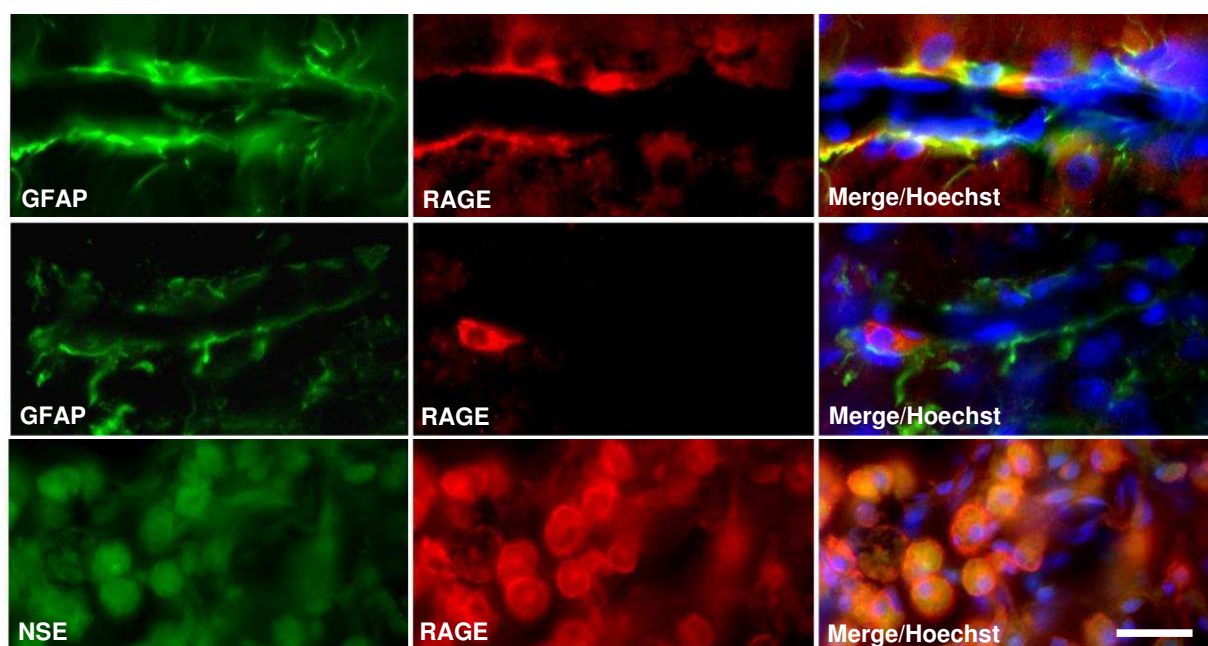


Figura 4.6: Expresión de RAGE en isquemia. Se muestra fotomicrografía obtenidas en microscopio confocal de regiones cercanas al core isquémico donde observamos células inmunomarcadas para RAGE (rojo). En la fila superior y media se observan además células inmunomarcadas para GFAP (verde) mientras que en la inferior se observan células inmunomarcadas para NSE. La última columna muestra las respectivas colocalizaciones junto con la tinción nuclear de Hoechst (azul). (Barra = 15µm). Se muestran cortes de animales 3DPL.

Activación de NFκB en el tejido isquémico

Ya que el efector genérico para RAGE parece ser el factor de transcripción NFκB, nos propusimos evaluar la activación de este factor en la zona de la lesión isquémica. Para estudiar la activación de NFκB realizamos ensayos de inmunohistoquímica utilizando un anticuerpo monoclonal que reconoce la señal de localización nuclear de este factor de transcripción. Dicha señal, que funciona como antígeno, solo puede ser detectada cuando el inhibidor IκB es fosforilado y degradado por el proteosoma, dejando expuesta la NLS de NFκB. Si bien encontramos cierto nivel de marca basal en regiones no afectadas por la isquemia (ver tejido control en figura 4.8 D), observamos que a las 6 h luego de inducida la

lesión hay células con marca más intensa para p65-NLS (Figura 4.7). Por su morfología, estas células parecen ser principalmente neuronas.

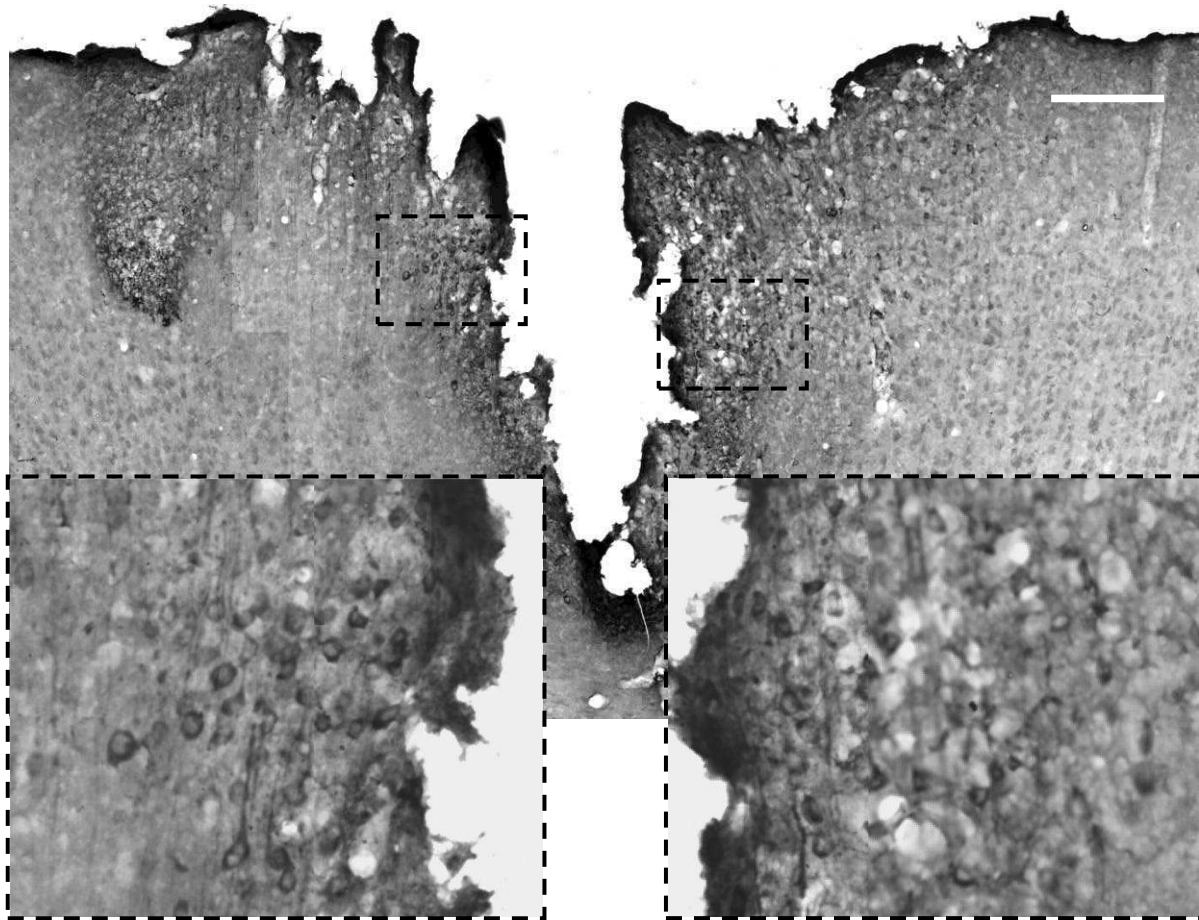


Figura 4.7: Activación de NF κ B en el tejido isquémico a 6 horas de inducida la lesión. Se muestra una representación de la lesión completa lograda por fotocomposición de fotomicrografías de bajo aumento. Los recuadros inferiores son una magnificación de dos regiones limitantes al core isquémico donde se observan células inmunopositivas para p65-NLS. La tinción se realizó mediante inmunohistoquímica (DAB-niquel). (Barra = 500 μ m).

Mostramos previamente que la mayor expresión de RAGE ocurre a 3DPL, por lo tanto sería esperable que la activación de NF κ B, si es dependiente de RAGE, siga un perfil temporal similar. Efectivamente, utilizando la misma metodología, encontramos un máximo de células inmunomarcadas para p65-NLS (Figura 4.8) a 3DPL. En este punto temporal encontramos también células con morfología astrogliar además de neuronas. Realizando ensayos de inmunofluorescencia logramos evidenciar células inmunopositivas para el receptor RAGE muy cercanas al core isquémico que además presentan una marcación nuclear para la subunidad p65 de NF κ B (Figura 4.8).

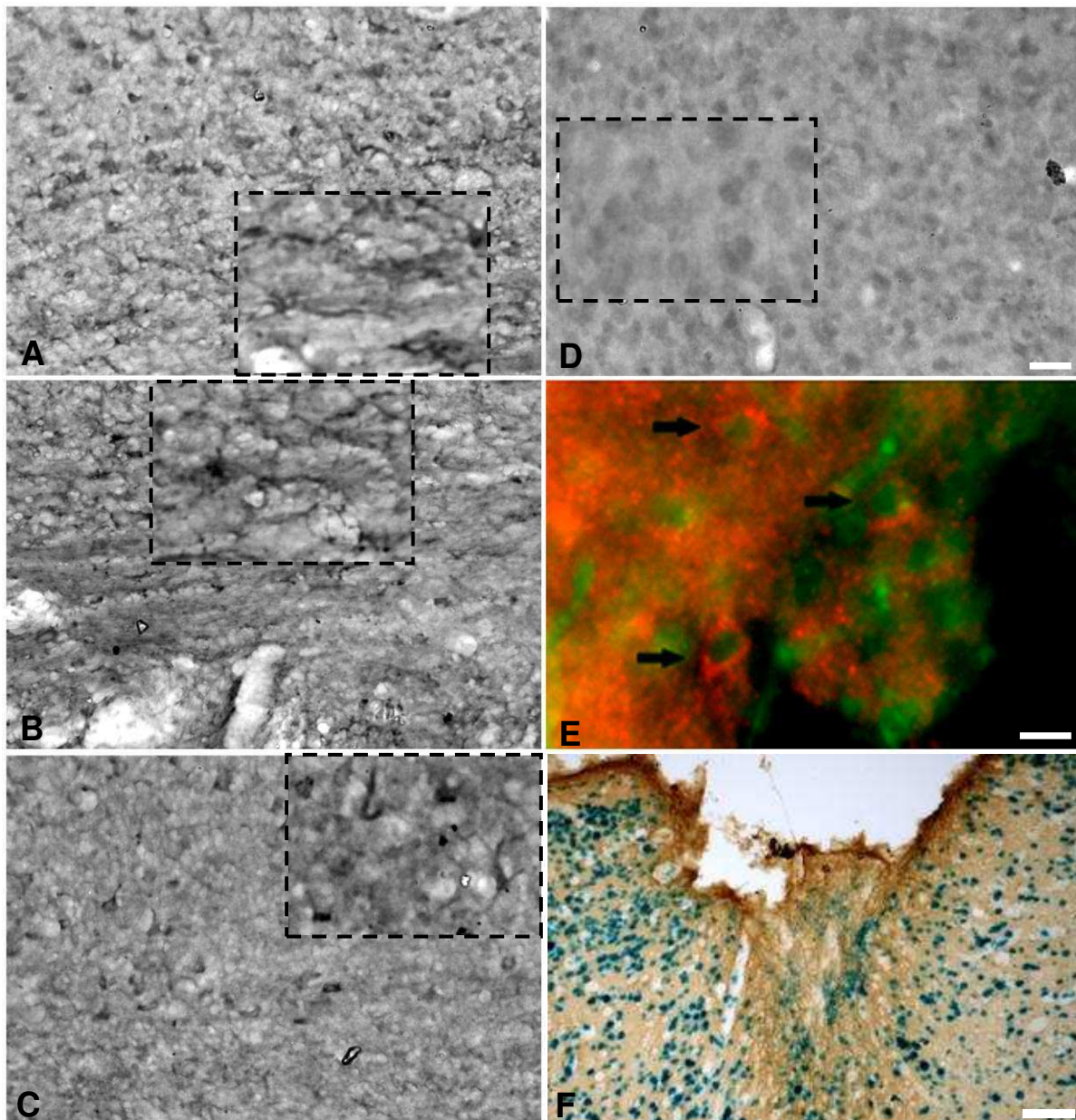


Figura 4.8: Activación de NFκB en la isquemia. Las imágenes son fotomicrografías de células positivas para p65-NLS cercanas a la lesión isquémica (A-C) y en tejido no afectado (D). Los recuadros muestran magnificaciones de un sector de las fotomicrografías. La tinción se realizó mediante inmunohistoquímica (DAB-níquel). (Barra = 30μm). La fotomicrografía E muestra inmunomarcación par RAGE (rojo) y p65 total (Verde) y las flechas negras señalan células positivas para RAGE con marca nuclear para p65 en los bordes de la lesión. (Barra = 15μm). La fotomicrografía F muestra la tinción histoquímica para evidenciar actividad de la enzima β-GAL en la zona de lesión isquémica en el ratón transgénico NFκB-LacZ (Barra = 100 μM).

Si bien la morfología celular es clara, debido a que el tejido requiere de un procesamiento especial que requiere de recuperación antigénica seguido de inmunohistoquímica revelado con DAB y aumentado con níquel (ver protocolo de recuperación antigénica en materiales y métodos), nos fue imposible realizar

colocalizaciones con marcadores específicos para lograr dilucidar definitivamente el tipo celular donde NF κ B se ve activado.

En el estudio llevado a cabo por mi director en (2004) se mostró el perfil de liberación de S100B en el modelo de isquemia por devascularización cortical utilizado en esta tesis. En dicho trabajo se observó que los astrocitos reactivos con mayor sobreproducción de S100B se encuentran limitando al core necrótico y que (además de la liberación pasiva desde astrocitos necróticos) la liberación de S100B también ocurre en forma activa desde astrocitos cercanos a la lesión y es susceptible a ser regulada por agentes farmacológicos. Más recientemente se ha propuesto que S100B se comporta como DAMP por su capacidad de activar a la microglía y a células endoteliales (Sorci y col., 2010).

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en la primera parte de este trabajo de tesis, en cuanto a la expresión de RAGE y activación de NF κ B, y considerando que RAGE es el receptor de S100B, nos propusimos analizar si S100B es capaz de modular la sobrevivencia neuronal y si, además, puede promover la activación de astrocitos. Para estudiar en forma aislada los efectos de S100B sobre los distintos tipos celulares, realizamos estudios *in vitro* utilizando cultivos primarios de neuronas o astrocitos corticales.

4.2 Efectos de S100B sobre neuronas corticales expuestas estrés por excitotoxicidad

En la sección anterior de resultados mostramos nuestras observaciones en cuanto a la respuesta celular a un daño isquémico causado por devascularización cortical. En esta sección nos propusimos analizar si S100B puede modular el destino neuronal en una situación que simule el microambiente generado por la lesión.

Comentamos en la introducción que, luego de un episodio isquémico, los niveles extracelulares de glutamato se ven significativamente aumentados. Mediante un proceso conocido como excitotoxicidad, el glutamato es capaz de generar muerte neuronal y se considera que es uno de los responsables de propagar el daño hacia la penumbra (Olney y col., 1970 y 1971; Hutchins y col., 1998). En esta sección nos propusimos estudiar si S100B tiene efectos sobre las neuronas corticales y si estos efectos cambian luego de una exposición a niveles excitotóxicos de glutamato. El protocolo experimental que utilizamos (Figura 4.9) intenta reproducir el microambiente al cual las neuronas se ven expuestas en la penumbra isquémica y la posterior llegada de niveles incrementados de S100B.

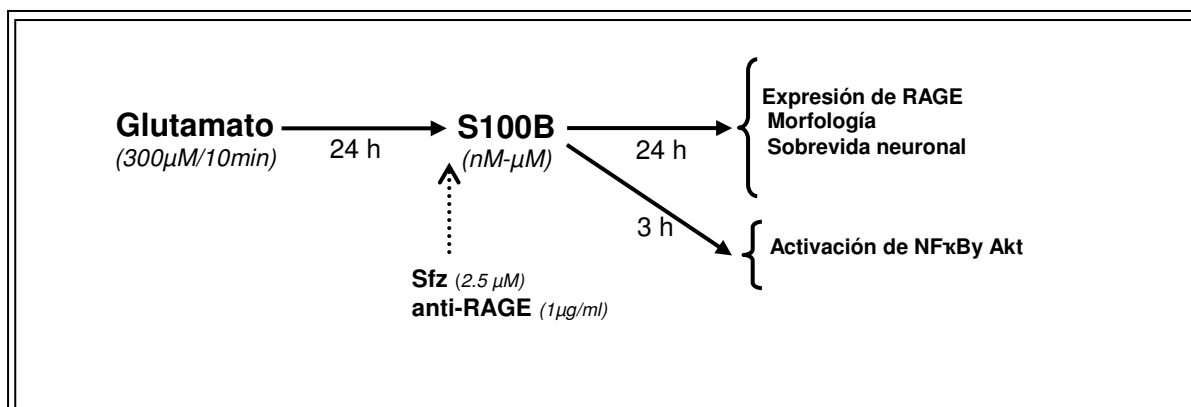


Figura 4.9: Diseño experimental para el tratamiento de cultivos primarios de neuronas corticales.

Neuronas en estadio de 7DIV fueron tratadas con glutamato (300 μ M) durante 10 min. Luego de 24 h los cultivos son expuestos a diferentes dosis de S100B por 3 o 24 h según el tipo de análisis. Luego del tiempo de exposición a S100B las células fueron fijadas para inmunofluorescencia o colectadas para inmunoblot

S100B promueve la muerte o sobrevida neuronal y extensión de neuritas en forma dosis y RAGE dependiente

En primer lugar estudiamos la expresión de RAGE en neuronas control y expuestas a glutamato 300 μ M por 10 min y posteriormente a S100B por 24 h mediante ensayos de inmunoblot. Observamos un aumento de la expresión de este receptor en neuronas expuestas a glutamato y que dicha expresión se ve potenciada por una posterior exposición a S100B. Más aún, la dosis de 7.5 μ M de S100B es capaz de inducir un aumento en la expresión de RAGE incluso en neuronas no expuestas a glutamato (Figura 4.10).

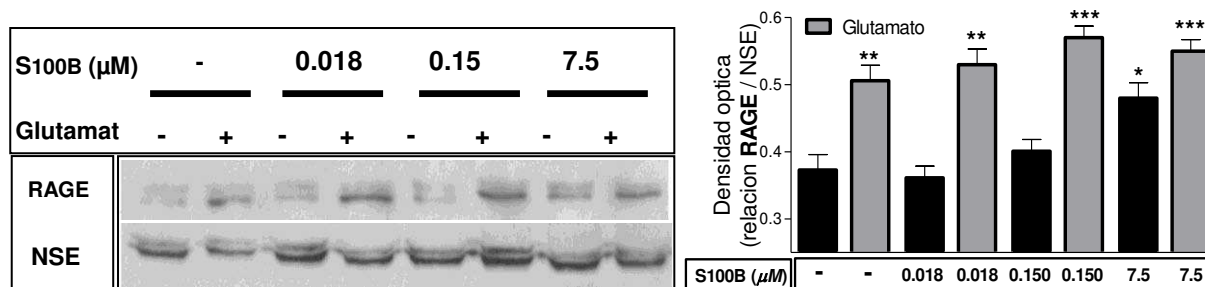


Figura 4.10: Expresión de RAGE en neuronas expuestas a Glutamato y S100B. Neuronas expuestas o no a glutamato y a S100B fueron procesadas para ensayos de inmunoblot. Se muestra un blot representativo de los resultados. Se utilizó NSE como control de carga. El gráfico muestra la cuantificación de densidad óptica de cada banda obtenida para RAGE en relación a la banda de NSE correspondiente. Las diferencias entre tratamientos fueron evaluadas por ANOVA de una vía seguido de Student-Newman-Keuls post-test. Los asteriscos señalan diferencias respecto del control (no glutamato/ no S100B): * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

Esto indicaría por un lado que S100B es capaz de inducir la expresión de su propio receptor RAGE y por otro lado que la previa exposición a glutamato aumentaría la capacidad de respuesta a S100B por parte de las neuronas ya que expresan RAGE en mayor cantidad. Para comprobar si efectivamente la exposición a glutamato aumenta una respuesta neuronal a S100B, analizamos los efectos de S100B en neuronas expuestas a glutamato cuantificando la sobrevivencia neuronal y el largo de neuritas. Para determinar el requerimiento de RAGE, realizamos ensayos de pérdida de función utilizando un anticuerpo neutralizante que se une al dominio extracelular de RAGE impidiendo la interacción con sus ligandos (Chou y col., 2004).

Tal como era esperable, la exposición a glutamato aumentó en un 40-50% la muerte neuronal y produjo retracción de neuritas (Figura 4.11). Este efecto deletéreo causado por el glutamato fue contrarrestado por la dosis de 0.05 μM de S100B y potenciado por la dosis de 1 μM . El efecto de ambas dosis de S100B en neuronas expuestas a glutamato fue bloqueado por el anticuerpo neutralizante de RAGE, lo que indica la participación de este receptor en los efectos de S100B. En neuronas del grupo control observamos que el bloqueo de RAGE aumentó la muerte celular, aunque este efecto fue revertido por la dosis de 1 μM de S100B. La cuantificación del largo de neuritas mostró que solo la dosis más alta de S100B es capaz de inducir un aumento de esta variable.

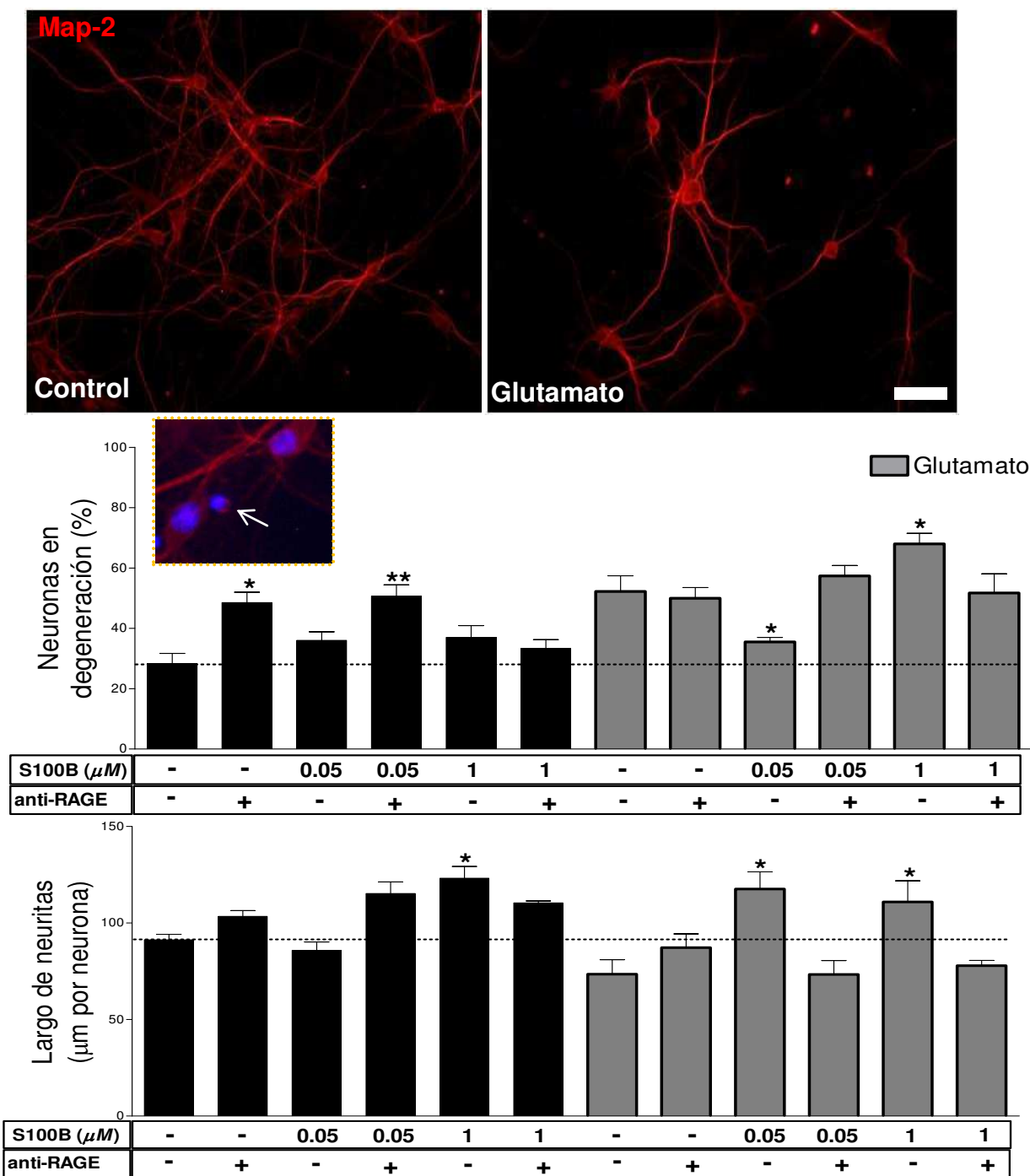
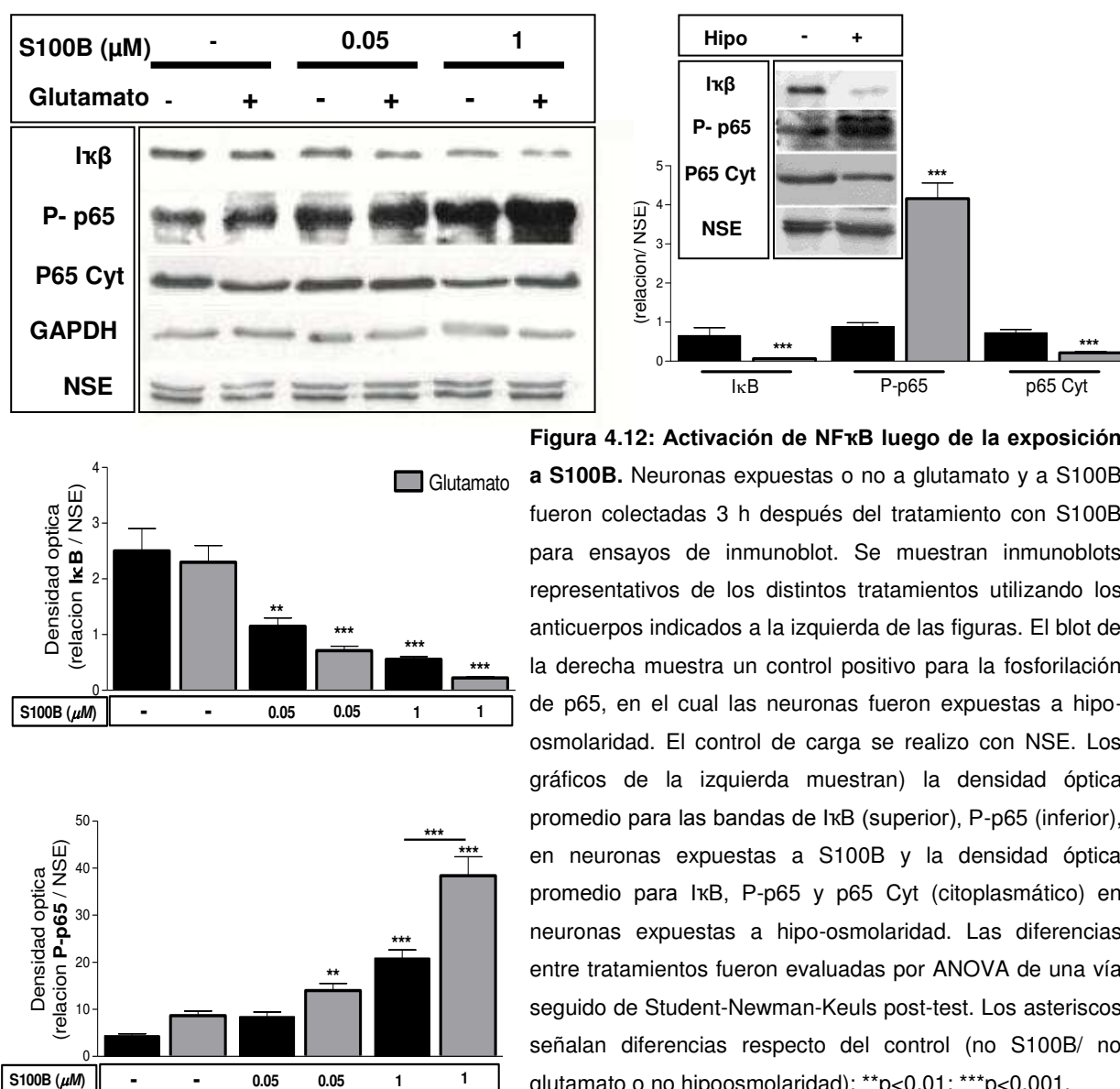


Fig 4.11: Efecto de S100B sobre la morfología y la supervivencia neuronal. Neuronas expuestas o no a glutamato y a S100B fueron procesadas para inmunofluorescencia con anticuerpo para MAP-2. Las fotomicrografías muestran campos representativos de neuronas control y expuestas a glutamato. Las flechas muestran neuronas en estado de degeneración que presentan retracción de neuritas (Barra = 30 μm). El gráfico superior muestra porcentaje de células MAP-2 (+) con núcleo picnótico. Para realizar esta cuantificación los núcleos fueron marcados con Hoechst (en la imagen de mayor aumento la flecha señala una neurona con núcleo picnótico) (Barra = 10 μm). El gráfico inferior muestra la cuantificación del largo total de neuritas por célula MAP-2 (+). Dentro de cada grupo (con o sin glutamato), las diferencias entre tratamientos fueron evaluadas por ANOVA de una vía seguido de Student-Newman-Keuls post-test. Los asteriscos señalan diferencias respecto del control (no S100B): * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

S100B promueve la activación de NF κ B en forma RAGE dependiente

Se ha mostrado en cultivos de neuroblastoma que S100B es capaz de inducir la activación del factor de transcripción NF κ B luego de su interacción con RAGE (Huttunen y col., 1999). Mediante ensayos de inmunoblot analizamos distintos indicadores de la activación de NF κ B como la degradación del inhibidor I κ B, la fosforilación y translocación nuclear de la subunidad p65 (Figura 4.12). Esta subunidad p65 posee dominio de transactivación y está involucrada tanto en la inducción de muerte como en la supervivencia neuronal (Sarnico y col., 2009; Pizzi y col., 2009). En neuronas tratadas con S100B observamos una disminución de I κ B acompañada de un aumento en la fosforilación de la subunidad p65. La fosforilación de p65 se ve potenciada con por la previa exposición a glutamato, siendo mayor para la dosis de 1 μ M de S100B (Figura 4.12). También observamos activación de NF κ B en otro modelo de estrés inducido por exposición a condiciones de hipo-osmolaridad (Ramos y col., 2007) estudiando los mismos indicadores (Figura 4.12).



Observamos que NF κ B resulta más eficientemente activado en neuronas que fueron previamente expuestas a glutamato y que también expresan mayores niveles de RAGE. Luego realizamos un experimento de pérdida de función para confirmar que la activación de NF κ B inducida por S100B está realmente mediada por dicho receptor. Para ello expusimos neuronas control a distintas dosis de S100B por 3 h en presencia del anticuerpo neutralizante del receptor RAGE. Observamos que en estas condiciones sólo la dosis más alta de S100B fue capaz de inducir un aumento significativo en la translocación nuclear de la subunidad p65, y dicho efecto fue bloqueado por el anticuerpo neutralizante (Figura 4.13).

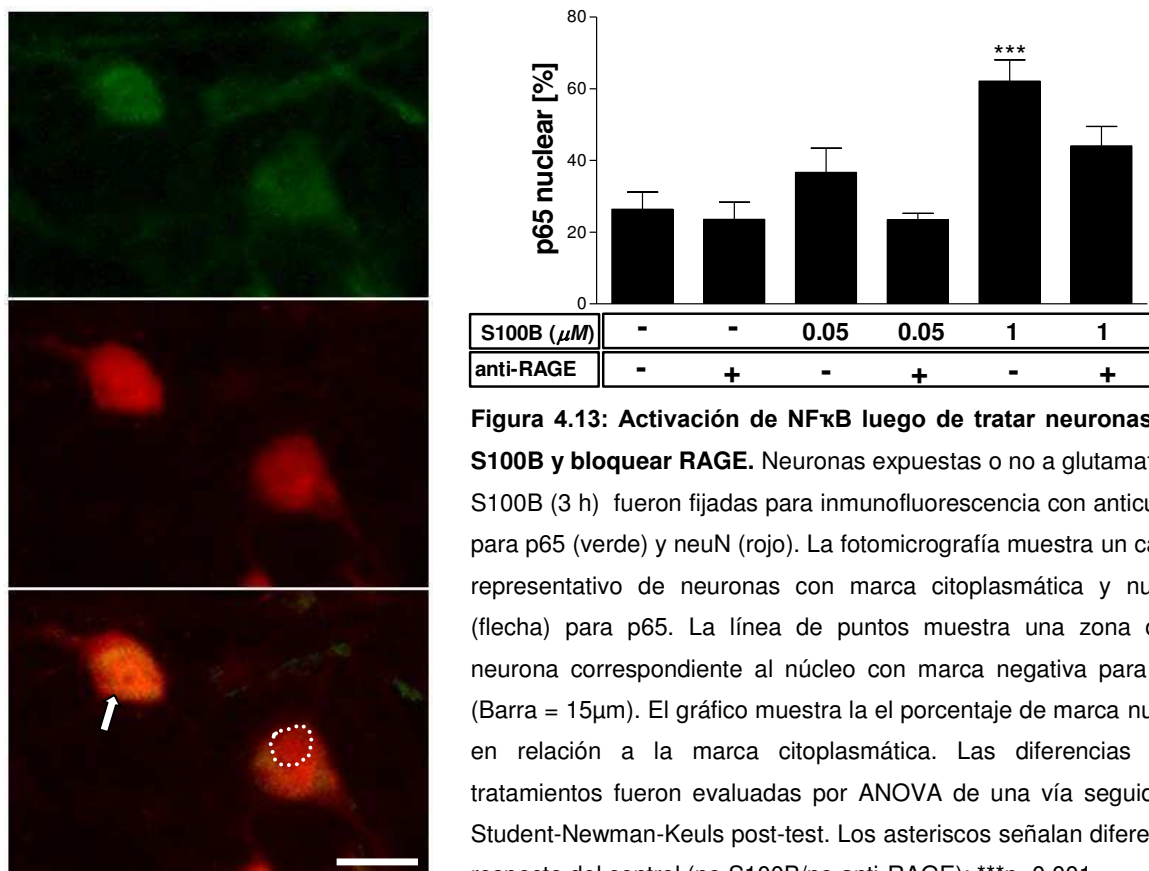


Figura 4.13: Activación de NF κ B luego de tratar neuronas con S100B y bloquear RAGE. Neuronas expuestas o no a glutamato y a S100B (3 h) fueron fijadas para inmunofluorescencia con anticuerpo para p65 (verde) y neuN (rojo). La fotomicrografía muestra un campo representativo de neuronas con marca citoplasmática y nuclear (flecha) para p65. La línea de puntos muestra una zona de la neurona correspondiente al núcleo con marca negativa para p65. (Barra = 15 μ m). El gráfico muestra el porcentaje de marca nuclear en relación a la marca citoplasmática. Las diferencias entre tratamientos fueron evaluadas por ANOVA de una vía seguido de Student-Newman-Keuls post-test. Los asteriscos señalan diferencias respecto del control (no S100B/no anti-RAGE): *** p <0.001.

Se ha propuesto que la vía de NF κ B interacciona con la de Akt promoviendo la sobrevivencia celular (Hussain y col., 2012, Li W. y col., 2012). Mostramos previamente que la dosis de 0.05 μ M de S100B mostró ser protectora, pero según observamos mediante ensayos de inmunoblot, se requiere de la previa exposición a glutamato para que la dosis de 0.05 μ M S100B logre activar a NF κ B. Nos propusimos estudiar si efectivamente S100B es capaz de activar también la vía de Akt. Mediante ensayos de inmunoblot, observamos un aumento de la fosforilación de Akt como consecuencia de la exposición a S100B, siendo este efecto más potente en neuronas expuestas a glutamato (Figura 4.14). Llamativamente, el aumento en la fosforilación de Akt fue independiente de la dosis.

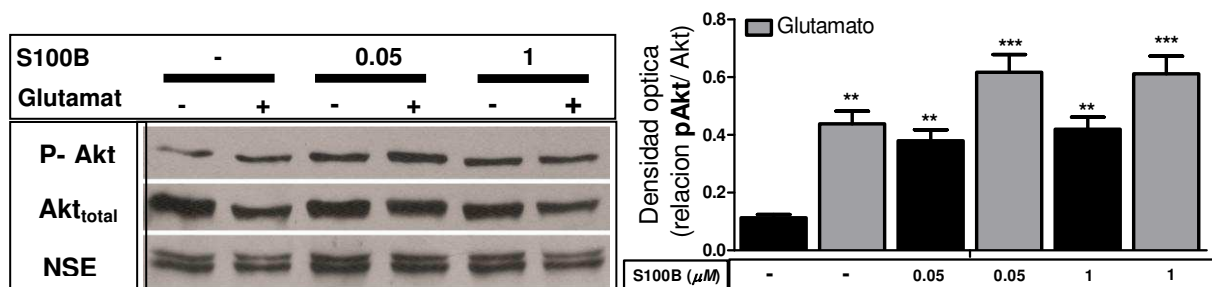


Figura 4.14: Activación de Akt luego de exponer neuronas a S100B. Neuronas expuestas o no a glutamato fueron colectadas 3 h después del tratamiento con S100B para ensayos de inmunoblot. Se muestran blots representativos de los distintos tratamientos utilizando los anticuerpos indicados a la izquierda de las figuras. El grafico muestra la densidad óptica promedio para la banda de Akt fosforilada en relación a Akt total. Las diferencias entre tratamientos fueron evaluadas por ANOVA de una vía seguido de Student-Newman-Keuls post-test. Los asteriscos señalan diferencias respecto del control (no S100B/ no glutamato o no hypo): ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

Hasta aquí nuestros resultados sugieren que los efectos de S100B sobre neuronas están esencialmente mediados por RAGE y que tanto NF κ B como Akt participarían en los efectos de S100B/RAGE.

Para comprobar si efectivamente NF κ B está mediando los efectos de S100B en cuanto a la sobrevida neuronal expusimos neuronas a S100B en el modelo de excitotoxicidad por glutamato, pero esta vez en presencia de un inhibidor farmacológico de NF κ B (sulfasalazina) y evaluamos la sobrevida neuronal luego del tratamiento. Este inhibidor ha sido ampliamente utilizado en distintos modelos experimentales (Jun-Sub y col., 2000; Weber y col., 2000; Boccia y col., 2007).

Observamos que el bloqueo de NF κ B provoca por si solo un masivo aumento en la muerte neuronal (Figura 4.15). Llamativamente, el tratamiento con S100B revierte por completo la muerte inducida por el bloqueo de NF κ B. Mediante estudios de inmunoblot comprobamos que S100B es capaz de inducir activación de NF κ B incluso en presencia de esta dosis del inhibidor (2.5 μ M), aunque como era esperable lo hace en menor medida (Figura 4.15), en concordancia con el descripto requerimiento de NF κ B para la sobrevida neuronal (Bhakar y col., 2002). El tratamiento con glutamato también reduce la sobrevida neuronal en un 60% aproximadamente, pero nuevamente observamos que S100B revierte estos valores, particularmente siendo la dosis de 0.05 μ M la más efectiva en hacerlo. Observamos también que el tratamiento con glutamato resultó protector frente a un posterior tratamiento con Sulfasalazina (Figura 4.15).

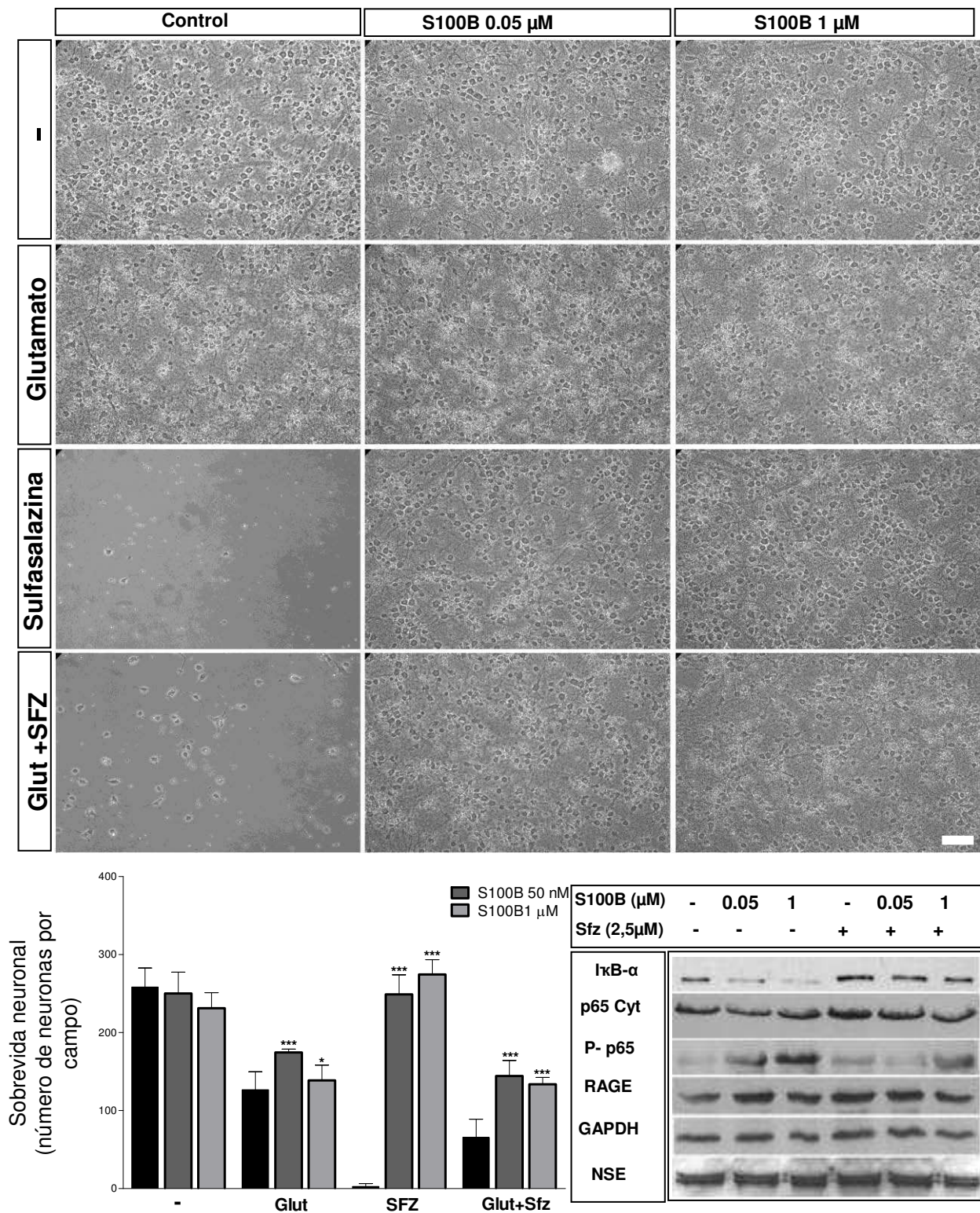


Figura 4.15: Bloqueo de NF κ B seguido de exposición a S100B en neuronas. Se muestran microfotografías de contraste de fase a partir de cultivos neuronales que expuestos o no a glutamato y S100B en presencia de sulfasalazina en la dosis indicada (Barra = 60 μM). El gráfico muestra la cuantificación del número total de neuronas por campo en cada tratamiento. Las diferencias entre tratamientos fueron evaluadas por ANOVA de una vía seguido de Student-Newman-Keuls post-test. Los asteriscos señalan diferencias respecto del control (no S100B/ no glutamato): * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$. Se muestran, además, los resultados de inmunoblot donde se estudió la activación de NF κ B por S100B en presencia de sulfasalazina en neuronas control. Se utilizó GAPDH y NSE como control de carga.

4.3 Efectos de la exposición a S100B en astrocitos corticales

Expresión de RAGE y caracterización de cultivos primarios de astrocitos

En primer lugar realizamos ensayos de inmunofluorescencia utilizando distintos marcadores astrogliales a modo de conocer y caracterizar el fenotipo de astrocitos en cultivos primarios depletados de microglía (Figura 4.16).

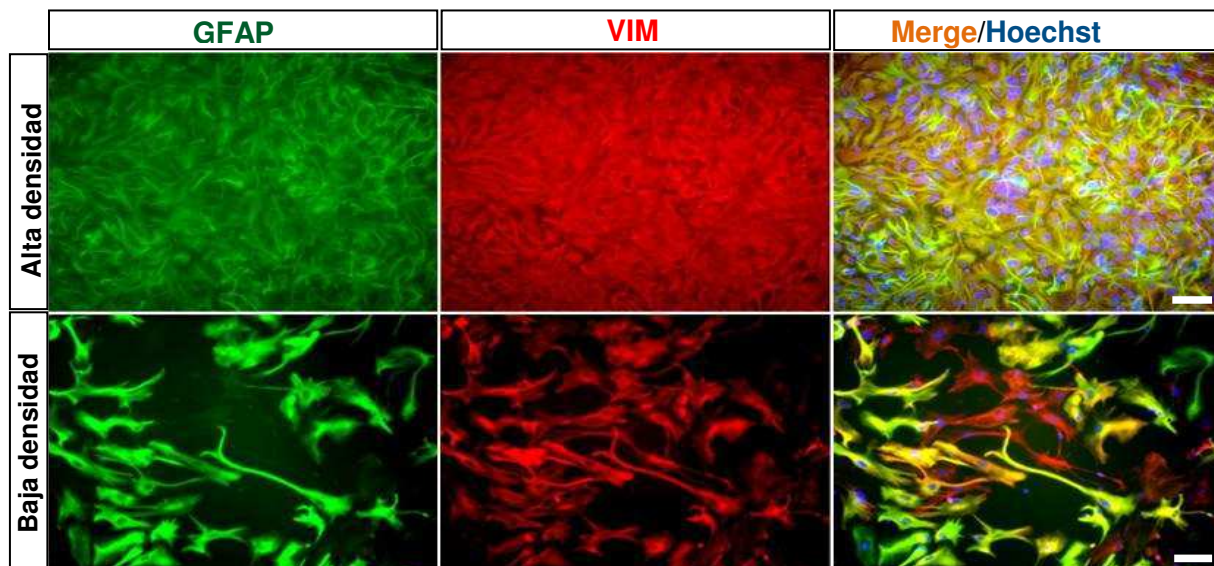


Figura 4.16: Marcadores de astrocitos en cultivos primarios. Se muestran fotomicrografías de cultivos primarios de astrocitos corticales en alta y en baja densidad (Barras=30 μ m y 18 μ m respectivamente). En ambos casos los astrocitos muestran inmunofluorescencia para GFAP (verde) y Vimentina (Rojo). Los núcleos fueron teñidos con Hoechst (azul).

Observamos que los cultivos astrogliales presentan principalmente dos fenotipos extremos: ameboides o filamentosos, así como formas intermedias. Ambas morfologías pueden ser observadas al mismo tiempo en un cultivo pero sus abundancias cambian según la situación. En estado de reposo, los astrocitos presentan principalmente una morfología del tipo poligonal o ameboides, sin embargo, ante ciertos estímulos, los astrocitos adquieren una morfología del tipo filamentosa. Este pasaje de una morfología a otra recibe el nombre de filamentación o *stellation*. Es importante destacar que esta transformación ha sido considerada el correlato morfológico *in vitro* del fenómeno de astrogliosis *in vivo* (Ramakers y col., 1998; Abe y col., 1999; Schmidt-Ott y col., 2001; Park y col., 2006). Al igual que la situación *in vivo*, los astrocitos reactivos en cultivo presentan una morfología del tipo filamentosa, generando así una variable que puede ser medida como índice de respuesta astrogliar (Cassina y col., 2005; Chen y col. 2005; Wanner y col., 2013).

En primer lugar analizamos, mediante ensayos de inmunofluorescencia, la expresión de RAGE en cultivos primarios de astrocitos corticales. Observamos que, a diferencia de los astrocitos *in vivo*, los astrocitos en cultivo expresan RAGE en forma constitutiva e

independiente de su morfología o estado de confluencia (Figura 4.17). Si bien este sistema mantiene ciertas diferencias con la situación *in vivo*, el mismo nos permitió estudiar posteriormente los efectos de S100B sobre astrocitos sin necesidad de un tratamiento previo que induzca la expresión de su receptor o bien la inducción de su expresión a partir de plásmidos.

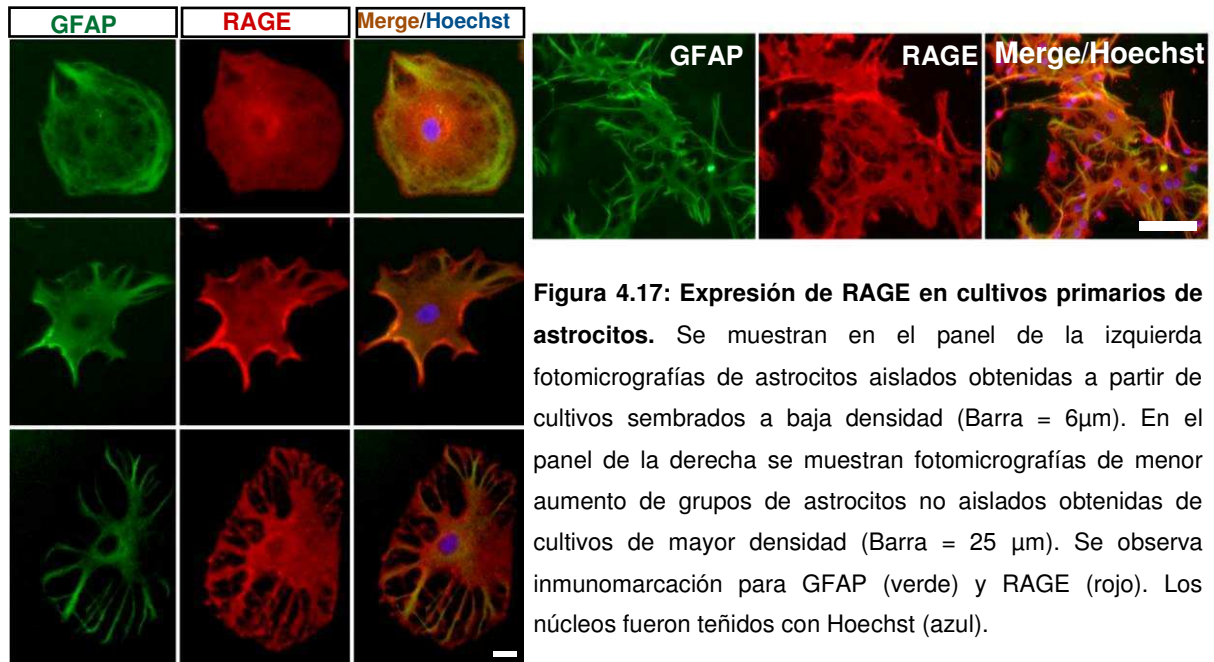


Figura 4.17: Expresión de RAGE en cultivos primarios de astrocitos. Se muestran en el panel de la izquierda fotomicrografías de astrocitos aislados obtenidas a partir de cultivos sembrados a baja densidad (Barra = 6 μ m). En el panel de la derecha se muestran fotomicrografías de menor aumento de grupos de astrocitos no aislados obtenidas de cultivos de mayor densidad (Barra = 25 μ m). Se observa inmunomarcación para GFAP (verde) y RAGE (rojo). Los núcleos fueron teñidos con Hoechst (azul).

A modo de visualizar estos cambios morfológicos *in vitro* y estudiar su correlación con la expresión de distintos marcadores, realizamos ensayos de herida artificial por *scratch wound*. Este daño inducido artificialmente sobre la monocapa de astrocitos provoca que los astrocitos ubicados en los bordes de la lesión se activen y comiencen la invasión hacia del área del *scratch* (Figura 4.18). Observamos que los primeros astrocitos en migrar presentan una baja expresión de GFAP, una alta expresión de vimentina y de RAGE (Figura 4.18). Es notable el predominio de la inmunomarcación para vimentina por sobre la GFAP, evidenciado en estos experimentos por una dominancia del color rojo sobre el verde en forma tiempo dependiente (Figura 4.18). Esto indicaría que los astrocitos reactivos *in vitro* inducidos por el *scratch assay* muestran un fenotipo indiferenciado similar al observado *in vivo*.

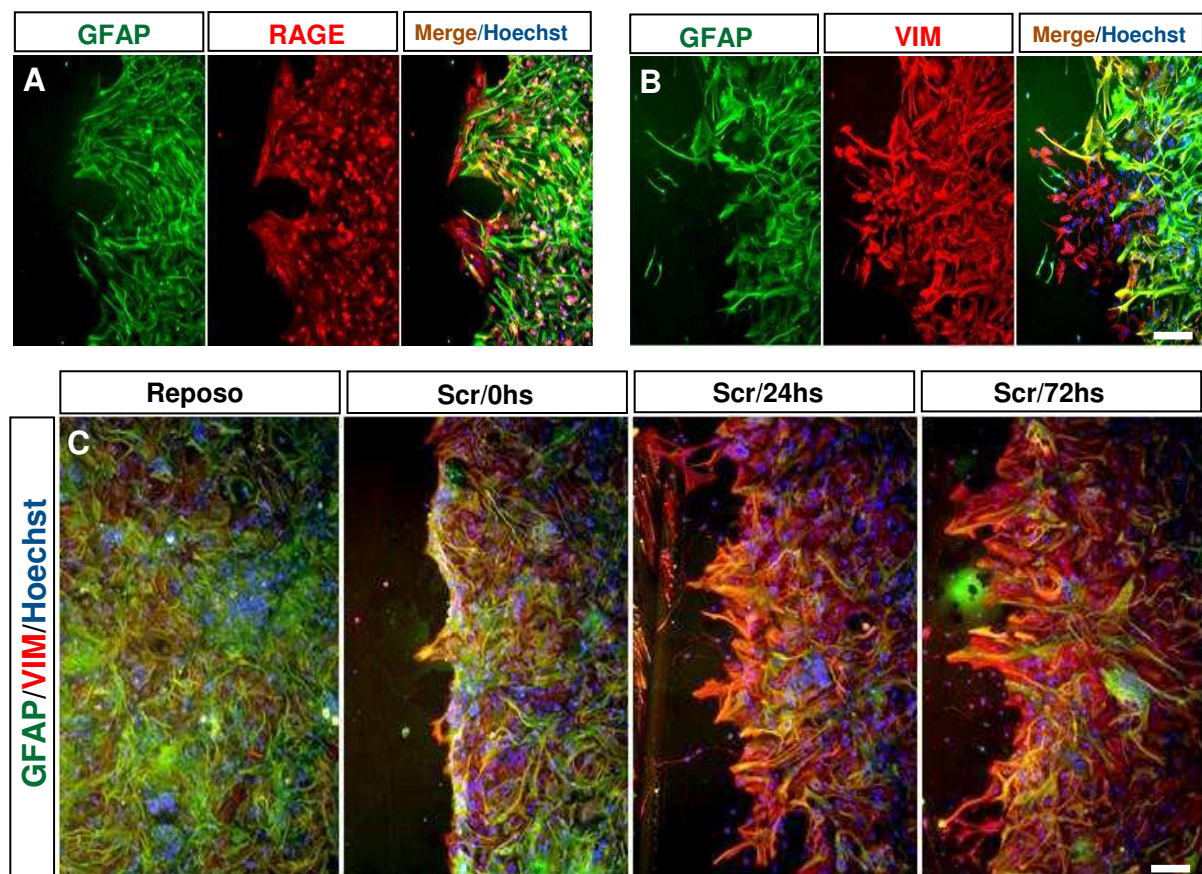
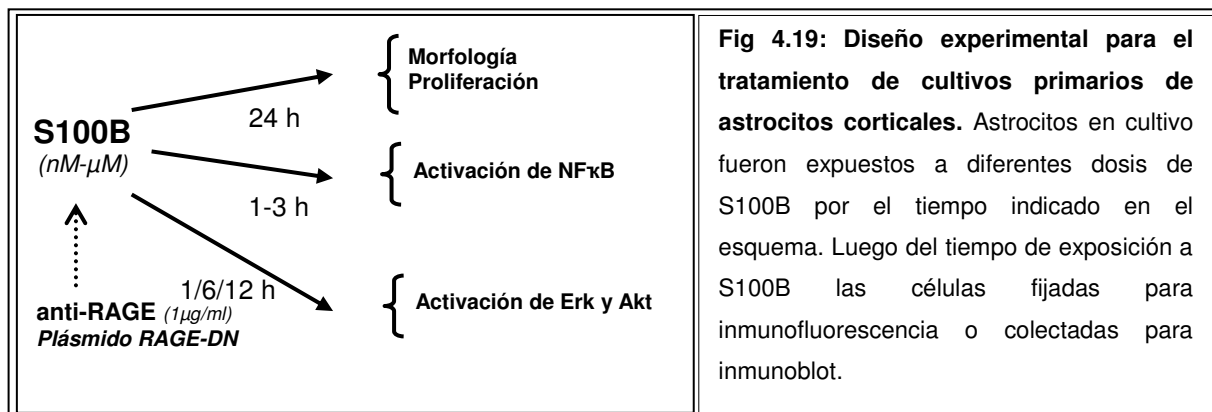


Figura 4.18: Expresión de marcadores astroglicales en respuesta a una injuria mecánica artificial. Se muestran microfotografías representativas de astrocitos en estado de confluencia a los cuales se les aplico una injuria del tipo *Scratch Wound*. Los paneles A y B son cultivos fijados a 24 h luego de inducida la lesión mostrando marcación para GFAP (verde) y RAGE (rojo) o Vimentina (rojo) respectivamente (Barra = 35 μ m). En C se muestra un curso temporal hasta 72hs. Se muestra nuevamente inmunomarcación para GFAP (verde) y vimentina (rojo), aunque corresponde a un experimento independiente de B.

S100B induce cambios en astrocitos hacia un fenotipo reactivo en forma dependiente de RAGE

Con el objetivo de estudiar si un aumento súbito en los niveles de S100B es capaz de inducir cambios en los astrocitos hacia el fenotipo reactivo, expusimos cultivos primarios de astrocitos corticales a S100B en la forma en que se detalla en la figura 4.19. Estos experimentos se diseñaron para evaluar también la dependencia con RAGE de los efectos de S100B utilizando anticuerpos neutralizantes o la sobreexpresión de un DN-RAGE. La activación de cascadas de señalización río abajo de RAGE se evaluó por la activación de NF κ B y de Erk/Akt.



Mediante ensayos de inmunofluorescencia observamos que el tratamiento con las distintas dosis de S100B aumenta la abundancia del fenotipo astrogial filamentoso. Esto se ve acompañado de un aumento en la expresión de GFAP y Vimentina (Figura 4.20).

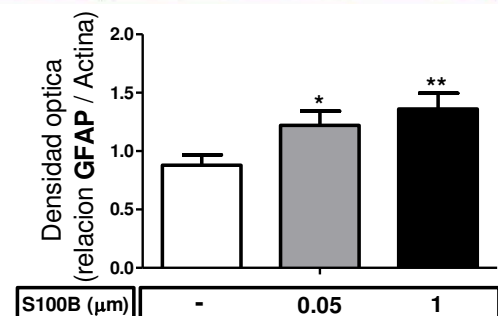
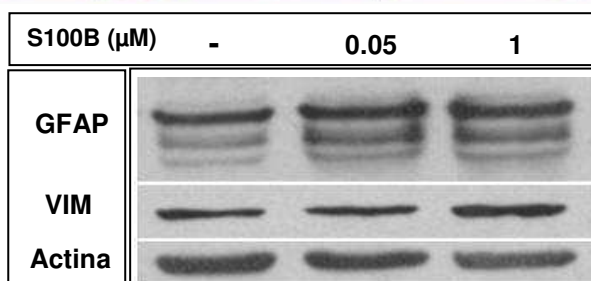
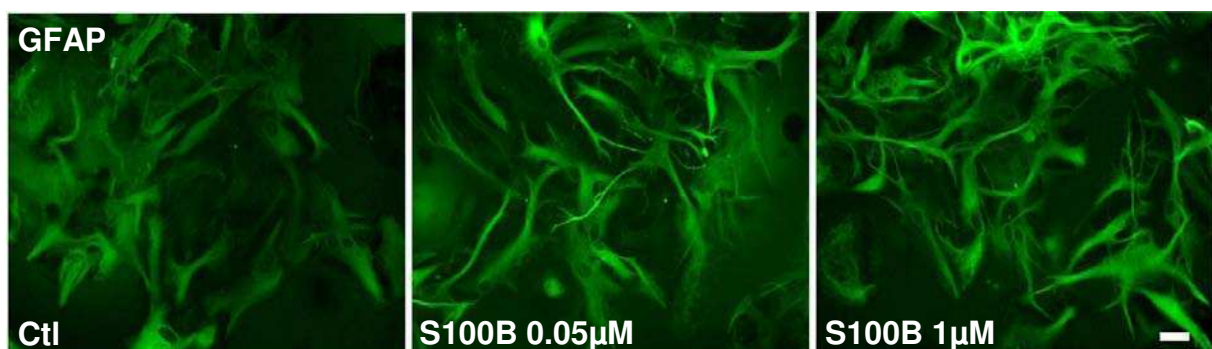
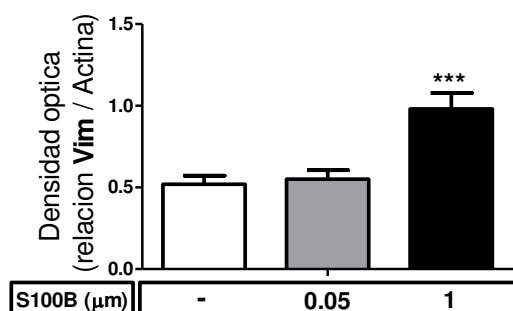


Figura 4.20: Respuesta astrogial a S100B exógeno. Se muestran fotomicrografías representativas de astrocitos expuestos a distintas dosis de S100B donde se observan células inmunopositivas para GFAP (verde). (Barra = 6µm). El inmunoblot muestra los niveles relativos las proteínas GFAP y vimentina en astrocitos expuestos a distintas dosis de S100B. Los gráficos muestran la cuantificación de densidad óptica de cada banda en relación a los niveles de actina correspondientes. Las diferencias entre tratamientos fueron evaluadas por ANOVA de una vía seguido de Student-Newman-Keuls post-test. Los asteriscos señalan diferencias respecto del control (no S100B): * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.



Analizamos también la respuesta de otra población de astrocitos que presentan basalmente una morfología filamentosa con presencia de proyecciones secundarias. El número de estas proyecciones aumenta luego del tratamiento con S100B pero el efecto se ve bloqueado cuando realizamos una preincubación con el anticuerpo neutralizante de RAGE (Figura 4.21).

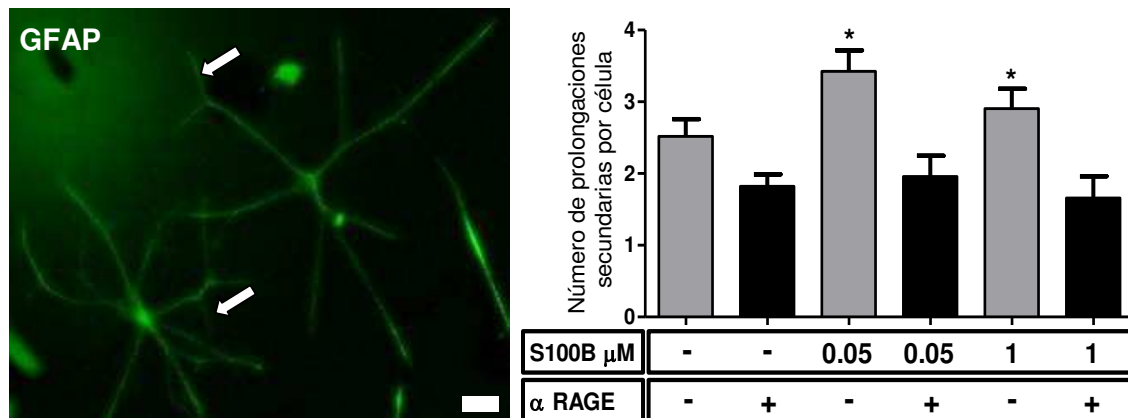


Figura 4.21: Efectos de S100B sobre la morfología astrogliar luego del bloqueo de RAGE. Se muestra una fotomicrografía de un subtipo de astrocitos filamentosos inmunomarcados para GFAP (Barra = 6 μm). El gráfico muestra la cuantificación del número de prolongaciones secundarias (flechas) luego de los tratamientos indicados. Las diferencias entre tratamientos fueron evaluadas por ANOVA de una vía seguido de Student-Knewman-Keuls post-test. Los asteriscos señalan diferencias respecto del control (no S100B): * $p < 0.05$.

Para confirmar los resultados obtenidos con el anticuerpo neutralizante que mostraron el requerimiento de RAGE para la filamentación inducida por S100B, realizamos también otro ensayo de pérdida de función mediante la transfección de astrocitos con un plásmido que codifica para la versión completa de la proteína RAGE (RAGE wt) o bien para la versión que carece del dominio citoplasmático (RAGE Δcyt). Esta versión truncada de la proteína RAGE no tiene la capacidad de iniciar cascadas intracelulares, pero retiene su capacidad de unir a ligando, funcionando así como dominante negativo (ver esquema en la Figura 4.22). En esta situación observamos que la sobre-expresión del dominante negativo, impidió la filamentación inducida por la dosis de 0.05 μM de S100B. Mediante esta técnica, no se logró el bloqueo del efecto de la dosis 1 μM de S100B, probablemente porque la versión truncada se ve saturada, permitiendo en este caso una activación eficiente del receptor endógeno que es muy abundante en los astrocitos en cultivo (Figura 4.22).

Sorprendentemente, la sobreexpresión del wtRAGE no facilitó la filamentación inducida por S100B (Figura 4.22). Estudios posteriores, realizados en el laboratorio e incluidos en Villarreal y colaboradores (2014) demostraron que Cdc42 y Rac1 son las Rho GTPasas activadas por S100B/RAGE y constituyen el paso limitante para la filamentación (Villarreal y col., 2014).

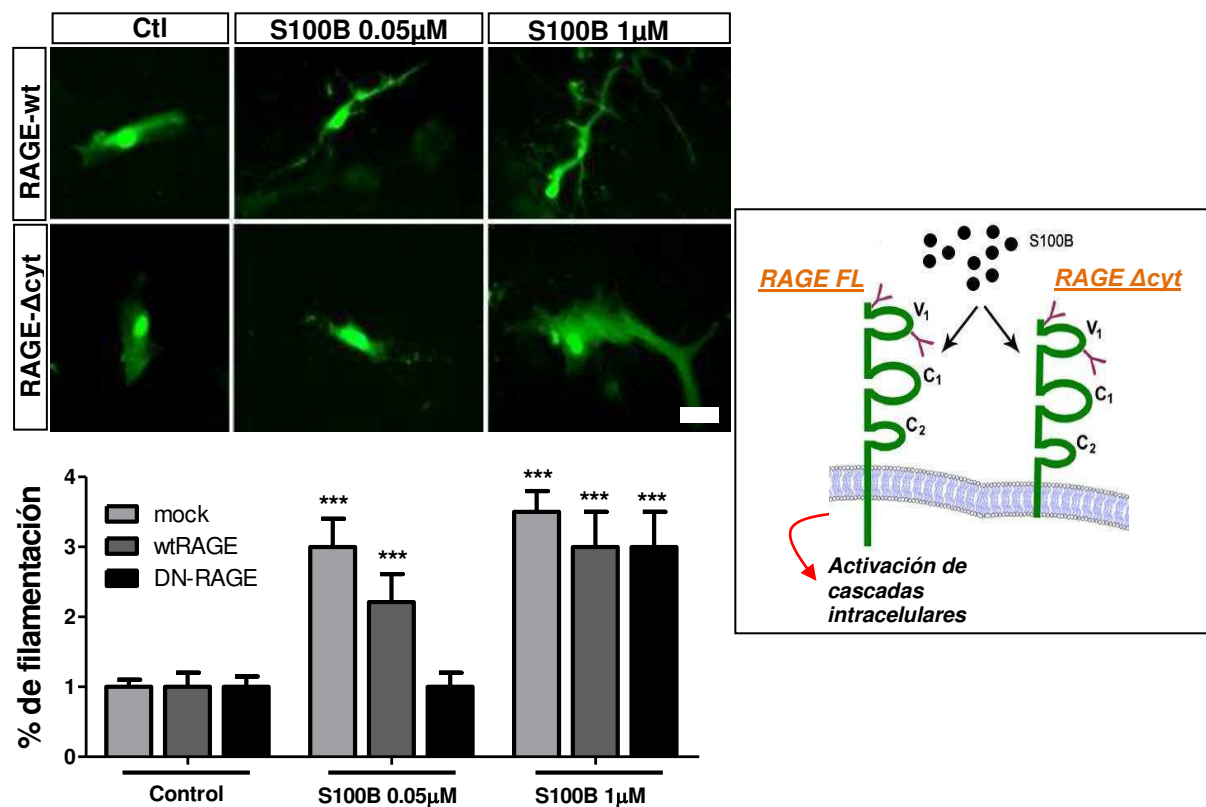


Figura 4.22: Efectos de S100B sobre la morfología de astrocitos que expresan un dominante negativo de RAGE. Se muestran fotomicrografías representativas de astrocitos transfectados con un plásmido bisistrónico que expresa la isoforma completa (FL) de RAGE o su versión truncada (Δ cyt) junto con la proteína verde fluorescente (GFP) para detectar los astrocitos transfectados (Barra = 6μm). El esquema muestra las dos versiones del receptor, su interacción con S100B y la capacidad de cada uno de activar cascadas intracelulares. El gráfico muestra la cuantificación del tipo de morfología observada en los distintos astrocitos transfectados y expuestos a S100B. Las diferencias entre tratamientos fueron evaluadas por ANOVA de una vía seguido de Student-Newman-Keuls post-test. Los asteriscos señalan diferencias respecto del control (no S100B): * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

Otras de las características de la gliosis reactiva *in vivo* es un aumento en la proliferación astrogliar. El efecto mitogénico de S100B había sido descrito en algunos trabajos clásicos de la literatura de S100B (Selinfreund y col., 1991). Nos propusimos estudiar mediante un ensayo de incorporación de BrdU, si la capacidad mitogénica de S100B esta mediada por el receptor RAGE. Observamos que S100B fue capaz de promover un aumento en la incorporación de BrdU en células inmunomarcadas para GFAP y que dicho efecto fue prevenido por el bloqueo de RAGE con el anticuerpo neutralizante (Figura 4.23). Es importante destacar que la incorporación de BrdU es detectada mediante la utilización de un anticuerpo específico, permitiéndonos corroborar que son los astrocitos las células proliferantes mediante un ensayo de colocalización de fluorescencia con la proteína GFAP como se muestra en la fotomicrografía de la figura 4.23.

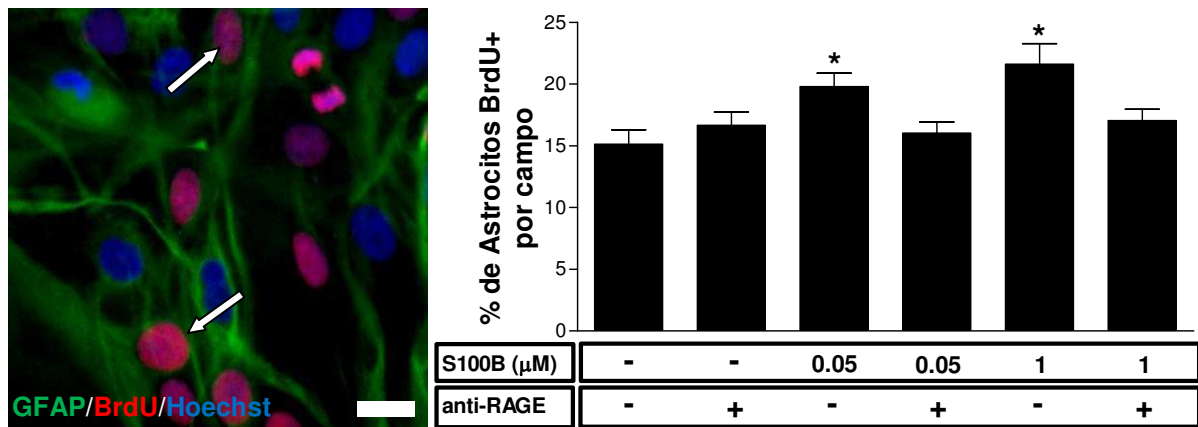


Figura 4.23: Incorporación de BrdU luego de la exposición a S100B. Se muestra una fotomicrografía de la inmunomarcación para BrdU incorporada (rojo) en cultivos de astrocitos positivos para GFAP (verde). Los núcleos fueron teñidos con Hoechst en azul. Las flechas señalan núcleos con inmunomarcación positiva para BrdU. (Barra = 5 μ m). El grafico muestra el porcentaje de células inmunopositivas para BrdU en relación al número total de núcleos. Solo se cuantificaron núcleos de células GFAP inmunopositivas. Las diferencias entre tratamientos fueron evaluadas por ANOVA de una vía seguido de Student-Knewman-Keuls post-test. Los asteriscos señalan diferencias respecto del control (no S100B): * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

In vivo, los astrocitos reactivos tienen la capacidad de formar la cicatriz glial. En el caso de la isquemia cerebral, la zona del core necrótico es rápidamente invadida por astrocitos, efecto que requiere tanto de la migración desde las zonas distales a la lesión como de un aumento de la tasa de división celular. A continuación nos preguntamos si S100B es capaz de favorecer este fenómeno y para eso utilizamos el modelo de *scratch assay* presentado anteriormente. En este caso, luego de inducir el *scratch*, expusimos a los astrocitos a S100B durante 24 h y luego cuantificamos el número de células dentro del *scratch*. Como se observa en la figura 4.24, las células invaden el espacio libre de células incluso en ausencia de S100B, sin embargo, encontramos que el número de astrocitos dentro del *scratch* es mayor cuando realizamos la exposición a S100B (figura 4.24 B), que parece facilitar el proceso de migración. También mostramos en la figura 4.24, que los astrocitos de los bordes del *scratch* presentan prolongaciones del tipo pseudopodios. Dichos procesos están relacionados con el comienzo de la motilidad celular (Zhong y col., 2010).

Estudios posteriores de nuestro laboratorio realizados por la Lic. Rocío Seoane mostraron que la migración de los astrocitos es dependiente de RAGE, Rac1 y Cdc42 al igual que la filamentación.

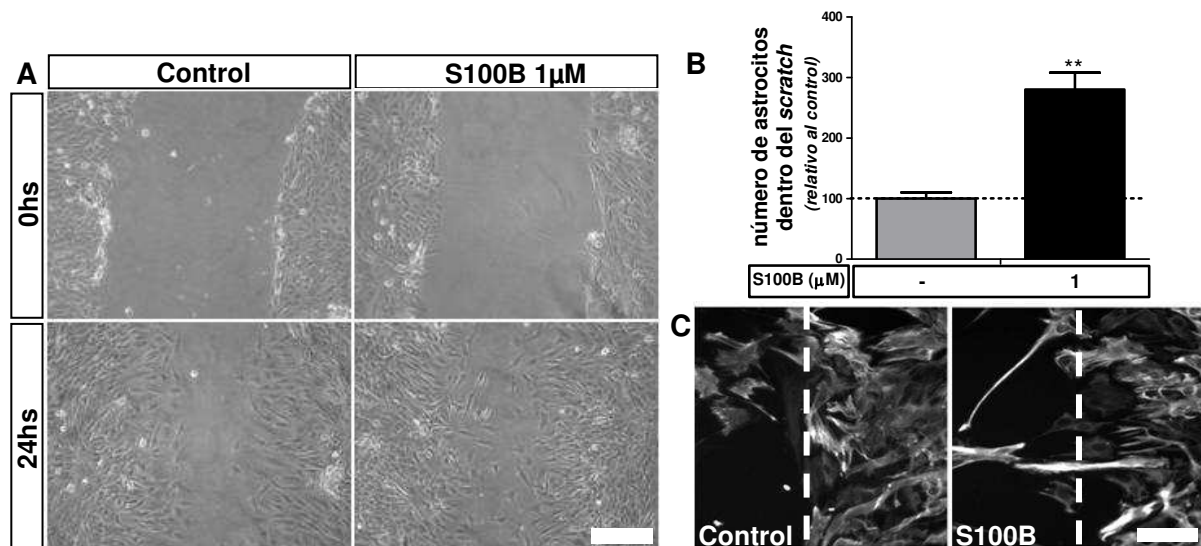


Figura 4.24: Migración de astrocytes expuestos a S100B. El panel A muestra fotomicrografías obtenidas en microscopio invertido de contraste de fase de astrocytes expuestos al modelo de *scratch assay* en presencia o ausencia de S100B. Se muestran imágenes obtenidas inmediatamente luego de inducido el *scratch* y 24 h después (Barra = 60µm). El gráfico B muestra la cuantificación del número de células dentro del *scratch* 24 h después del tratamiento con S100B. Las diferencias entre tratamiento fueron evaluadas mediante un análisis de t-test. Los asteriscos señalan diferencias respecto del control (no S100B): ** $p < 0.01$. El panel C muestra fotomicrografías de células en los bordes del *scratch* (línea de puntos) inmunopositivas para GFAP, 12 horas luego de la exposición a S100B (Barra 25 µm).

S100B promueve la activación de NFκB en forma dependiente de RAGE y dirige el fenotipo astroglial hacia un perfil proinflamatorio

Comentamos en la introducción que la gliosis reactiva es un proceso gradual y continuo, con distintos estadios en el proceso de conversión (Sofroniew et al., 2009). Se ha propuesto que, además de los cambios morfológicos observados, en algún punto de su activación los astrocytes podrían sufrir cambios fenotípicos hacia un perfil proinflamatorio, participando así de la activación de la respuesta inmune innata y promoviendo la inflamación que secundariamente aumenta la muerte neuronal.

Nos propusimos estudiar si efectivamente S100B tiene la capacidad de activar cascadas proinflamatorias en astrocytes. En primer lugar, evaluamos la activación del factor de transcripción NFκB. Para ello, realizamos ensayos de inmunofluorescencia para evaluar la localización nuclear de la subunidad p65 de NFκB. Observamos un aumento significativo de núcleos positivos para p65 a 1 y 3 h luego de estimular con S100B 1 µM (Figura 4.25). Además, observamos una disminución de los niveles de la proteína IκB, siendo su degradación un parámetro de la activación con de NFκB. Por último, el bloqueo de RAGE con el anticuerpo neutralizante, redujo significativamente el porcentaje de núcleos positivos para p65 (Figura 4.25).

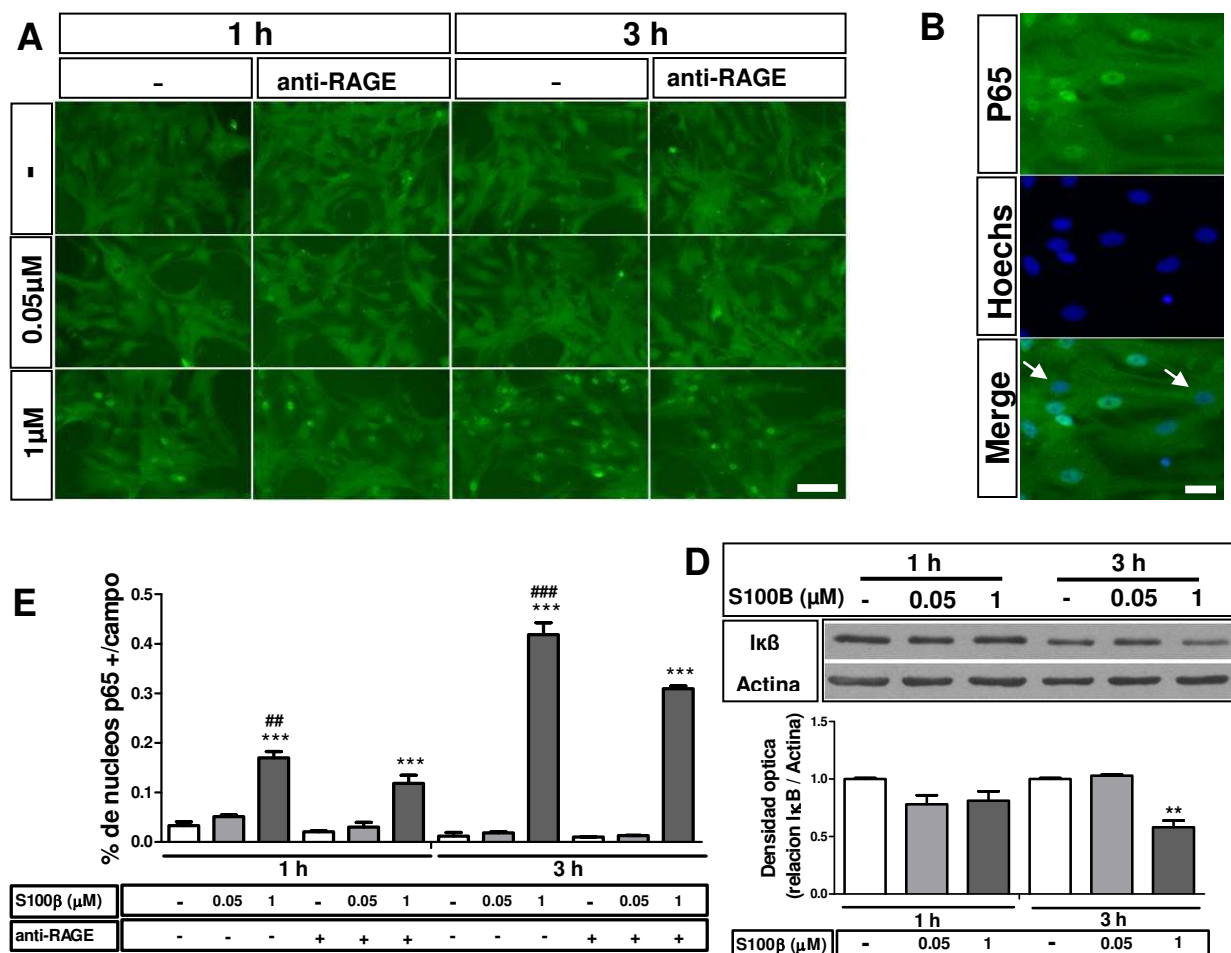


Figura 4.25: S100B induce la translocación nuclear de P65 en forma RAGE dependiente. Se muestran en A fotomicrografías representativas para la inmunomarcación de p65 luego de los tratamientos indicados (Barra = 30μm). En B se muestran fotomicrografías magnificadas donde se observan núcleos positivos (núcleos verdes) y negativos (flechas) para la marca de p65 (Barra = 7μm). El gráfico C muestra la cuantificación del porcentaje de núcleos p65 positivos en relación al número total de núcleos. La figura D muestra el inmunoblot para IκB luego de 3 horas de estimulación con S100B. El gráfico E muestra la densidad óptica promedio para la banda de IκB en relación a Actina. Las diferencias entre tratamientos fueron evaluadas por ANOVA de una vía seguido de Student-Newman-Keuls post-test. Los asteriscos señalan diferencias respecto del control (no S100B) para cada tiempo: **p<0.01; ***p<0.001. El símbolo numeral señala diferencias entre S100B 1μM y S100B 1μM + anti-rage para cada tiempo: ##p<0.01; ###p<0.001.

A continuación, evaluamos mediante ensayos de PCR los niveles de ciertos genes proinflamatorios, que además están regulados por NFκB. Uno de los genes candidatos a evaluar fue la interleuquina 1 beta (IL-1β) ya que se sabe que su expresión es regulada por este factor de transcripción en distintos modelos experimentales, siendo en microglía dependiente de la interacción S100B/RAGE (Cogswell JP y col., 1994; Bianchi y col., 2008). El otro candidato fue el receptor de membrana tipo Toll 2 (TLR2). Se ha mostrado que el gen de TLR2 se induce luego de la estimulación por LPS (lipopolisacárido de origen bacteriano) dado que en su promotor hay secuencias regulatorias para NFκB (Matsuguchi y

col., 2000; Wang T. y col., 2001; Musikacharoen y col., 2001). Dicha inducción del gen de TLR2 se ha observado inclusive en cultivos primarios de astrocitos (Phulwani y col., 2008). Como era de esperar por la eficiente translocación nuclear de NF κ B inducida por S100B, observamos un aumento significativo tanto en los niveles del RNA mensajero de IL-1 β como en los de TLR2 (Figura 4.26).

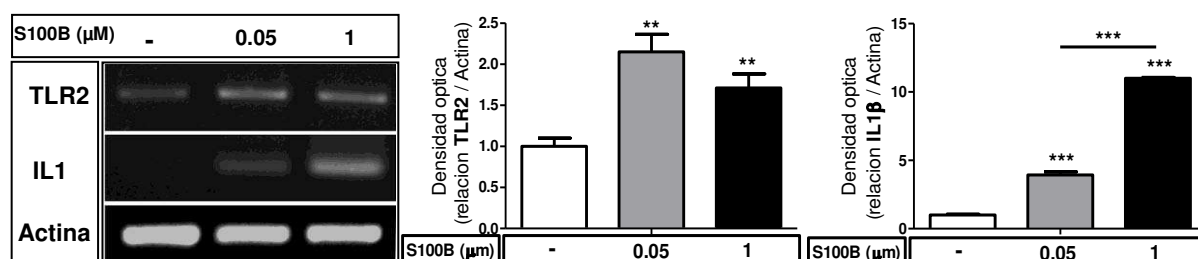
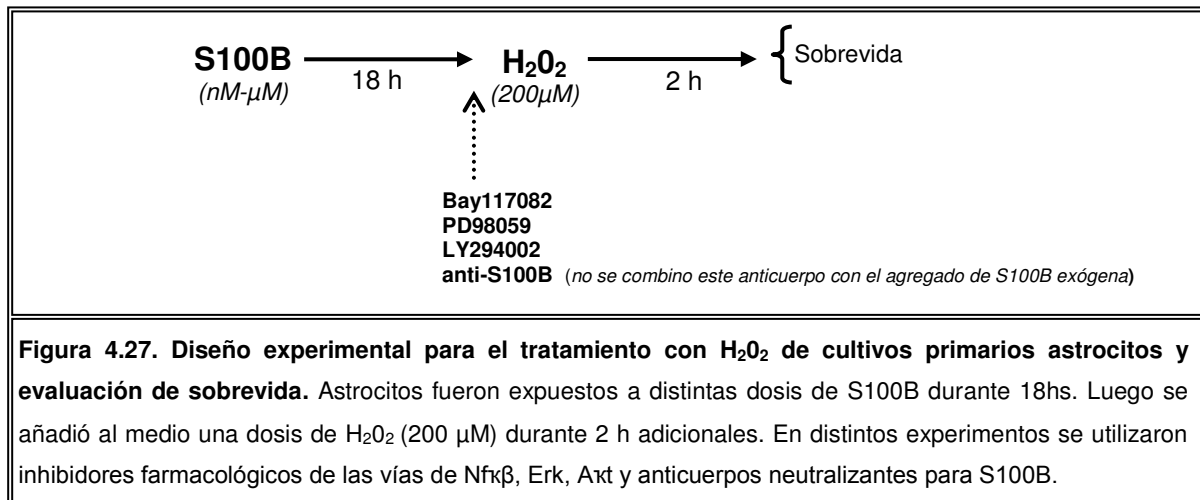


Figura 4.26: Estudio de genes proinflamatorios activados por NF κ B. Astrocitos fueron expuestos a S100B para estudios de PCR. Se muestra el resultado del ensayo de RT-PCR en el panel de la izquierda. Los gráficos muestran la cuantificación de densidad óptica de cada banda de TLR2 o IL1 β en relación a la banda correspondiente de actina. El RNA mensajero total fue extraído luego de 6 h de exposición a S100B. Las diferencias entre tratamientos fueron evaluadas por ANOVA de una vía seguido de Student-Newman-Keuls post-test. Los asteriscos señalan diferencias entre los tratamientos indicados respecto del control (no S100B): ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

S100B promueve la sobrevivencia de astrocitos frente al estrés oxidativo

Ha sido ampliamente demostrado que luego de la isquemia cerebral el tipo celular más susceptible son las neuronas, mientras que los astrocitos no solo sobreviven en la región de penumbra sino que además cumplen funciones muy importantes en la señalización post-isquemia y en el reclutamiento de células proinflamatorias. Claramente existen mecanismos que promueven la sobrevivencia de los astrocitos en este ambiente hostil y nos preguntamos si S100B podría también participar de esta respuesta celular. A diferencia de las neuronas los astrocitos poseen sistemas muy eficientes para la recaptación de glutamato y es por esto que, en lugar de emplear el modelo de excitotoxicidad por glutamato para inducir muerte astrogliol, decidimos utilizar un modelo de estrés oxidativo por exposición de células a peróxido de hidrogeno (H_2O_2). El mismo ha sido ampliamente utilizado tanto en líneas celulares como en cultivos primarios de neuronas y astrocitos (Zhu y col., 2005; Chen y col., 2009; Lu y col., 2010; Zhang Q. y col., 2012; Le y col., 2013; Ramalingam y col., 2014). El H_2O_2 puede penetrar biomembranas y generar acumulación de especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno (Ramalingam y col., 2014).

Para estudiar si S100B puede prevenir la muerte en astrocitos por estrés oxidativo utilizamos el protocolo detallado en la figura 4.27, donde realizamos una preincubación de 18 h con S100B previo al tratamiento con 200 μ M de H_2O_2 durante 2 horas.



Utilizando este protocolo, observamos que el tratamiento con H₂O₂ aumentó significativamente el porcentaje de astrocitos con evidentes signos de degeneración (condensación nuclear, pérdida de prolongaciones) y que el pretratamiento con S100B efectivamente logra un efecto protector frente al H₂O₂ (Figura 4.28).

El siguiente paso fue estudiar cuáles son las vías intracelulares involucradas en la protección por S100B. Sabiendo que S100B efectivamente activa NFκB, realizamos el bloqueo de esta vía con el inhibidor farmacológico BAY117082. Si bien el tratamiento provocó un aumento de la muerte en condiciones basales, no fue capaz de bloquear la protección por S100B (Figura 4.28). Es por esto que decidimos estudiar otras vías que ya habían sido relacionadas con la sobrevivencia en astrocitos al estrés oxidativo como lo son las vías de Akt y Erk_{1/2} (Clark y col., 2011; Xia y col., 2012; Zhang Q. y col., 2012; Hamdi y col., 2012; Ramalingam y col., 2014). Observamos en este caso que el bloqueo farmacológico de las vías de Akt y Erk_{1/2} con los inhibidores LY294002 y PD98059 respectivamente, logró reducir parcialmente la protección por S100B (Figura 4.28). Por último, observamos que la previa incubación con un anticuerpo específico para S100B, reduce la sobrevivencia de astrocitos en cultivos expuestos a estrés oxidativo probablemente por el bloqueo de la S100B endógena liberada por los astrocitos. (Figura 4.28). Esto demuestra que la exposición a S100B facilita la sobrevivencia astrogliar al estrés oxidativo.

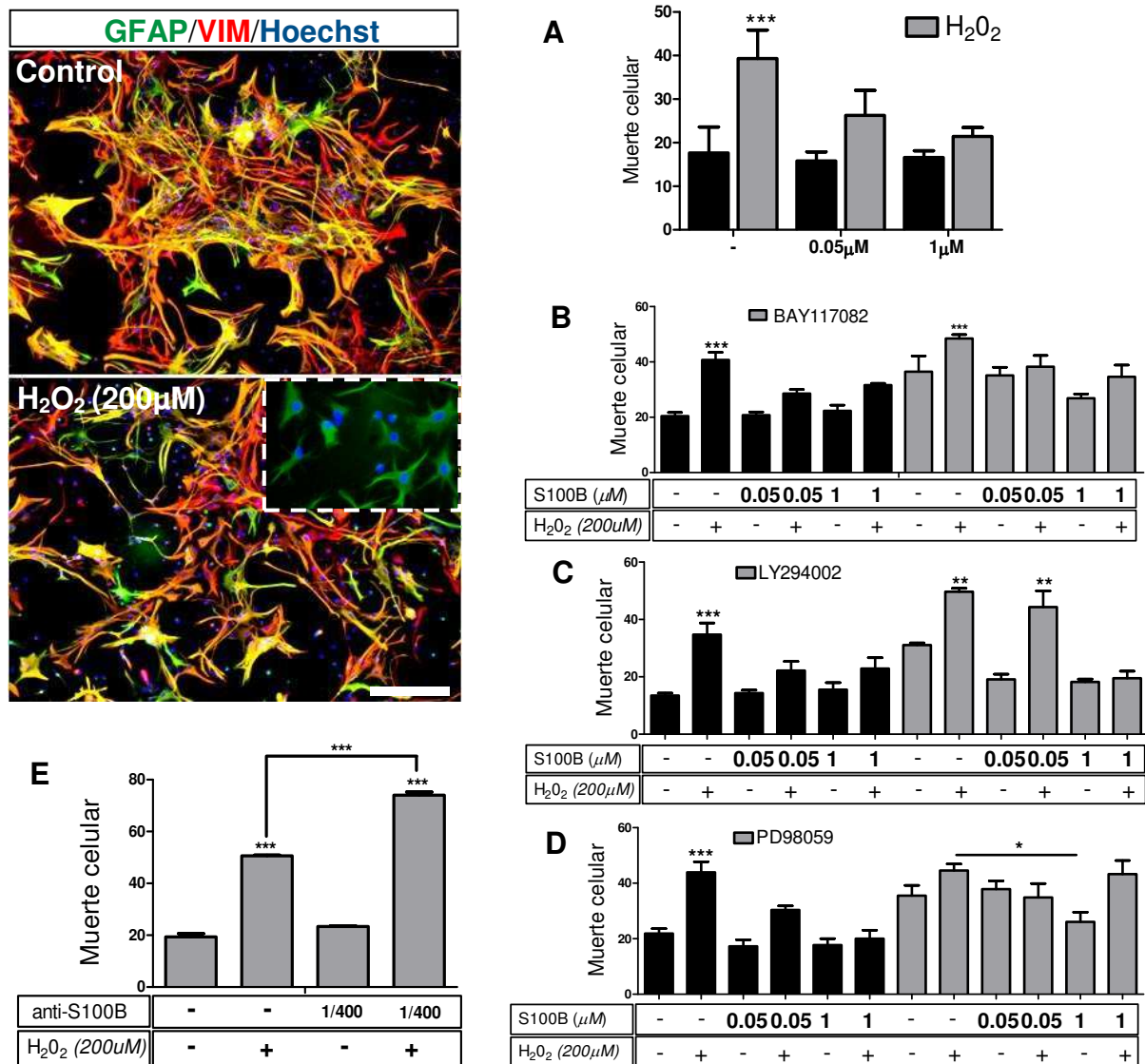


Figura 4.28: S100B promueve la sobrevida de astros expuestos a estrés oxidativo. Se muestran fotomicrografías representativas de astrocitos expuestos a H₂O₂ (2 h / 200 μM) a modo de evidenciar el daño causado. Se observan cultivos de alta densidad con células inmunopositivas para GFAP (verde) y vimentina (rojo). Los núcleos fueron teñidos con Hoechst (Barra = 30 μm). Los gráficos muestran la cuantificación de muerte celular en presencia de H₂O₂ y S100B únicamente (A) o en presencia de H₂O₂ y S100B junto con los inhibidores de las vías NF κ B (B-Bay 117082), Akt (C-LY294002) y Erk_{1/2} (D-PD98059). El gráfico E muestra la cuantificación del experimento donde inhibimos la señalización basal de S100B preincubando con un anticuerpo específico durante 24 h antes del tratamiento con H₂O₂. El porcentaje de células en degeneración se cuantificó según morfología (ver imagen de mayor aumento recuadrada con línea de puntos con marca para GFAP en verde) y presencia de núcleo picnótico. Las diferencias entre tratamientos fueron evaluadas por ANOVA de una vía seguido de Student-Newman-Keuls post-test. Los asteriscos señalan diferencias respecto del control (no S100B) para cada grupo: *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001.

En la figura 4.29 mostramos el resultado de un ensayo de inmunoblot donde se observa que S100B efectivamente puede activar las vías mencionadas en astrocitos estimulando la fosforilación de Akt y Erk_{1/2}.

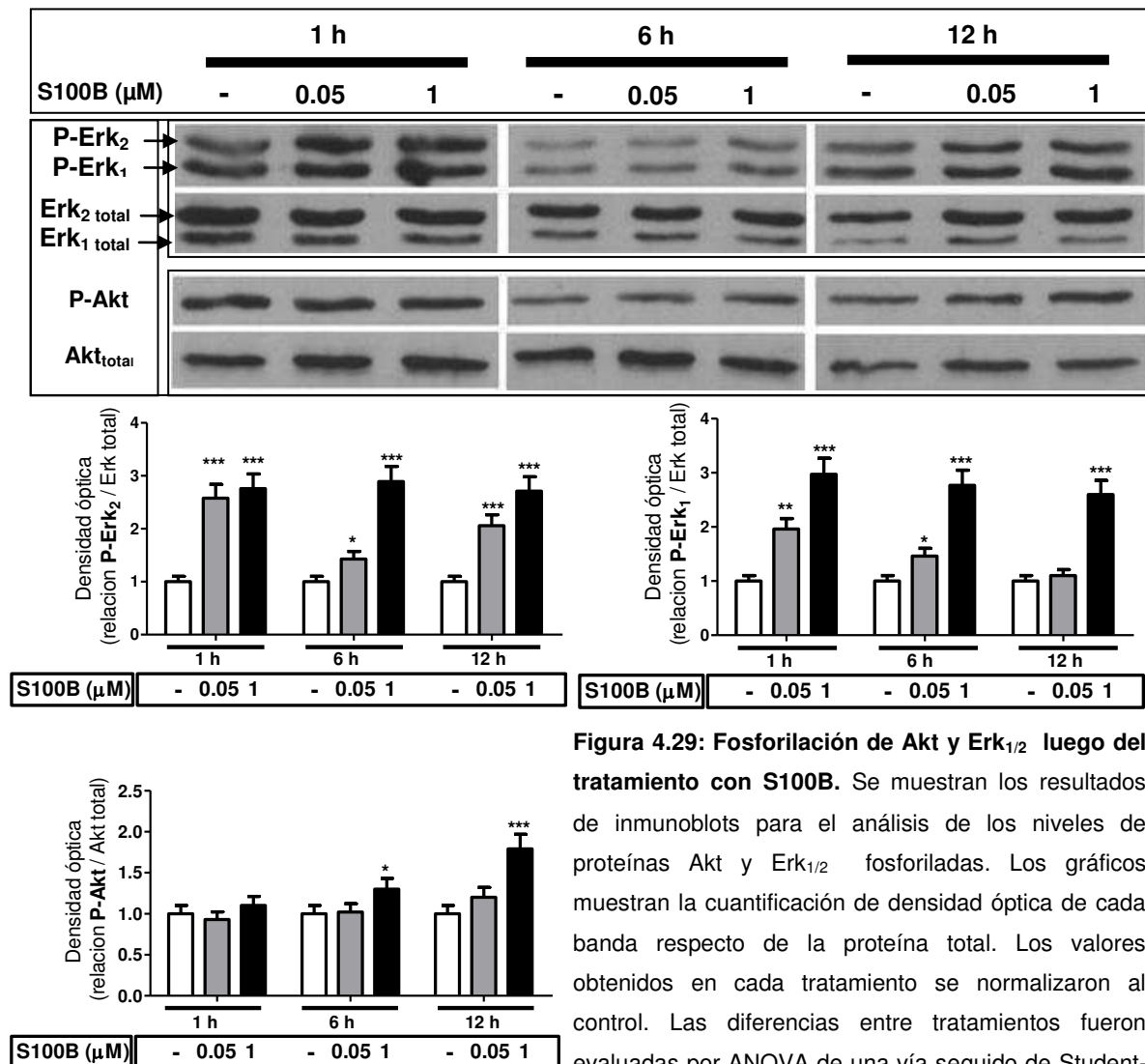


Figura 4.29: Fosforilación de Akt y Erk_{1/2} luego del tratamiento con S100B. Se muestran los resultados de inmunoblots para el análisis de los niveles de proteínas Akt y Erk_{1/2} fosforiladas. Los gráficos muestran la cuantificación de densidad óptica de cada banda respecto de la proteína total. Los valores obtenidos en cada tratamiento se normalizaron al control. Las diferencias entre tratamientos fueron evaluadas por ANOVA de una vía seguido de Student-Newman-Keuls post-test. Los asteriscos señalan diferencias respecto del control (no S100B) para cada tiempo: *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001.

S100B facilita la repuesta astrogliol *in vivo*

Como mostramos en la primera sección de resultados, luego de la isquemia el receptor RAGE también se expresa en astrocitos ubicados en las regiones cercanas a la lesión. Esta misma zona muestra una incrementada la activación de NFκB. Habiendo demostrado *in vitro* que la exposición a S100B induce la conversión de los astrocitos hacia un fenotipo reactivo, nos propusimos evaluar si esto era posible *in vivo*. Para ello realizamos un ensayo de ganancia de función infundiendo directamente S100B en corteza cerebral de animales adultos. Realizamos una única inyección de 1 μl de S100B (50 μM) utilizando coordenadas estereotáxicas como se detalla en materiales y métodos. Como control, inyectamos el mismo volumen de BSA (seroalbumina bovina) como proteína control. Luego de 3 días post inyección, los animales fueron fijados para ensayos de inmunofluorescencia.

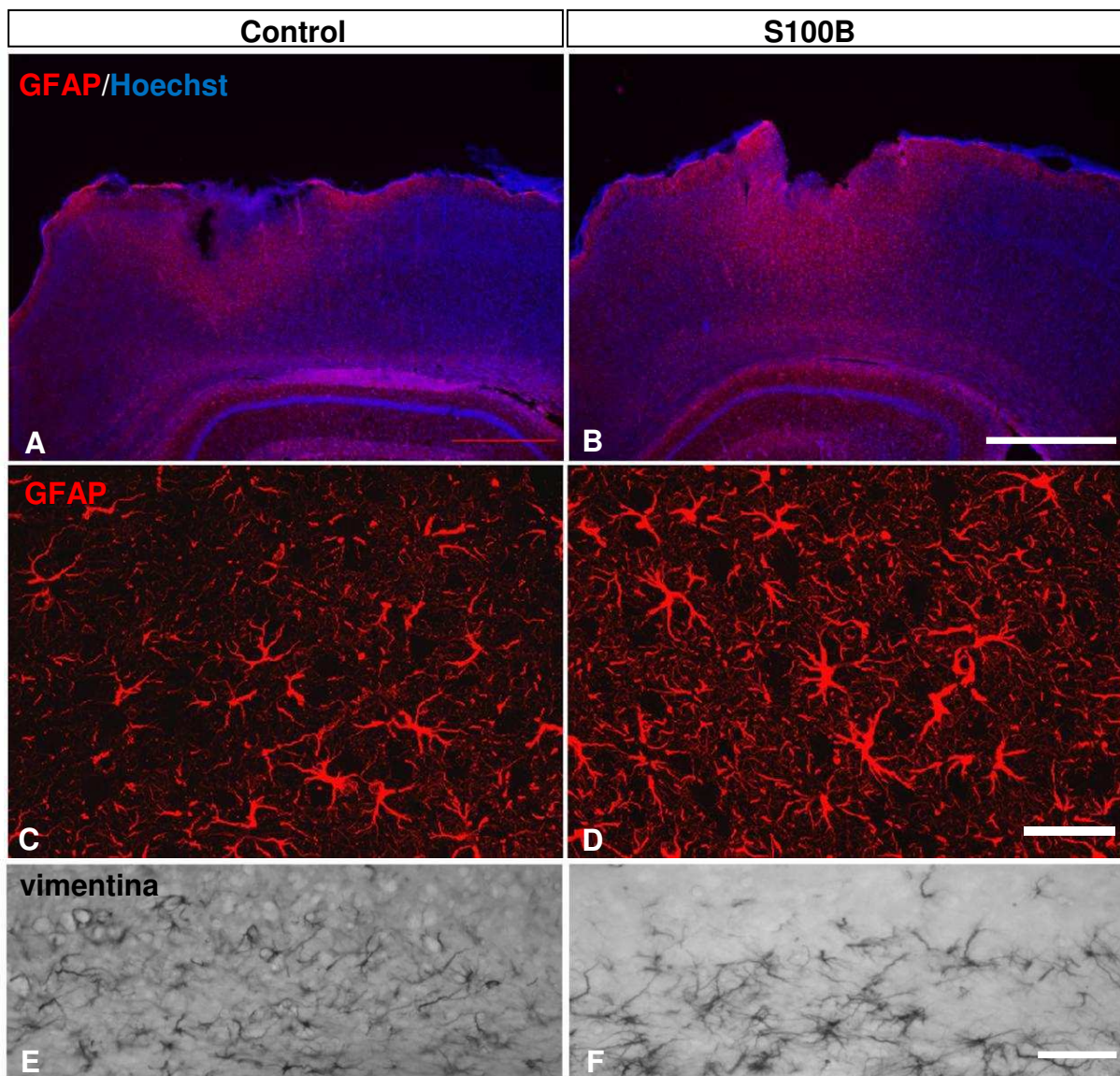
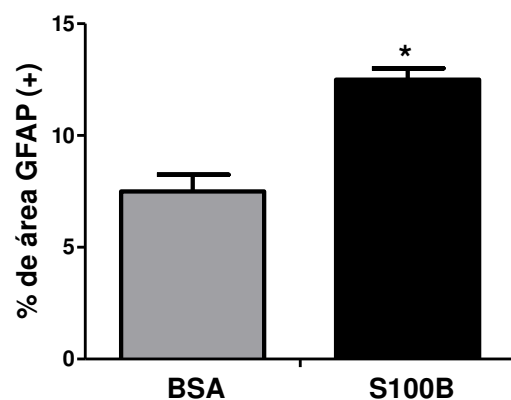


Figura 4.30: Inyección intracortical de S100B. Se muestran fotomicrografías de cortezas cerebrales donde se realizó una única inyección de S100B (A y B). En rojo se observa inmunomarcación para GFAP y en azul se observan núcleos celulares teñidos con Hoechst (Barra = 1000µm). En C y D se muestran imágenes de cortezas afectadas por la inyección de S100B (Barra = 30µm). En E y F se muestran fotomicrografías que corresponden a la región de cuerpo calloso de estos mismos animales donde se evidencian células inmunomarcadas para vimentina mediante inmunohistoquímica (DAB-niuel). (Barra = 30µm). El gráfico muestra la cuantificación del área relativa ocupada por células inmunomarcadas para GFAP. Las diferencias entre tratamiento fueron evaluadas mediante un análisis de t-test. Los asteriscos señalan diferencias respecto del control (BSA): * $p < 0.05$.



Observamos en estos experimentos un aumento de la inmunomarcación tanto para GFAP como para vimentina en animales inyectados con S100B comparados con los controles inyectados con BSA. La figura 4.31 muestra que el receptor RAGE también es detectable en estas condiciones.

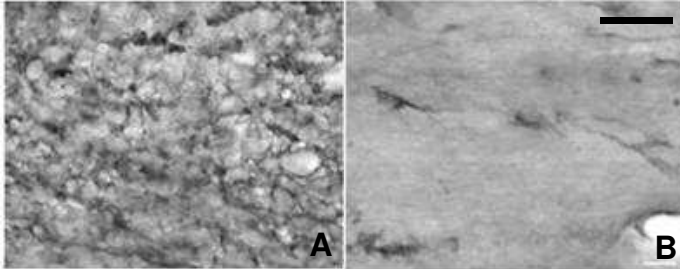


Figura 4.31: Expresión de RAGE luego de la inyección intracortical de S100B. Se muestran microfotografías representativas de células inmunopositivas para RAGE en corteza (A) y cuerpo calloso (B) a 3 días luego de la inyección de S100B. (Barra = 30 μ m).

Concluimos que el aumento súbito, localizado de S100B en el parénquima cerebral es capaz de inducir gliosis reactiva con un aumento de la expresión de GFAP y vimentina.

Discusión y Conclusiones

El infarto cerebral es uno de los estados patológicos asociados a neurodegeneración de mayor incidencia a nivel mundial. Actualmente, existe un único tratamiento que sólo puede ser administrado a un reducido porcentaje de pacientes. Se considera que la falta de tratamientos y estrategias terapéuticas alternativas se debe al escaso conocimiento que existe acerca de los mecanismos moleculares involucrados en la propagación del daño isquémico y la neuroinflamación (Katzan y col., 2004; Pandian y col., 2007; Moskowitz y col., 2010).

Comentamos en la introducción que el daño inicial causado por la isquemia puede amplificarse a partir del foco isquémico afectando al tejido sano en forma dependiente del tiempo (Hutchins y col., 1998; Mehta y col., 2008; Del Zoppo y col., 2011), un fenómeno que podría explicar por qué gran parte de los pacientes sufren los síntomas más graves luego de ser hospitalizados (Kelley y col., 1986; Cumbler y col 2013).

La región cercana al core afectada en forma secundaria, conocida como penumbra isquémica, es determinada inicialmente por estudios de imágenes en pacientes y se caracteriza por un aumento en el porcentaje de neuronas en apoptosis y en degeneración, presencia de astrocitos reactivos, activación y reclutamiento de células efectoras de la respuesta inmune innata. Este tejido afectado en forma secundaria puede ser eventualmente reclutado por la zona infartada propagando así el daño isquémico (Del Zoppo y col., 2011).

Uno de los principales objetivos en las neurociencias básicas en este campo es entender en qué forma ciertas moléculas solubles liberadas desde el core necrótico son capaces de inducir muerte neuronal y activación astrogliar en la penumbra isquémica. Considerando que los niveles de S100B se ven drásticamente aumentados luego de la isquemia cerebral, y sabiendo que, mayores niveles de S100B en sangre indican peor pronóstico en los pacientes, en este trabajo de tesis nos propusimos estudiar si S100B puede, luego de interactuar con su receptor RAGE, efectivamente modular la respuesta neuronal de muerte/sobrevida y la activación astrogliar observada luego de la isquemia.

5.1 La participación de S100B/RAGE en la respuesta celular y molecular a la isquemia

RAGE se expresa en neuronas y astrocitos en la zona afectada por la isquemia experimental

En el modelo de isquemia por devascularización cortical mostramos un importante aumento de la expresión de RAGE a 3DPL tanto en neuronas como en astrocitos en regiones cercanas al core isquémico. Más aún, mostramos que RAGE también se expresa en astrocitos que envuelven capilares sanguíneos perilesionales.

Previo a nuestro trabajo, la expresión de RAGE en isquemia había sido asociada principalmente a neuronas en degeneración (Schmidt-Ott. y col., 2000, Rong y col., 2005; Pichiule y col., 2007; Hassid., 2009; Yan y col., 2009). Ponath y colaboradores (2007) reportaron expresión de RAGE en cultivos primarios de astrocitos, tal como nosotros observamos. Nuestro trabajo evidencia la expresión de RAGE en astrocitos *in vivo*, especialmente astrocitos que contactan vasos perilesionales. Resultados similares mostrando expresión de RAGE en astrocitos han sido obtenidos en un modelo de epilepsia de lóbulo temporal (Iori y col., 2013).

El punto temporal de 3DPL, en el cual vemos un máximo en la expresión de RAGE, coincide con el momento en el que detectamos el comienzo de una marcada respuesta astrogliosa. A 3DPL observamos que los astrocitos aumentan la expresión de GFAP y sufren un proceso de hipertrofia celular. A 7DPL observamos un cambio morfológico que consiste en la filamentación de los astrocitos con proyecciones dirigidas hacia el foco de lesión. Por último, observamos que a 14DPL la cicatriz glial ya está conformada, delimitando los bordes del core necrótico.

Llamativamente, acompañando a los cambios morfológicos mencionados, también observamos un aumento en la expresión de marcadores de astrocitos indiferenciados. A 3DPL detectamos la aparición de astrocitos inmunopositivos para nestina al mismo tiempo que aumenta la expresión de vimentina. La expresión de nestina continúa incrementándose hacia 7DPL, y es aún detectable a 14DPL, particularmente en la cicatriz glial.

Las proteínas GFAP, vimentina y nestina conforman los filamentos intermedios de los astrocitos en los estadios tempranos de su diferenciación. Los astrocitos maduros en su mayoría expresan únicamente GFAP en condiciones normales, pero se ha mostrado que la re-aparición de vimentina y nestina acompaña los procesos de astrogliosis y la formación de la cicatriz glial. También se ha mostrado que, luego del infarto cerebral se produce una diferenciación astrogliosa a partir de precursores ependimarios (Eng y col 1985 y 2000; Morest y col., 2003; Carlén y col., 2009; Yang H. y col., 2009; Bramanti y col., 2010; Shimada y col., 2012; Zamanian y col., 2012; Wanner y col., 2013, Shin y col., 2013). En relación a este punto, nuestros resultados *in vitro* mostraron que la exposición de astrocitos en cultivo a S100B aumenta la expresión de Vimentina, y el mismo cambio fenotípico lo observamos en el modelo de *scratch assay*. En dicho modelo, los astrocitos que perdieron el contacto con sus astrocitos vecinos, comienzan a migrar y a dividirse para cubrir el espacio libre de celular. La relación entre los niveles de GFAP y vimentina en estas células cambia, haciéndose más importante la expresión de vimentina. Resultados similares fueron obtenidos por Yang H. y col., 2009; Yang C. y col., 2012.

Es importante destacar que el estudio de marcadores de astrocitos indiferenciados (en lugar de GFAP únicamente) puede ser muy relevante al momento de caracterizar la severidad de la astrogliosis reactiva.

A partir de los resultados obtenidos en esta sección, concluimos que RAGE se expresa tanto en neuronas como en astrocitos en un contexto de gliosis reactiva y neurodegeneración inducidos por la lesión isquémica experimental por devascularización cortical.

NF κ B resulta activado en el tejido afectado por la isquemia

La lesión isquémica induce un aumento en la actividad de NF κ B, especialmente en la zona de la penumbra isquémica. En este trabajo intentamos identificar los tipos celulares en los cuales se produce el aumento de la actividad transcripcional de NF κ B, y para ello utilizamos un anticuerpo que reconoce específicamente el NLS de p65 expuesto luego de la degradación de I κ B. Así, fuimos capaces de evidenciar inmunomarcación para p65-NLS tanto en neuronas como en astrocitos cercanos al core isquémico. Si bien se ha mostrado que el dímero NF κ B es susceptible a sufrir modificaciones postraduccionales que potencian su actividad transcripcional (ej.: la fosforilación de p65), el hecho de ser reconocido por un anticuerpo específico para su secuencia de localización nuclear es suficiente para mostrar que se encuentra libre de su represor I κ B y listo para translocar al núcleo (Chen y col., 2004; Chávez y col., 2012; Chen y col., 2012). De los puntos temporales evaluados solo logramos detectar mediante inmunohistoquímica astrocitos con marca positiva para p65-NLS a 3DPL, nuevamente coincidiendo con el comienzo de la gliosis reactiva y la expresión astrogliosa de RAGE. Como comentamos en la sección introducción, la activación de NF κ B y la expresión de RAGE son indicadores de la activación de la respuesta inflamatoria. En este trabajo mostramos que dichos marcadores de inflamación son observados en neuronas y astrocitos cercanos a la lesión isquémica.

Similar a lo comentado sobre la expresión de RAGE, la mayoría de los trabajos asocia la actividad de NF κ B a una respuesta neuronal, pero solo algunos de estos pudieron demostrar actividad *in situ* confirmando el tipo celular. Respecto de este punto, a nuestro conocimiento, solo el trabajo realizado por Terai y colaboradores (1996) mostró una mayor expresión de p65 en astrocitos como índice de activación de NF κ B.

En base a nuestros resultados, concluimos que NF κ B se estaría activando en la penumbra isquémica en forma radial, probablemente respondiendo a un gradiente de señales solubles desde el core isquémico.

Posibles mecanismos moleculares de inducción de la expresión de RAGE en tejido isquémico

Estudios del promotor del gen de RAGE muestran que existen secuencias de unión a los factores de transcripción: Sp1, NF κ B y HIF1- α en las áreas proximales, cercanas al inicio de la transcripción (Li J. y col., 1997 y 1998; Pichiule y col., 2007).

En neuronas corticales primarias observamos una expresión basal de RAGE que se ve incrementada por la exposición a niveles excitotóxicos de glutamato. Respecto a este punto, se ha descrito que, inmediatamente luego de la exposición a glutamato las neuronas sufren ensanchamiento o *swelling* por estrés hipo-osmolar (Rothman y col., 1985; Olney y col., 1986 y 1971; Lai y col., 2013) y que este tipo de estrés promueve la activación del factor de transcripción Sp1 (Ramos y col., 2007; Kruczek y col., 2009). Además, nuestros resultados demuestran que la exposición a S100B induce activación de NF κ B y aumento de la expresión de RAGE. Por último, en un modelo de apnea del sueño por hipoxia intermitente utilizado en nuestro laboratorio, también observamos *in vivo* activación de HIF1- α y expresión de RAGE exclusivamente en neuronas (Avilés y col., 2010).

En astrocitos, no está muy claro cuáles son las señales que desencadenan la expresión de RAGE. Probablemente el factor más importante en este caso sea la activación de NF κ B ya que ha sido previamente asociado a una respuesta astrogliar en otros modelos (Brambilla y col., 2005; Sofroniew y col., 2009). Resultados de nuestro laboratorio demostraron que el bloqueo de NF κ B con SFZ o de Sp1 con un DN-Sp1 reduce significativamente la expresión de RAGE inducida por S100B (Villarreal y col., 2014).

Teniendo en cuenta la evidencia mencionada, podemos considerar a la expresión de RAGE como un fenómeno iniciado y sostenido por distintas señales en el transcurso temporal luego de la isquemia. Podemos especular que probablemente HIF1- α esté involucrado en la primera etapa de expresión de RAGE, ya que depende de una disminución drástica de los niveles de O₂, situación que ocurre cuando el flujo sanguíneo es interrumpido. En una segunda etapa, los altos niveles de glutamato y los cambios en el volumen celular por hipo-osmolaridad contribuirían a la expresión de RAGE en regiones limítrofes al core isquémico. Por último y basándonos en nuestros resultados, las moléculas del tipo DAMP, como S100B, se encargarían de mantener su expresión por tiempos aún más prolongados y en forma dependiente de NF κ B.

5.2 La excitotoxicidad aumenta los efectos de S100B sobre neuronas

S100B modula la sobrevivencia neuronal en forma dependiente de RAGE

Las neuronas son el tipo celular más susceptible a sufrir daños en el microambiente generado por la isquemia cerebral. Si bien son distintas las señales que pueden iniciar procesos de muerte neuronal, se acepta que el estrés excitotóxico, generado por un exceso de glutamato extracelular, es una de las principales causas de daño celular en la isquemia. (Lai y col., 2013).

Con el objetivo de modelar *in vitro* las condiciones de stress excitotóxico sufridas por las neuronas de la penumbra luego de la isquemia cerebral, utilizamos la exposición a un pulso de glutamato en cultivos de neuronas corticales. Llamativamente, en nuestros experimentos, la dosis de 1 μM de S100B aumentó la expresión de RAGE. En neuronas que fueron expuestas a glutamato observamos que la dosis de 0.05 μM de S100B aumentó la sobrevivencia mientras que la dosis de 1 μM promovió la muerte neuronal. De esta manera, S100B mostró una notable dependencia de la dosis en su capacidad para potenciar el rol deletéreo del glutamato. Observamos que dichos efectos dependen de la interacción S100B/RAGE debido a que la respuesta neuronal a S100B se ve significativamente reducida cuando bloqueamos esa interacción utilizando el anticuerpo neutralizante de RAGE. Si proyectamos estos resultados a la situación *in vivo* donde S100B se liberaría en forma de gradiente desde el core necrótico, podemos especular que las neuronas ubicadas en la penumbra que expresan RAGE darán una respuesta diferencial dependiendo de su ubicación respecto del core necrótico: Es decir, aquellas que están cercanas al core se verán expuestas a mayores concentraciones de S100B que las que estén más alejadas. La expresión de RAGE, por otra parte, determinaría la susceptibilidad de las neuronas a la S100B extracelular de S100B.

Concluimos de esta primera sección que las neuronas expuestas a glutamato mostraron ser más sensibles a la posterior exposición a S100B debido a la sobreexpresión del receptor RAGE. De esta manera, S100B actuaría como señal parácrina sobre poblaciones neuronales luego de ser liberada por astrocitos reactivos o que sufrieron necrosis.

En concordancia con nuestros resultados un trabajo publicado por Sathe y colaboradores (2012) mostró que S100B estaría mediando la muerte neuronal en forma dependiente de RAGE en un modelo de enfermedad de Parkinson. Esto nos permite especular acerca de que estos mecanismos serían genéricos y su control una interesante estrategia terapéutica.

S100B activa a NFκB en forma dependiente de RAGE

Tanto la degradación IκB como el aumento en la fosforilación de la subunidad p65 son indicadores de la activación de NFκB (Gorina y col., 2011). Nuestros resultados mostraron que en neuronas expuestas a glutamato tanto la dosis de S100B de 0.05 μM como la de 1 μM, activaron a NFκB. Esto se observó en ensayos de inmunoblot, donde los niveles de la proteína IκB disminuyeron luego del tratamiento con glutamato y S100B, efecto esperado por la degradación de IκB luego de su fosforilación por IκK. Observamos también que, en forma inversa a lo ocurrido con IκB, los niveles de P-p65 aumentaron significativamente luego del tratamiento con glutamato y S100B.

Es importante señalar que la dosis de 1 μM de S100B también logró activar a NFκB en neuronas del grupo control. Nuevamente, consideramos que esto se debe a la expresión basal de RAGE en cultivos. En este contexto, observamos mediante inmunofluorescencia que el bloqueo de RAGE, utilizando el anticuerpo neutralizante, inhibe la translocación nuclear de la subunidad p65 de NFκB inducida por S100B 1 μM. Se ha mostrado previamente en cultivos de línea de neuroblastoma que la activación de RAGE promueve la sobrevivencia celular y la activación de NFκB (Huttunen y col., 1999 y 2000). En el modelo de preconditionamiento por S100B mencionado anteriormente (Kogel y col., 2004), se mostró activación de NFκB inducida por S100B en cultivos primarios neuronas hipocampales, sin mostrar dependencia de RAGE.

Sabiendo que dosis bajas de S100B tienen un rol protector en neuronas estudiamos si la vía de Akt, que ha sido asociada a la sobrevivencia neuronal (Hussain y col., 2012, Li W. y col., 2012), resulta activada como consecuencia de la exposición a S100B. Llamativamente encontramos que ambas dosis pueden promover un aumento de la fosforilación de Akt, el cual se vuelve aún más significativo en neuronas expuestas a glutamato. Según nuestra hipótesis, la activación de Akt por parte de S100B 1 μM resultaría controversial debido a que esta dosis no tiene efectos protectores. Sin embargo, se ha demostrado que existe un crosstalk entre las vías de Akt y NFκB que permite una regulación recíproca entre ellas (Shimamura y col., 2003; Hussain y col., 2012).

Tanto *in vivo* como *in vitro*, las neuronas presentan un nivel basal de activación de NFκB en forma constitutiva. Esta actividad es necesaria para la sobrevivencia neuronal *in vitro* y por lo tanto su bloqueo conduce a la muerte celular (Schmidt U. y col., 1996; Bhakar y col., 2002). Nuestros resultados también mostraron que la inhibición de NFκB con sulfasalazina promueve una masiva muerte neuronal. En estas condiciones, observamos que el tratamiento con S100B fue capaz de proteger a las neuronas de la muerte por bloqueo de NFκB. Para descartar que S100B este ejerciendo efectos protectores por una vía distinta a la de NFκB, logramos demostrar mediante inmunoblot que S100B puede activar a NFκB incluso en presencia de sulfasalazina aunque en un nivel notablemente más bajo. En

concordancia observamos que la dosis de 1 μ M de S100B también promovió la sobrevida, fenómeno que puede explicarse teniendo en cuenta que los niveles basales de activación de NF κ B serían menores debido a que la vía de se encuentra parcialmente inhibida.

Algo sorprendente fue observar que la previa exposición a glutamato también parece proteger a las neuronas de la muerte por el bloqueo de NF κ B. Considerando que se ha propuesto que la activación de receptores NMDA por glutamato lleva también a la activación de NF κ B (Ko y col., 1998; Fan W. y col., 2009), es probable que la exposición a glutamato sea capaz de limitar el bloqueo de NF κ B impuesto por la SFZ.

5.3 Efectos autócrinos de S100B sobre astrocitos

S100B induce cambios en astrocitos hacia un fenotipo reactivo *in vitro* en forma dependiente de RAGE

La gliosis reactiva es un fenómeno complejo que promueve múltiples cambios en los astrocitos. Zamanian y col. (2012) estimaron que aproximadamente 1000 genes cambian su expresión durante la gliosis reactiva, de los cuales el 50% son específicos al tipo de lesión. Sin embargo, el cambio morfológico hacia un fenotipo filamentoso con aumento de la expresión de GFAP y aumento en la tasa de proliferación son parámetros comunes en el fenómeno de astrogliosis observado en los distintos estados patológicos. Con el objetivo de estudiar los efectos de S100B sobre los astrocitos y su capacidad de inducir la gliosis reactiva utilizamos cultivos de astrocitos primarios depletados de microglía. Pudimos comprobar que efectivamente S100B tiene la capacidad de promover la filamentación de astrocitos y el crecimiento de proyecciones secundarias en una forma dependiente de la dosis de S100B utilizada. En relación a este punto, comentamos previamente que la filamentación observada *in vitro* es aceptada como un correlato morfológico de la gliosis reactiva observada *in vivo*, aunque posee obvias limitaciones dadas por la diferencia en el transcriptoma de los astrocitos reactivos: es decir, astrocitos que morfológicamente responden igual, pueden presentar distinto patrón de expresión génica y cumplir diferentes funciones. Comprobamos aquí que los efectos de S100B sobre la morfología astrogliótica están mediados por RAGE, demostrado por la sobreexpresión de un dominante negativo de RAGE o mediante la incubación con anticuerpos neutralizantes. En concordancia con nuestros resultados Hu y colaboradores (1999) también observaron que S100B promueve cambios morfológicos en astrocitos hacia un perfil más filamentoso, sin embargo no mostraron cuál es el receptor que participa de dicho proceso. Mostramos también que S100B facilita la migración de astrocitos en un modelo de injuria *in vitro* promoviendo la formación de prolongaciones del tipo pseudopodio. Resultados de nuestro laboratorio, no incluidos en este trabajo de tesis, demostraron que la ruta de señalización que gobierna la

filamentación y la migración astrogliar requiere de RAGE y Rac1/Cdc42 (Villarreal y col., 2014). En acuerdo parcial con nuestros resultados, se ha mostrado previamente, que el DAMP HMGB1, que también es ligando de RAGE, promueve la migración de células de glioblastoma (Bassi y col., 2008). Además, S100B promueve también la migración y reclutamiento de la microglía, al menos *in vitro* (Bianchi R. y col., 2007, 2008). Estos resultados sugieren que las moléculas del tipo DAMP, como S100B y su receptor RAGE, podrían estar participando en el reclutamiento de astrocitos y microglía al sitio de lesión desde donde son liberadas.

Nuestros resultados también mostraron que la exposición a S100B aumenta la expresión de las proteínas GFAP y vimentina, marcadores que se ven incrementado en astrocitos reactivos *in vivo* tanto en el modelo de isquemia como en el de inyección intracortical de S100B.

En cuanto a la actividad mitogénica de S100B, en trabajos clásicos de la literatura de S100B se ha mostrado *in vitro* que S100B es capaz de inducir un aumento en la incorporación de timidina tritiada (^3H -timidina) por células gliales al mismo tiempo que promueve un aumento del número de células (Selinfreund y col., 1991). Para comprobar si este efecto de S100B descrito era dependiente de RAGE, expusimos astrocitos a S100B exógena y analizamos la incorporación del análogo de timidina: bromodioxiuridina (BrdU). Observamos que efectivamente S100B promueve la incorporación de BrdU por parte de células inmunopositivas para GFAP y que dicho efecto se ve interrumpido por el bloqueo de RAGE utilizando el anticuerpo neutralizante.

A partir de los resultados descritos en esta sección, concluimos que S100B sería capaz de reproducir algunas de las características fenotípicas de la astrogliosis en forma dependiente de RAGE.

S100B activa a NF κ B en forma dependiente de RAGE

Sabiendo que NF κ B es un factor de transcripción relacionado a la respuesta inflamatoria, que se activa como consecuencia de la interacción de RAGE con S100B en líneas celulares y en neuronas, estudiamos si S100B es capaz de promover translocación nuclear en astrocitos que expresan RAGE. Efectivamente encontramos un aumento significativo en la localización nuclear de p65 luego de exponer a S100B 1 μ M, el cual se vio acompañado de un aumento en la degradación de I κ B. Como esperábamos, la incubación con el anticuerpo neutralizante del receptor RAGE bloqueó significativamente la translocación nuclear de p65 inducida por S100B. Es importante destacar que, según este método de estimación de la activación de NF κ B, la dosis de 0.05 μ M no tuvo efecto. Sin embargo, resultados previos del laboratorio utilizando un plásmido reportador de actividad de NF κ B mostraron que las dosis bajas de S100B también son capaces de inducir un

aumento discreto pero significativo en la actividad transcripcional de NF κ B (Villarreal y col., 2014).

Previo a nuestros estudios, se ha mostrado que S100B es capaz de promover la activación de NF κ B en cultivos de astrocitos que expresan RAGE (Ponath y col., 2007). En dicho trabajo se analizó la translocación nuclear de NF κ B 48 h después del tratamiento con S100B. Efectivamente observaron un aumento en la activación de NF κ B, aunque consideramos necesario analizar ventanas temporales más cortas debido a que se ha mostrado que la activación de NF κ B por LPS en astrocitos ocurre entre 1 y 3 horas post estímulo y que la activación de NF κ B induce el aumento en la expresión de varios genes que incluyen p65 pero también I κ B, por lo que los efectos a largo plazo pueden resultar confusos (Gorina y col., 2011). En este trabajo de tesis analizamos translocación nuclear de p65 a 1 y 3 h luego de la exposición a S100B y, a diferencia del trabajo realizado por Ponath y colaboradores (2007), analizamos si dicha activación varía en presencia de un anticuerpo neutralizante para RAGE.

Concluimos que S100B activa rápidamente a NF κ B en forma RAGE dependiente lo que probablemente este indicando que S100B, actuando como DAMP, active genes NF κ B dependientes con capacidad de convertir a los astrocitos hacia un perfil proinflamatorio.

S100B promueve un perfil proinflamatorio en astrocitos

La actividad de NF κ B en astrocitos ha sido asociada a la generación de un microambiente proinflamatorio por aumento en la expresión de receptores tipo PRR y de citoquinas/interleuquinas (Phulwani y col., 2008; Gorina y col., 2011; Font-Nieves y col., 2012). Encontramos que S100B no sólo aumenta la presencia nuclear de p65 sino que también aumenta la expresión de IL-1 β y TLR2, ambos genes regulados por NF κ B y asociados a una respuesta celular pro-inflamatoria (Cogswell JP y col., 1994; Matsuguchi y col., 2000; Wang T. y col., 2001; Musikacharoen y col., 2001; Bianchi y col., 2008; Phulwani y col., 2008). En concordancia con nuestros resultados recientemente se ha publicado que astrocitos expuestos a un episodio del tipo inflamatorio, tal que provoque activación de NF κ B, se vuelven hipersensibles a futuros estímulos con ligandos de TLR2 (Henn y col., 2011). También se ha comenzado a encontrar evidencia que implica a TLR2 como un mediador importante de la respuesta celular durante la isquemia. Estos estudios fueron realizados tanto en modelos animales como en pacientes y por ello es considerada una vía de señalización a estudiar como posible blanco terapéutico (Brea y col., 2011; Park y col., 2012; Winters y col., 2013). La expresión de TLR2 en este contexto no ha sido asociada a un tipo celular en particular pero si a una respuesta celular tardía (Bohacek y col., 2012). Si sumamos esta evidencia a nuestros resultados podemos especular que la liberación de S100B podría estar sensibilizando la respuesta astroglial luego de la isquemia cerebral.

S100B promueve la sobrevida de astrocitos frente al estrés oxidativo

Como comentamos anteriormente, en la zona de penumbra isquémica las neuronas mueren por apoptosis mientras que los astrocitos se vuelven reactivos. Si bien los astrocitos sobreviven al aumento de los niveles de glutamato extracelular, son sensibles al aumento en los niveles de las especies reactivas del oxígeno. Sin embargo, distintos mecanismos de señalización intracelular permiten que los astrocitos de la penumbra, también se vuelvan resistentes al estrés oxidativo. Es por esto que nos propusimos estudiar si S100B participa de dichos mecanismos de sobrevida astrogial.

Encontramos que la exposición a S100B durante un periodo de 18 h previene la muerte celular inducida por estrés oxidativo y que dicho efecto parece depender de las vías Erk y Akt, pero no de NF κ B. En concordancia con nuestros resultados, se había mostrado previamente *in vitro* que la sobrevida de astrocitos a H₂O₂ promovida por el péptido ODN (octadecaneuropeptido) o por agonistas de receptores glutamatérgicos involucran a las vías Erk_{1/2}/Akt (Gabryel y col., 2004; Hamdi y col., 2012). Por otro lado, un trabajo llevado a cabo por Jiang y colaboradores (2002), mostró que las vías Erk y Akt son activadas en un modelo de isquemia *in vitro*. Cabe destacar que en este tipo de modelos, de isquemia *in vitro*, los astrocitos sufren muerte por necrosis aumentando así los niveles extracelulares de S100B (Gerlach y col., 2006), lo que podría estar induciendo activación de ambas vías en estas condiciones.

Al igual que nosotros, el trabajo de Gonçalves y colaboradores (2000) también mostró activación de Erk inducida por S100B. También, se ha propuesto a Erk como un mediador de la activación de RAGE, además de otras vías como la de NF κ B (Rauvala y col., 2010).

Se han llevado a cabo distintos intentos por entender el papel de las vías Erk y Akt en la isquemia cerebral *in vivo*. Por un lado se observó que la inhibición farmacológica de Erk reduce la expresión de IL-1 β proinflamatoria al mismo tiempo que disminuye el daño por isquemia (Alessandrini y col., 1999; Wang ZQ. y col., 2004). Por otro lado, se vio que los efectos protectores de distintas moléculas dependen de una activación dual de las vías Erk y Akt (Kilic y col., 2005), tal cual lo sugieren nuestros resultados. De todas maneras, los resultados obtenidos *in vivo* mediante la utilización de inhibidores farmacológicos han mostrado ser muchas veces controversiales (Nozaki y col., 2001). Esto puede deberse a que las vías mencionadas cumplen distintas funciones en los distintos tipos celulares, por lo que se requerirán estrategias más específicas de bloqueo en estudios *in vivo*.

Muy recientemente se mostró que la exposición de astrocitos a un modelo de isquemia *in vitro* provoca una reducción en su capacidad de re-captar glutamato, pero la activación de las vías Erk, Akt y NF κ B por ciertos agonistas glutamatérgicos pueden restaurar el correcto funcionamiento celular (Lin y col., 2014). En concordancia con nuestros

resultados, el trabajo de Lin y colaboradores (2014) vinculan a las vías mencionadas con la sobrevida y preparación de astrocitos para un microambiente citotóxico.

S100B promueve la gliosis reactiva *in vivo*

En esta tesis mostramos *in vivo* que la infusión intracortical de S100B es capaz de inducir cambios morfológicos típicos de la gliosis reactiva. Más aún, mostramos que hay un aumento de la inmunomarcación para vimentina en astrocitos reactivos inducidos por la alta concentración focal de S100B. Esto es similar a lo observado en la zona cercana a la lesión isquémica en animales sometidos al modelo de isquemia por devascularización cortical. En los animales que recibieron la proteína control (BSA) también se observa cierto nivel de respuesta astrogliar. Esto puede deberse por un lado a que la disrupción de las meninges producida por la cánula también genera una pequeña lesión mecánica y por otro a que, en ese contexto, puede existir cierta respuesta a la proteína BSA agregada exógenamente. De todas formas, la respuesta a S100B purificada de cerebro bovino fue considerablemente mayor que la evidenciada por BSA mostrando su capacidad de provocar un aumento en la gliosis reactiva en una situación donde su receptor RAGE también se expresa.

Trabajos previos llevados a cabo por otros laboratorios estudiaron la respuesta astrogliar en la región de penumbra utilizando animales transgénicos que sobreexpresan S100B o disminuyendo su producción mediante la utilización de ácido arúndico (Mori y col., 2008; Asano y col., 2005). Si bien dichos trabajos apoyan la idea de que un aumento en la expresión de S100B favorece la expansión del daño, es importante destacar que el resultado obtenido en los modelos mencionados puede deberse a una alteración de las funciones intracelulares de S100B. Estos trabajos tampoco reproducen el patrón de liberación focal de S100B que nuestro trabajo plantea como forma de imitar la alta concentración local de S100B en la zona del core isquémico y la penumbra vecina. Es interesante notar que niveles aumentados de S100B en líquido cefalorraquídeo y plasma se observaron en modelos experimentales de isquemia (Ramos y col., 2004) y correlacionan con peor pronóstico en pacientes humanos (Dassan y col 2009; Ahmad y col., 2012; Montaner y col., 2012).

5.5 Conclusiones finales y proyección

La ruta de señalización S100B/RAGE/NF κ B en la isquemia cerebral

Trabajar en sistemas de cultivos primarios enriquecidos en un tipo celular (neuronas o astrocitos) nos permitió realizar ensayos de ganancia y pérdida de función que *in vivo*, alterarían la respuesta de todos los tipos celulares que expresan RAGE. Nuestros resultados en su conjunto mostraron que efectivamente S100B es capaz de reproducir algunas de las respuestas observadas en neuronas y astrocitos en el tejido afectado por la isquemia. Consideramos que S100B no es suficiente para ejercer dichos efectos ya que requiere de la expresión de su receptor RAGE y su localización en membrana, aunque una vez expresado RAGE, S100B es capaz de incrementar su expresión generando un mecanismo tipo feed-forward. La necesidad de un estímulo previo, capaz de inducir un aumento en la expresión de RAGE, convierte a S100B en una señal con capacidad de propagar y sostener la señal del daño tisular.

Se ha propuesto que S100B no solo se libera de astrocitos que sufren necrosis, sino que también es secretado en forma activa por astrocitos reactivos (Gerlach y col., 2006; Ramos y col., 2004; Guerra y col., 2011). Esto, a diferencia de otras señales liberadas desde el core necrótico en forma transitoria, permite que la liberación de S100B sea sostenida en el tiempo manteniendo sus niveles elevados en regiones más distales a la lesión isquémica.

La expresión de RAGE luego de la isquemia en los distintos tipos celulares los volvería sensibles a S100B aunque evocando respuestas celulares específicas. En neuronas, la expresión de RAGE parecería representar un etiquetado de daño celular. De esta manera, neuronas que han sido afectadas comenzarían a expresar RAGE y serían dirigidas a sufrir muerte por apoptosis siempre que los niveles de S100B superen el rango micromolar. En cambio, si la concentración de S100B fuera baja, estas neuronas sobrevivirían favorecidas por los efectos benéficos de S100B. Resultados previos del laboratorio mostraron que el receptor de neurotrofinas p75NTR también se expresa en neuronas en degeneración de regiones cercanas a la lesión isquémica, lo que las volvería susceptibles a los efectos de las proneurotrofinas que inducen apoptosis (Angelo y col., 2009). Al igual que RAGE, p75NTR también se induce en forma dependiente de Sp1 y ambos podrían estar contribuyendo a este mecanismo de direccionamiento celular hacia la muerte programada por apoptosis.

La expresión de RAGE en neuronas también permitiría el establecimiento de una comunicación o *crosstalk* con astrocitos ya que las neuronas que expresen este receptor pueden responder a la proteína astrogliar S100B secretada por astrocitos reactivos. Estos mecanismos parecen ser compartidos por el DAMP HMGB1, que también funciona como

ligando de RAGE en isquemia (Bianchi M. y col., 2007; Muhammad y col., 2008; Yang QW. y col., 2010). De esta forma, las regiones que se encuentran más allá de la penumbra isquémica y que reciben bajos niveles de DAMP, se verían favorecidas para la supervivencia y evitarían su reclutamiento al tejido infartado, siempre que su nivel basal de actividad de NF κ B así lo permita.

Tanto en neuronas como en astrocitos, la exposición a S100B promueve la expresión de RAGE probablemente luego de activar a NF κ B, pero observamos que en astrocitos también induce el gen de TLR2. En esta tesis, no mostramos un aumento de la proteína de TLR2, pero sí de su mensajero. Si los niveles de la proteína de TLR2 estuviesen efectivamente aumentados, podemos especular que en esta situación los astrocitos no solo serían más sensibles a ligandos de RAGE sino que también serían sensibles a ligandos de TLR2.

La figura 5.1 resume los resultados obtenidos en este trabajo de tesis intentando enmarcarlos en un modelo de cerebro isquémico. Especulamos que luego de la isquemia, los niveles de S100B aumentarían por liberación desde astrocitos dañados o por astrocitos reactivos ejerciendo efectos sobre células que expresan el receptor RAGE. Luego de la interacción S100B/RAGE se activarían distintas vías intracelulares responsables de las respuestas observadas.

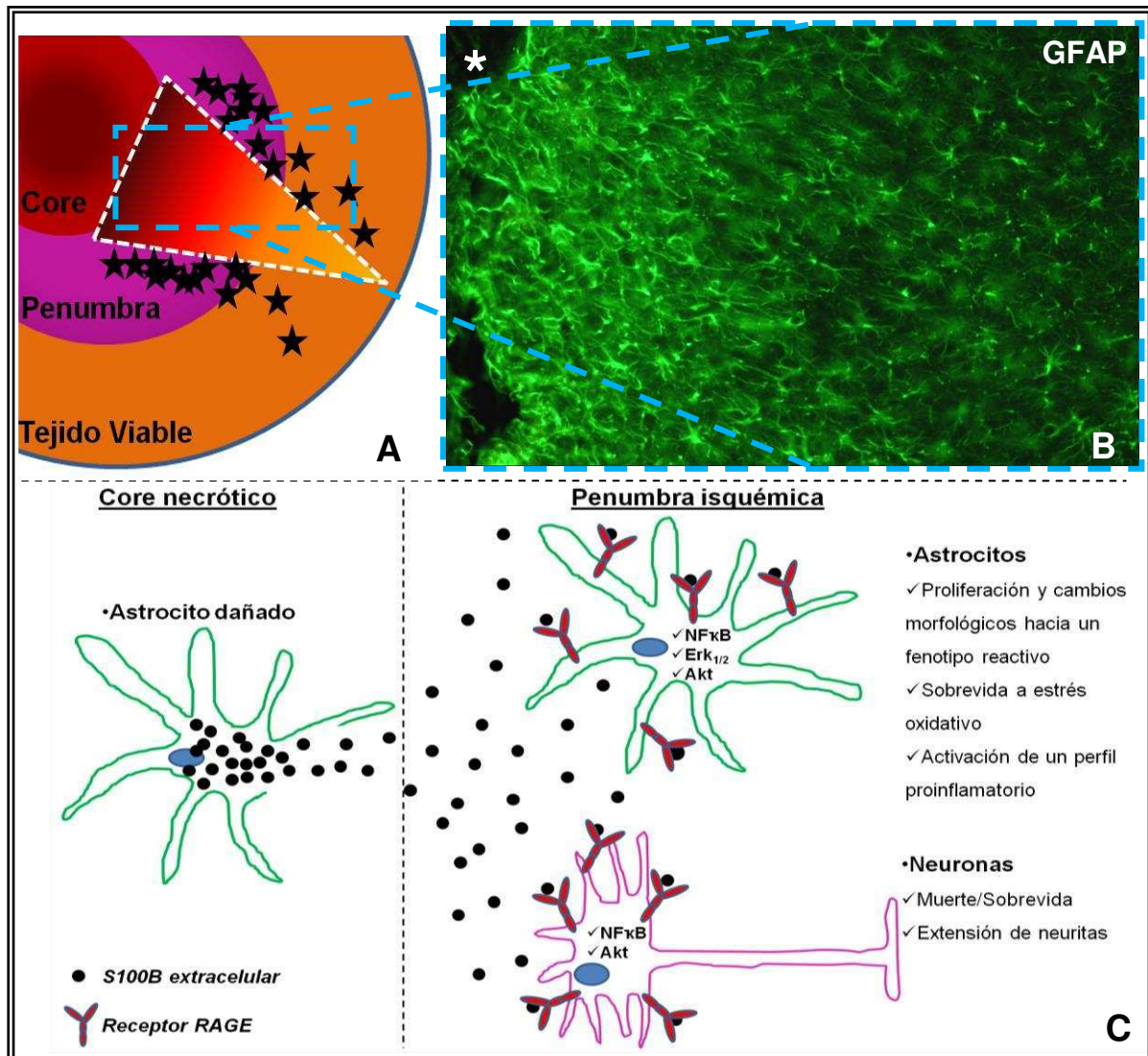


Figura 5.1: Liberación de S100B en isquemia y respuesta celular. El esquema representa la liberación de distintos factores solubles en forma de gradiente desde el core isquémico (triángulo de línea de puntos) y la expresión de receptores PRR (estrellas negras). Esto permitiría una respuesta gradual por parte de las células que expresan dichos receptores. Dicha respuesta dependería además de la ubicación celular respecto del core isquémico. La fotomicrografía B (de nuestra autoría) muestra la respuesta astrogliar típica observada en el modelo de isquemia. La tinción con GFAP (verde) permite evidenciar distintos niveles de reactividad astrogliar que depende de la ubicación de los astrocitos respecto del foco isquémico (señalado con un asterisco). El esquema C muestra un resumen de los resultados obtenidos en este trabajo de tesis, los cuales nos permiten especular en qué forma astrocitos y neuronas responderían al aumento extracelular de S100B en situaciones de isquemia donde el receptor RAGE se expresa.

Señalización por moléculas del tipo DAMP como posible blanco molecular de estrategias terapéuticas.

Además de S100B existen otras moléculas cuyos niveles en el espacio extracelular aumentan considerablemente luego de la isquemia cerebral y tienen la capacidad de activar a la respuesta inmune innata (por ejemplo HMGB1) (Yang QW. y col., 2010; Qiu y col., 2010) o de inducir astrogliosis reactiva (por ejemplo ATP) (Melani y col., 2005; Dale y col., 2009; Sofroniew y col., 2009). Debido a que estas moléculas se liberan desde el foco de la lesión, donde la muerte celular ocurre principalmente por necrosis, proponemos un modelo en donde los DAMPs difundirían en forma de gradiente desde el core isquémico hacia el tejido sano. Esta difusión radial implicaría que las células más cercanas a la lesión se vean expuestas a concentraciones más altas de DAMPs (Figura 5.1) que parecen tener un efecto esencialmente deletéreo sobre neuronas y proinflamatorio en astrocitos. Esto permitiría explicar los mecanismos celulares y moleculares que subyacen la formación y expansión de la penumbra a partir de señales liberadas del core isquémico.

Teniendo en cuenta nuestros resultados en su conjunto, podemos pensar a S100B como un DAMP que, luego de liberado desde las regiones más afectadas por la isquemia, tiene la capacidad de inducir muerte neuronal por apoptosis en forma directa o en forma indirecta dirigiendo a la astrogliosis hacia un perfil proinflamatorio. Consideramos que las vías activadas por la interacción S100B/RAGE emergen como un tentador blanco molecular para el diseño de futuras estrategias neuroprotectoras. En concordancia, resultados de nuestro laboratorio han mostrado que el bloqueo de NF κ B o de RAGE mejoran la supervivencia neuronal y reducen la gliosis reactiva en un modelo experimental de apnea del sueño (Angelo y col., 2014).

Es importante destacar que, además de RAGE, los receptores TLR también aumentan su expresión en isquemia (Fan H. y col., 2009; Winters y col., 2013). Sabiendo que tanto la interacción de RAGE y TLR con sus respectivos ligandos promueven la activación de NF κ B, podemos también especular que la activación de este factor de transcripción parece ser un punto de convergencia entre distintas vías activadas luego de la isquemia, convirtiéndose así en otro posible blanco molecular (Haorau y col., 2012). La modulación de ésta vía de convergencia está siendo actualmente explorada por nuestro laboratorio.

En concordancia con nuestras conclusiones, muy recientemente se han publicado una serie de trabajos y revisiones que proponen a los astrocitos como mediadores y moduladores centrales en la neuroinflamación tanto en isquemia como en otras enfermedades neurodegenerativas (Figura 5.2) y que consideran a la interacción entre sistema nervioso e inmune como un prometedor blanco terapéutico (Hoarau y col., 2012;

Ransohoff y col., 2011; Mayo y col., 2012; Shichita y col., 2012; Kamel y col., 2012; Amor y col., 2013; Brambilla y col., 2013; Murray y col., 2013).

Frente al masivo fracaso de las pruebas clínicas que han intentado la protección neuronal como única estrategia, la modulación de la actividad del sistema inmune innato y en particular de la actividad de PRR y su efector $\text{NF}\kappa\text{B}$, emergen como novedosas estrategias terapéuticas tendientes a preservar la funcionalidad de la unidad neurovascular en su conjunto.

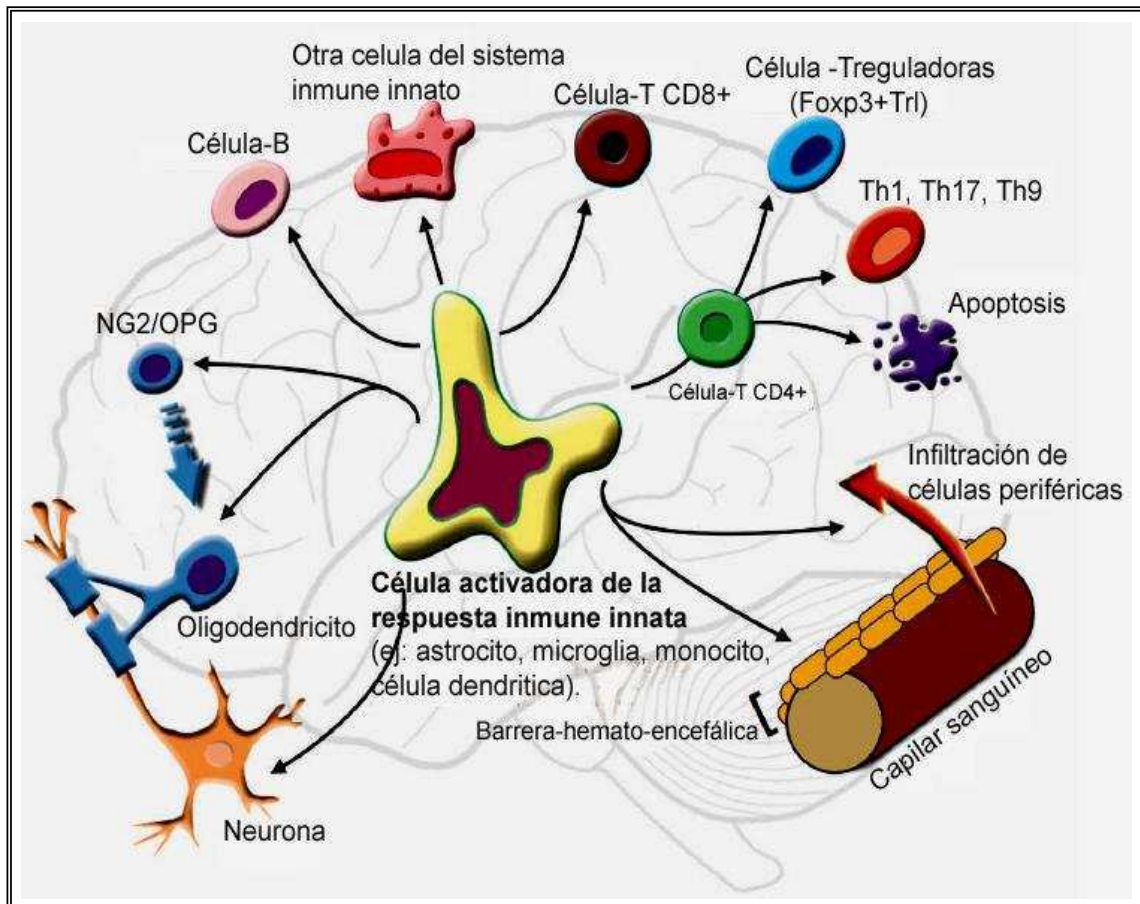


Figura 5.2: Conclusiones finales. El esquema fue modificado del *review* publicado por Mayo y colaboradores (2012) y representa un modelo en donde se propone a los astrocitos como moduladores centrales de la neuroinflamación.

Bibliografía

- Abe K, Saito H. Astrocyte stellation induced by tyrosine kinase inhibitors in culture. *Brain Res.* 1999 7; 837(1-2): 306-308.
- Ahmad O, Wardlaw J, Whiteley WN. Correlation of levels of neuronal and glial markers with radiological measures of infarct volume in ischaemic stroke: a systematic review. *Cerebrovasc Dis.* 2012;33(1):47-54.
- Alessandrini A, Namura S, Moskowitz MA, Bonventre JV. MEK1 protein kinase inhibition protects against damage resultin from focal cerebral ischemia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999 Oct 26;96(22):12866-9.
- Alexanian AR, Bamburg JR. Neuronal survival activity of s100betabeta is enhanced by calcineurin inhibitors and requires activationof NF-kappaB. *FASEB J.* 1999 Sep;13(12):1611-20.
- Allen NJ, Barres BA. Neuroscience: Glia - more than just brain glue *Nature.* 2009 Feb 5;457(7230):675-7.
- Alloret R, O'Hanlon D, Price R, Neilson K, Willard HF, Cox DR, Marks A, Dunn RJ. Gene encoding the beta subunit of S100 protein is on chromosome 21: implications for Down syndrome. *Science.* 1988 Mar 11;239(4845):1311-3.
- Alloret Robert J, Friend William C, O'Hanlon David, Neilson Karen M, Baumaal Reuben, Dunn Robert J, Marks Alexander. Cloning and Expression of the Human S100B Gene. *J Biol Chem,* 1990, 265 (26), 15537-15543.
- Aloisi, F. Immune function of microglía. *Glia* (2001) 36, 165–179.
- Alter A, y col. Determinants of human B cell migration across brain endothelial cells. *J Immunol.* 2003; 170:4497–4505.
- Amor S, Peferoen LA, Vogel DY, Breur M, van der Valk P, Baker D, van Noort JM. Inflammation in neurodegenerative diseases - an update. *Immunology.* 2013 Dec 16.
- Angelo MF, Aguirre A, Aviles Reyes RX, Villarreal A, Lukin J, Melendez M, Vanasco V, Barker P, Alvarez S, Epstein A, Jerusalinsky D, Ramos AJ. The proinflammatory RAGE/NF-kB pathway is involved in neuronal damage and reactive gliosis in a modelof sleep apnea by intermittent hypoxia. (Aceptado para publicacion en PLOS ONE / PONE-D-14-11454).
- Angelo MF, Aviles-Reyes RX, Villarreal A, Barker P, Reines AG, Ramos AJ. p75 NTR expression is induced in isolated neurons of the penumbra after ischemia by cortical devascularization. *J Neurosci Res.* 2009 Jun;87(8):1892-903.
- Asano T, Mori T, Shimoda T, Shinagawa R, Satoh S, Yada N, Katsumata S, Matsuda S, Kagamiishi Y, Tateishi N. Arundic acid (ONO-2505) amiliorates delayed ischemic brain damage by preventing astrocytic overproduccion of S100B. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord* (2005) Apr, 4(2):127-42.

- Astrup J, Blennow G, Nilsson B. Effects of reduced cerebral blood flow upon EEG pattern, cerebral extracellular potassium, and energy metabolism in the rat cortex during bicuculline-induced seizures. *Brain Res.* 1979 Nov 9;177(1):115-26.
- Astrup J, Siesjö BK, Symon L. Thresholds in cerebral ischemia - the ischemic penumbra. *Stroke.* 1981 Nov-Dec;12(6):723-5.
- 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 Feb;112(4):854-69.
- Bajetto A, Barbero S, Bonavia R, Piccioli P, Pirani P, Florio T, Schettini G. Stromal cell-derived factor-1alpha induces astrocyte proliferation through the activation of extracellular signal-regulated kinases 1/2 pathway. *J Neurochem.* 2001 Jun;77(5):1226-36.
- Barger SW, Van Eldik LJ, Mattson MP. S100 beta protects hippocampal neurons from damage induced by glucose deprivation. *Brain Res.* 1995 Apr 17;677(1):167-70.
- Barres BA. The mystery and magic of glia: a perspective on their roles in health and disease. *Neuron.* 2008 Nov 6;60(3):430-40.
- Bassi R, Giussani P, Anelli V, Colleoni T, Pedrazzi M, Patrone M, Viani P, Sparatore B, Melloni E, Riboni L. HMGB1 as an autocrine stimulus in human T98G glioblastoma cells: role in cell growth and migration. *J Neurooncol.* 2008 Mar; 87(1):23-33.
- Basta G, G. Lazzerini, M. Massaro, T. Simoncini, P. Tanganelli, C. Fu, T. Kislinger, D.M. Stern, A.M. Schmidt, R. De Caterina. Advanced glycation end products activate endothelium through signal-transduction receptor RAGE: a mechanism for amplification of inflammatory responses. *Circulation*, 105 (2002), pp. 816–822.
- Bhakar AL, Tannis LL, Zeindler C, Russo MP, Jobin C, Park DS, MacPherson S, Barker PA. 2002. Constitutive nuclear factor-k B activity is required for central neuron survival. *J Neurosci* 22: 8466–8475.
- Bianchi Marco E., DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. *J Leukoc Biol.* 2007 Jan;81(1):1-5.
- Bianchi R, Giambanco I, Donato R. S100B/RAGE-dependent activation of microglia via NF κ B and AP-1. Co-regulation of COX-2 expression by S100B, IL-1 β and TNF- α . *Neurobiol Aging.* 2008 Apr;31(4):665-77.
- Bianchi Roberta, Cecilia Adami, Ileana Giambanco, and Rosario Donato. S100B binding to RAGE in microglia stimulates COX-2 expression. *J Leukoc Biol.* 2007 Jan;81(1):108-18.

- Bianchi Roberta, Eirini Kastrisianaki¹, Ileana Giambanco and Rosario Donato. S100B protein stimulates microglia migration via RAGE-dependent upregulation of chemokine expression and release. *J Biol Chem*. 2011 Mar 4;286(9):7214-26.
- Bierhaus A, Stern DM, Nawroth PP. RAGE in inflammation: a new therapeutic target? *Curr Opin Investig Drugs*. 2006 Nov;7(11):985-91.
- Boccia M, Freudenthal R, Blake M, de la Fuente V, Acosta G, Baratti C, A. Activation of hippocampal nuclear factor-kappaB by retrieval is required for memory reconsolidation. *J Neurosci*. 2007 Dec 5;27(49):13436-45.
- Bohacek I, Cordeau P, Lalancette-Hébert M, Gorup D, Weng YC, Gajovic S, Kriz J. Toll-like receptor 2 deficiency leads to delayed exacerbation of ischemic injury. *J Neuroinflammation*. 2012 Aug 8;9:191.
- Bramanti V, Tomassoni D, Avitabile M, Amenta F, Avola R. Biomarkers of glial cell proliferation and differentiation in culture. 2010 Jan 1;2:558-70.
- Brambilla R, Couch Y, Lambertsen KL. The effect of stroke on immune function. *Mol Cell Neurosci*. 2013 Mar;53:26-33.
- Brambilla R, Bracchi-Ricard V, Hu WH, Frydel B, Bramwell A, Karmally S, Green EJ, Bethea JR. Inhibition of astroglial nuclear factor kappaB reduces inflammation and improves functional recovery after spinal cord injury. *J Exp Med*. 2005 Jul 4;202(1):145-56.
- 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 Mar 1;182(5):2628-40.
- Brea D, Blanco M, Ramos-Cabrer P, Moldes O, Arias S, Pérez-Mato M, Leira R, Sobrino T, Castillo J. Toll-like receptors 2 and 4 in ischemic stroke: outcome and therapeutic values. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2011 Jun;31(6):1424-31.
- Brett J, Schmidt AM, Yan SD, Zou YS, Weidman E, Pinsky D, Nowygrad R, Nepper M, Przysiecki C, Shaw A. Survey of the distribution of a newly characterized receptor for advanced glycation end products in tissues. *Am J Pathol*. 1993 Dec;143(6):1699-712.
- Brown RW, Chirala R Utility of microwave-citrate antigen retrieval in diagnostic immunohistochemistry. *Mod Pathol*. (1995) 8(5):515-20.
- 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 May 15;177(10):1135-41.

- Butler TL(1), Kassed CA, Sanberg PR, Willing AE, Pennypacker KR. Neurodegeneration in the rat hippocampus and striatum after middle cerebral artery occlusion. *Brain Res.* 2002 Mar 8;929(2):252-60.
- Calderon TM, Eugenin EA, Lopez L, Kumar SS, Hesselgesser J, Raine CS, Berman JW. A role for CXCL12 (SDF-1alpha) in the pathogenesis of multiple sclerosis: regulation of CXCL12 expression in astrocytes by soluble myelin basic protein. *J Neuroimmunol.* 2006 Aug;177(1-2):27-39.
- Carlén M, Meletis K, Göritz C, Darsalia V, Evergren E, Tanigaki K, Amendola M, Barnabé-Heider F, Yeung MS, Naldini L, Honjo T, Kokaia Z, Shupliakov O, Cassidy RM, Lindvall O, Frisén J. Forebrain ependymal cells are Notch dependent and generate neuroblasts and astrocytes after stroke *Nat Neurosci.* 2009 Mar;12(3):259-67.
- Cassina P, Pehar M, Vargas MR, Castellanos R, Barbeito AG, Estévez AG, Thompson JA, Beckman JS, Barbeito L. Astrocyte activation by fibroblast growth factor 1 and motor neuron apoptosis: implications for amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurochem.* 2005 Apr;93(1):38-46.
- Chamorro Á, Meisel A, Planas AM, Urra X, van de Beek D, Veltkamp R. The immunology of acute stroke. *Nat Rev Neurol.* 2012 Jun 5;8(7):401-10.
- 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 Sep;31(9):913-20. 1.
- Chen CJ, Liao SL, Huang YS, Chiang AN. 2005. RhoA inactivation is crucial to manganese-induced astrocyte stellation. *Biochem Biophys Res Commun* 326:873-879.
- Chen G, Severo MS, Sakhon OS, Choy A, Herron MJ, Felsheim RF, Wiryawan H, Liao J, Johns JL, Sutterwala FS, Kotsyfakis M, Pedra JH. *Anaplasma phagocytophilum* dihydrolipoamide dehydrogenase 1 affects host-derived immunopathology during microbial colonization. *Infect Immun.* 2012 Sep;80(9):3194-205.
- Chen LF, Greene WC. Shaping the nuclear action of NF-kappaB. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2004 May;5(5):392-401. Review.
- Chen X, Zhang Q, Cheng Q, Ding F. Protective effect of salidroside against H₂O₂-induced cell apoptosis in primary culture of rat hippocampal neurons. *Mol Cell Biochem.* 2009 Dec;332(1-2):85-93.

- Choi, D.W., 1985. Glutamate neurotoxicity in cortical cell culture is calcium dependent. *Neurosci. Lett.* 58, 293–297.
- Chou Denise K. H., Jinghua Zhang, Frances I. Smith, Peter McCaffery and Firoze B. Jungalwala. Developmental expression of receptor for advanced glycation end products (RAGE), amphoterin and sulfoglucuronyl (HNK-1) carbohydrate in mouse cerebellum and their role in neurite outgrowth and cell migration. *J Neurochem.* 2004 Sep;90(6):1389-401.
- Clark MA, Tran H, Nguyen C. Angiotensin III stimulates ERK1/2 mitogen activated protein kinases and astrocyte growth in cultured ratastrocytes. *Neuropeptides.* 2011 Oct;45(5):329-35.
- Cogswell JP, Godlevski MM, Wisely GB, Clay WC, Leesnitzer LM, Ways JP, Gray JG. NF-kappa B regulates IL-1 beta transcription through a consensus NF-kappa B binding site and a nonconsensus CRE-like site. *J Immunol.* 1994 Jul 15;153(2):712-23.
- Craft JM, Watterson DM, Marks A, Van Eldik LJ. Enhanced susceptibility of S-100B transgenic mice to neuroinflammation and neuronal dysfunction induced by intracerebroventricular infusion of human beta-amyloid. *Glia.* 2005 Aug 15;51(3):209-16.
- Cumbler E, Wald H, Bhatt DL, Cox M, Xian Y, Reeves M, Smith EE, Schwamm L, Fonarow GC. Quality of Care and Outcomes for In-Hospital Ischemic Stroke: Findings From the National Get With The Guidelines-Stroke. *Stroke.* 2013 Nov 19. [Epub ahead of print].
- Dale N, Frenguelli BG. Release of adenosine and ATP during ischemia and epilepsy. *Curr Neuropharmacol.* 2009 Sep;7(3):160-79.
- Dassan Pooja, Geoffrey Keir, Martin M. Brown. Criteria for a Clinically Informative Serum Biomarker in Acute Ischaemic Stroke: A Review of S100B. *Cerebrovasc Dis* 2009;27:295–302.
- Davey GE, Murmann P, Heizmann CW. 2001. Intracellular Ca²⁺ and Zn²⁺ levels regulate the alternative cell density-dependent secretion of S100B in human glioblastoma cells. *J Biol Chem* 276:30819-30826.
- Dawson, L.A., Djali, S., Gonzales, C., Vinegra, M.A., Zaleska, M.M., 2000. Characterization of transient focal ischemia-induced increases in extracellular glutamate and aspartate in spontaneously hypertensive rats. *Brain Res. Bull.* 53, 767–776.
- Del Zoppo GJ, Sharp FR, Heiss WD, Albers GW. Heterogeneity in the penumbra. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2011 Sep;31(9):1836-51.

- Del Zoppo GJ. Stroke and neurovascular protection. *N Engl J Med.* 2006 Feb 9;354(6):553-5.
- Del Zoppo GJ. The neurovascular unit in the setting of stroke. *J Intern Med.* 2010 February ; 267(2): 156–171.
- 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 Jun;1793(6):1008-22.
- Drejer, J., Benveniste, H., Diemer, N.H., Schousboe, A., 1985. Cellular origin of ischemia-induced glutamate release from brain tissue *in vivo* and *in vitro*. *J. Neurochem.* 45, 145–151.
- Eng LF, Ghirnikar RS, Lee YL. Glial fibrillary acidic protein: GFAP-thirty-one years (1969-2000). *Neurochem Res.* 2000 Oct;25(9-10):1439-51.
- Eng LF. Glial fibrillary acidic protein (GFAP): the major protein of glial intermediate filaments in differentiated astrocytes. *J Neuroimmunol.* 1985 Jun;8(4-6):203-14.
- Fan H, Li L, Zhang X, Liu Y, Yang C, Yang Y, Yin J. Oxymatrine downregulates TLR4, TLR2, MyD88, and NF-kappaB and protects rat brains against focal ischemia. *Mediators Inflamm.* 2009;:704706.
- Fan W, Cooper NG. Glutamate-induced NFkappaB activation in the retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2009 Feb;50(2):917-25.
- Federman N, de la Fuente V, Zalcman G, Corbi N, Onori A, Passananti C, Romano A. Nuclear factor κ B-dependent histone acetylation is specifically involved in persistent forms of memory. *J Neurosci.* 2013 Apr 24;33(17):7603-14.
- Fields RD, Stevens-Graham B. New insights into neuron-glia communication. *Science.* 2002 Oct 18;298(5593):556-62.
- Figueiredo BC, Piccardo P, Maysinger D, Clarke PB, Cuello AC. Effects of acidic fibroblast growth factor on cholinergic neurons of nucleus basalis magnocellularis and in a spatial memory task following cortical devascularization. *Neuroscience.* 1993 Oct;56(4):955-63.
- Font-Nieves M, Sans-Fons MG, Gorina R, Bonfill-Teixidor E, Salas-Pérdomo A, Márquez-Kisinousky L, Santalucia T, Planas AM. Induction of COX-2 enzyme and down-regulation of COX-1 expression by lipopolysaccharide (LPS) control prostaglandin E2 production in astrocytes. *J Biol Chem.* 2012 Feb 24;287(9):6454-68.
- Freundenthal R, Boccia MM, Acosta GB, Blake MG, Merlo E, Baratti CM, Romano A. NF-kappaB transcription factor is required for inhibitory avoidance long-term memory in mice. *Eur J Neurosci.* 2005 May;21(10):2845-52.

- Froehler MT, Ovbiagele B. Therapeutic hypothermia for acute ischemic stroke. *Expert Rev Cardiovasc Ther.* 2010 Apr;8(4):593-603.
- Gabriel C, Justicia C, Camins A, Planas AM. Activation of nuclear factor-kappaB in the rat brain after transient focal ischemia. *Brain Res Mol Brain Res.* 1999 Feb 19;65(1):61-9.
- Gabryel B, Pudelko A, Malecki A. Erk1/2 and Akt kinases are involved in the protective effect of aniracetam in astrocytes subjected to simulated ischemia in vitro. *Eur J Pharmacol.* 2004 Jun 28;494(2-3):111-20.
- Gelderblom, M., Leyboldt, F., Steinbach, K., Behrens, D., Choe, C. U., Siler, D. A., Arumugam, T. V., Orthey, E., Gerloff, C., Tolosa, E., Magnus, T. Temporal and spatial dynamics of cerebral immune cell accumulation in stroke. *Stroke* (2009) 40, 1849–1857.
- Gerlach R, Demel G, König HG, Gross U, Prehn JH, Raabe A, Seifert V, Kogel D. 2006. Active secretion of S100B from astrocytes during metabolic stress. *Neuroscience* 141:1697-1701.
- Goffi F, Boroni F, Benarese M, Sarnico I, Benetti A, Spano PF, Pizzi M. The inhibitor of I kappa B alpha phosphorylation BAY 11-7082 prevents NMDA neurotoxicity in mouse hippocampal slices. *Neurosci Lett.* 2005 Apr 4;377(3):147-51.
- Gonçalves DS, Lenz G, Karl J, Gonçalves CA, Rodnight R. Extracellular S100B protein modulates ERK in astrocyte cultures. *Neuroreport.* 2000 Mar 20;11(4):807-9.
- Gorina R, Font-Nieves M, Márquez-Kisinousky L, Santalucia T, Planas AM. Astrocyte TLR4 activation induces a proinflammatory environment through the interplay between MyD88-dependent NFkB signaling, MAPK, and Jak1/Stat1 pathways. *Glia.* 2011 Feb;59(2):242-55.
- Guerra MC, Tortorelli LS, Galland F, Da Ré C, Negri E, Engelke DS, Rodrigues L, Leite MC, Gonçalves CA. Lipopolysaccharide modulates astrocytic S100B secretion: a study in cerebrospinal fluid and astrocyte cultures from rat. *J Neuroinflammation.* 2011 Oct 4;8:128.
- Gutiérrez H, Hale VA, Dolcet X, Davies A. 2005. NF-kB signaling regulates the growth of neural processes in the developing PNS and CNS. *Development* 132: 1713–1726.
- Hajime Kono, M.D. Ph.D and Kenneth L. Rock, M.D. How dying cells alert the immune system to danger. *Nat Rev Immunol.* 2008 April ; 8(4): 279–289.
- Hamdi Y, Kaddour H, Vaudry D, Bahdoudi S, Douiri S, Leprince J, Castel H, Vaudry H, Tonon MC, Amri M, Masmoudi-Kouki O. The octadecaneuropeptide ODN protects

- astrocytes against hydrogen peroxide-induced apoptosis via a PKA/MAPK-dependent mechanism. *PLoS One*. 2012;7(8):e42498.
- Han Y, He T, Huang DR, Pardo CA, Ransohoff RM. TNF-alpha mediates SDF-1 alpha-induced NF-kappa B activation and cytotoxic effects in primary astrocytes. *J Clin Invest*. 2001 Aug;108(3):425-35.
 - Hassid BG, Nair MN, Ducruet AF, Otten ML, Komotar RJ, Pinsky DJ, Schmidt AM, Yan SF, Connolly ES. Neuronal RAGE expression modulates severity of injury following transient focal cerebral ischemia. *J Clin Neurosci*. 2009 Feb;16(2):302-6.
 - Hayakata T., T. Shiozaki, O. Tasaki, H. Ikegawa, Y. Inoue, F. Toshiyuki, H. Hosotubo, F. Kieko, T. Yamashita, H. Tanaka, T. Shimazu, H. Sugimoto. Changes in CSF S100B and cytokine concentrations in early-phase severe traumatic brain injury. *Shock*, 22 (2004), pp. 102–107.
 - Hayden MS, Ghosh S. NF-κB, the first quarter century: remarkable progress and outstanding questions. *Genes Dev*. 2012 Feb 1;26(3):203-34.
 - Hemmen TM, Lyden PD. Induced hypothermia for acute stroke. *Stroke*. 2007;38:794–799.
 - Hemmen TM, Raman R, Gomez JA, Cruz-Flores S, Wijman CA, Rapp KS, Grotta JC, Lyden PD. Intravenous thrombolysis plus hypothermia for acute treatment of ischemic stroke (ICTuS-I): final results. *Stroke*. 2010; 41:e246
 - Henn A, Kirner S, Leist M. TLR2 hypersensitivity of astrocytes as functional consequence of previous inflammatory episodes. *J Immunol*. 2011 Mar 1;186(5):3237-47.
 - Herrmann O, Baumann B, de Lorenzi R, Muhammad S, Zhang W, Kleesiek J, Malfertheiner M, Köhrmann M, Potrovita I, Maegele I, Beyer C, Burke JR, Hasan MT, Bujard H, Wirth T, Pasparakis M, Schwaninger M. IKK mediates ischemia-induced neuronal death. *Nat Med*. 2005 Dec;11(12):1322-9.
 - Hoarau JJ, Krejbich-Trotot P, Jaffar-Bandjee MC, Das T, Thon-Hon GV, Kumar S, Neal JW, Gasque P. Activation and control of CNS innate immune responses in health and diseases: a balancing act finely tuned by neuroimmune regulators (NIReg). *J Clin Invest*. 2012 Apr 2;122(4):1164-71.
 - Hofmann M.A., S. Drury, C. Fu, W. Qu, A. Taguchi, Y. Lu, C. Avila, N. Kambham, A. Bierhaus, P. Nawroth, M.F. Neurath, T. Slattery, D. Beach, J. McClary, M. Nagashima, J. Morser, D. Stern, A.M. Schmidt. RAGE mediates a novel proinflammatory axis: a central cell surface receptor for S100/calgranulin polypeptides. *Cell*, 97 (1999), pp. 889–901.

- Hofmeijer J, van Putten MJ. Ischemic cerebral damage: an appraisal of synaptic failure. *Stroke*. 2012 Feb;43(2):607-15.
- Hori Osamu, Jerold Brett, Timothy Slattery, Rong Cao, Jinghua Zhang, Jing Xian Chen, Mariko Nagashima, Erik R. Lundh, Sharmila Vijay, Di Nitecki, John Morser, David Stern, and Ann Marie Schmidt. The receptor for advanced glycation end products (RAGE) is a cellular binding site for amphoterin. Mediation of neurite outgrowth and co-expression of rage and amphoterin in the developing nervous system. *J Biol Chem*. 1995 Oct 27;270(43):25752-61.
- Hu J, Van Eldik LJ. 1996. S100 beta induces apoptotic cell death in cultured astrocytes via a nitric oxide-dependent pathway. *Biochim Biophys Acta* 1313:239-245.
- Hu Jingru, Ferreira A and Van Eldik LJ, S100beta induces neuronal cell death through nitric oxide release from astrocytes, *J. Neurochem*. 69(1997) 2294-2301.
- Hu J, Van Eldik LJ. Glial –derived proteins activate cultured astrocytes and enhance beta amyloid-induced glial activation. *Brain Res*. 1999 Sep 18;842(1):46-54.
- Hudson B.I., A.Z. Kalea, M. Del Mar Arriero, E. Harja, E. Boulanger, V. D'Agati, A.M. Schmidt, Interaction of the RAGE cytoplasmic domain with diaphanous-1 is required for ligand-stimulated cellular migration through activation of Rac1 and Cdc42, *J. Biol. Chem* 283 (2008) 34457–34468.
- Hussain AR, Ahmed SO, Ahmed M, Khan OS, Al Abdulmohsen S, Platanius LC, Al-Kuraya KS, Uddin S. Cross-talk between NFkB and the PI3-kinase/AKT pathway can be targeted in primary effusion lymphoma (PEL) cell lines for efficient apoptosis. *PLoS One*. 2012;7(6):e39945.
- Hutchins JB, Barger SW. Why neurons die: cell death in the nervous system. *Anat Rec*. 1998 Jun;253(3):79-90.
- Huttunen HJ, Fages C, Rauvala H. Receptor for advanced glycation end products (RAGE)-mediated neurite outgrowth and activation of NF-kappaB require the cytoplasmic domain of the receptor but different downstream signaling pathways. *J Biol Chem*. 1999 Jul 9;274(28):19919-24.
- 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 Oct 11;277(41):38635-46.
- Huttunen HJ, Kuja-Panula J, Sorci G, Agneletti AL, Donato R, Rauvala H. Coregulation of neurite outgrowth and cell survival by amphoterin and S100 proteins

- through receptor for advanced glycation end products (RAGE) activation. *J Biol Chem*. 2000 Dec 22;275(51):40096-105.
- Iadecola C, Anrather J. The immunology of stroke: from mechanisms to translation. *Nat Med*. 2011; 17(7):796–808.
 - Inta I, Paxian S, Maegele I, Zhang W, Pizzi M, Spano P, Sarnico I, Muhammad S, Herrmann O, Inta D, Baumann B, Liou HC, Schmid RM, Schwaninger M. Bim and Noxa are candidates to mediate the deleterious effect of the NF-kappa B subunit RelA in cerebral ischemia. *JNeurosci*. 2006 Dec 13;26(50):12896-903.
 - Iori V, Maroso M, Rizzi M, Iyer AM, Vertemara R, Carli M, Agresti A, Antonelli A, Bianchi ME, Aronica E, Ravizza T, Vezzani A. Receptor for Advanced Glycation Endproducts is upregulated in temporal lobe epilepsy and contributes to experimental seizures. *Neurobiol Dis*. 2013 Oct;58:102-14.
 - Jiang Z, Zhang Y, Chen X, Lam PY, Yang H, Xu Q, Yu AC. Activation of Erk1/2 and Akt in astrocytes under ischemia. *Biochem Biophys Res Commun*. 2002 Jun 14;294(3):726-33.
 - Jin Rong, Guojun Yang and Guohong Li Inflammatory mechanisms in ischemic stroke: role of inflammatory cells.. *J Leukoc Biol*. 2010 May;87(5):779-89.
 - Jun-Sub Choi, Jeong-a. Kim , Dong-Hwan Kim , Myung-Hun Chun , Byung J. Gwag , Sungjoo Kim Yoonc, Choun-Ki Joo. Failure to activate NF-kB promotes apoptosis of retinal ganglion cells following optic nerve transection. *Brain Res* 883 (2000) 60–68.
 - Kaltschmidt B, Kaltschmidt C. NF-kappaB in the nervous system. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2009 Sep;1(3):a001271.
 - Kamel H, Iadecola C. Brain-immune interactions and ischemic stroke: clinical implications. *Arch Neurol*. 2012 May;69(5):576-81.
 - Kanai K, Nunoya T, Shibuya K, Nakamura T, Tajima. Variations in effectiveness of antigen retrieval pretreatments for diagnostic immunohistochemistry. *Res Vet Sci*. M. 1998. 64(1):57-61.
 - Katzan IL, Hammer MD, Hixson ED, Furlan AJ, Abou-Chebl A, Nadzam DM; Cleveland Clinic Health System Stroke Quality Improvement Team. *Arch Neurol*. 2004 Mar;61(3):346-50.
 - Kelley RE, Kovacs AG. Mechanism of in-hospital cerebral ischemia. *Stroke*. 1986 May-Jun;17(3):430-3.
 - Kilic E, Kilic U, Soliz J, Bassetti CL, Gassmann M, Hermann DM. Brain-derived erythropoietin protects from focal cerebral ischemia by dual activation of ERK-1/-2 and Akt pathways. *FASEB J*. 2005 Dec;19(14):2026-8. Epub 2005 Oct 5.

- Kim D, Kim MA, Cho IH, Kim MS, Lee S, Jo EK, Choi SY, Park K, Kim JS, Akira S, Na HS, Oh SB, Lee SJ. A critical role of toll-like receptor 2 in nerve injury-induced spinal cord glial cell activation and pain hypersensitivity. *J Biol Chem.* 2007 May 18;282(20):14975-83.
- Kim J, Wong PK. Oxidative stress is linked to ERK1/2-p16 signaling-mediated growth defect in ATM-deficient astrocytes. *J Biol Chem.* 2009 May 22;284(21):14396-404. doi: 10.1074/jbc.M808116200.
- Kleindienst A, Harvey HB, Rice AC, Müller C, Hamm RJ, Gaab MR, Bullock MR. Intraventricular infusion of the neurotrophic protein S100B improves cognitive recovery after fluid percussion injury in the rat. *J Neurotrauma.* 2004 May;21(5):541-7.
- 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 Jun;22(6):645-55.
- Kleinig TJ, Vink R. Suppression of inflammation in ischemic and hemorrhagic stroke: therapeutic options. *Curr Opin Neurol.* 2009 Jun;22(3):294-301.
- Ko HW, Park KY, Kim H, Han PL, Kim YU, Gwag BJ, Choi EJ. Ca²⁺-mediated activation of c-Jun N-terminal kinase and nuclear factor kappa B by NMDA in cortical cell cultures. *J Neurochem.* 1998;71:1390–1395.
- Kogel D., Peters M., König H. G., Hashemi S. M., Bui N. T., Arolt V., Rothermundt M. and Prehn J. H. 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, 913–920.*
- Kostandy BB. The role of glutamate in neuronal ischemic injury: the role of spark in fire. *Neurol Sci.* 2012 Apr;33(2):223-37.
- Kruczek C, Görg B, Keitel V, Pirev E, Kröncke KD, Schliess F, Häussinger D. Hypoosmotic swelling affects zinc homeostasis in cultured rat astrocytes. *Glia.* 2009 Jan 1;57(1):79-92.
- Lai TW, Zhang S, Wang YT. Excitotoxicity and stroke: Identifying novel targets for neuroprotection. *Prog Neurobiol.* 2013 Dec 17. pii: S0301-0082(13)00130-5.
- 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 NFkappaB. *Neurobiol Aging.* 2001 Sep-Oct;22(5):765-72.
- Lau A, Tymianski M. Glutamate receptors, neurotoxicity and neurodegeneration. *Pflugers Arch.* 2010 Jul;460(2):525-42.

- Le HT, Sin WC, Lozinsky S, Bechberger J, Vega JL, Guo XQ, Saez JC, Naus CC. Gap junction intercellular communication mediated by connexin43 in astrocytes is essential for their resistance to oxidative stress J Biol Chem. 2013 Dec 3. [Epub ahead of print]
- Leite MC, Galland F, de Souza DF, Guerra MC, Bobermin L, Biasibetti R, Gottfried C, Gonçalves CA. Gap junction inhibitors modulate S100B secretion in astrocyte cultures and acute hippocampal slices. J Neurosci Res. 2009 Aug 15;87(11):2439-46.
- Li L, Lundkvist A, Andersson D, Wilhelmsson U, Nagai N, Pardo AC, Nodin C, Staahlberg A, Aprico K, Kerstin Larsson, Takeshi Yabe, Lieve Moons, Andrew Fotheringham, Ioan Davies, Peter Carmeliet, Joan P Schwartz, Marcela Pekna, Mikael Kubista, Fredrik Blomstrand, Nicholas Maragakis, Michael Nilsson¹ and Milos Pekny. Protective role of reactive astrocytes in brain ischemia. Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism (2008) 28, 468–481.
- Li J, Qu X, Schmidt AM. 1998. Sp1-binding elements in the promoter of RAGE are essential for amphotericin-mediated gene expression in cultured neuroblastoma cells. J Biol Chem 273:30870-30878.
- Li J. and A. M. Schmidt, "Characterization and functional analysis of the promoter of RAGE, the receptor for advanced glycation end products," Journal of Biological Chemistry, vol. 272, no. 26, pp. 16498–16506, 1997.
- Li W, Wang H, Kuang CY, Zhu JK, Yu Y, Qin ZX, Liu J, Huang L. An essential role for the Id1/PI3K/Akt/NFκB/survivin signalling pathway in promoting the proliferation of endothelial progenitor cells *in vitro*. Mol Cell Biochem. 2012 Apr;363(1-2):135-45.
- Liberto CM, Albrecht PJ, Herx LM, Yong VW, Levison SW. Pro-regenerative properties of cytokine-activated astrocytes. J Neurochem. 2004 Jun;89(5):1092-100.
- Lin CH, You JR, Wei KC, Gean PW. Stimulating ERK/PI3K/NFκB signaling pathways upon activation of mGluR2/3 restores OGD-induced impairment in glutamate clearance in astrocytes. Eur J Neurosci. 2014 Jan;39(1):83-96.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J Biol Chem. 1951 Nov;193(1):265-75.
- Lu WC, Chen CJ, Hsu HC, Hsu HL, Chen L. The adaptor protein SH2B1β reduces hydrogen peroxide induced cell death in PC12 cells and hippocampal neurons. J Mol Signal. 2010 Sep 27;5:17.
- Lucido AL, Suarez Sanchez F, Thostrup P, Kwiatkowski AV, Leal-Ortiz S, Gopalakrishnan G, Liazoghli D, Belkaid W, Lennox RB, Grutter P, Garner CC,

- Colman DR. Rapid assembly of functional presynaptic boutons triggered by adhesive contacts. *J Neurosci*. 2009 Oct 7;29(40):12449-66.
- Lyden P, Krieger DW, Yenari MA, Dietrich WD. Therapeutic hypothermia for acute stroke. *Int J Stroke*. 2006;1:9–19.
 - Matsuguchi T, Musikacharoen T, Ogawa T, Yoshikai Y. Gene expressions of Toll-like receptor 2, but not Toll-like receptor 4, is induced by LPS and inflammatory cytokines in mouse macrophages. *J Immunol*. 2000 Nov 15;165(10):5767-72.
 - Matsui T, Mori T, Tateishi N, Kagamiishi N, Satoh S, Katsube N, Morikawa E, Morimoto T, Ikuta F, Asano T. Astrocytic activation and delayed infarct expansion after permanent focal ischemia in rats. Part I: enhanced astrocytic synthesis of S100B in the periinfarct area precedes delayed infarct expansion. *J Cereb. Flow Metab* (2002). Jun, 22(6): 711-22.
 - Mattson MP, Camandola S. NF-kappaB in neuronal plasticity and neurodegenerative disorders. *J Clin Invest*. 2001 Feb;107(3):247-54.
 - Mattson MP, Meffert MK. Roles for NF-kappaB in nerve cell survival, plasticity, and disease. *Cell Death Differ*. 2006 May;13(5):852-60.
 - Mayo L, Quintana FJ, Weiner HL. The innate immune system in demyelinating disease. *Immunol Rev*. 2012 Jul;248(1):170-87.
 - Maysinger D, Piccardo P, Liberini P, Jalsenjak I, Cuello C. Encapsulated genetically engineered fibroblasts: release of nerve growth factor and effects *in vivo* on recovery of cholinergic markers after devascularizing cortical lesions. *Neurochem Int*. 1994 May;24(5):495-503.
 - Mehta SL, Manhas N, Raghubir R. Molecular targets in cerebral ischemia for developing novel therapeutics. *Brain Res Rev*. 2007 Apr;54(1):34-66. Epub 2007 Jan 12.
 - Melani A, Turchi D, Vannucchi MG, Cipriani S, Gianfriddo M, Pedata F. *Neurochem Int*. ATP extracellular concentrations are increased in the rat striatum during *in vivo* ischemia. 2005 Nov;47(6):442-8.
 - Mello e Souza T, Rohden A, Meinhardt M, Gonçalves CA, Quillfeldt JA. *Physiol Behav*. S100B infusion into the rat hippocampus facilitates memory for the inhibitory avoidance task but not for the open-field habituation. 2000 Oct 1-15;71(1-2):29-33.
 - Montaner J, Mendioroz M, Delgado P, García-Berrocó T, Giralt D, Merino C, Ribó M, Rosell A, Penalba A, Fernández-Cadenas I, Romero F, Molina C, Alvarez-Sabín J, Hernández-Guillamon M. Differentiating ischemic from hemorrhagic stroke using plasma biomarkers: the S100B/RAGE pathway. *J Proteomics*. 2012 Aug 3;75(15):4758-65.

- Morest DK, Silver J. Precursors of neurons, neuroglia, and ependymal cells in the CNS: what are they? Where are they from? How do they get where they are going? *Glia*. 2003 Jul;43(1):6-18.
- Morgan JM, Navabi H, Schmid KW, Jasani B. Possible role of tissue-bound calcium ions in citrate-mediated high-temperature antigen retrieval. *J Pathol*. 1994 Dec;174(4):301-7.
- Mori Takashi, Jun Tan, Gary W. Arendash, Naoki Koyama, Yoshiko Nojima and Terrence Town. Overexpression of Human S100B Exacerbates Brain Damage and Perinfarct Gliosis After Permanent Focal Ischemia. *Stroke* 2008;39;2114-2121.
- Mori Takashi, Takao Asano, and Terrence Town. Targeting S100B in Cerebral Ischemia and in Alzheimer's Disease. *Cardiovasc Psychiatry Neurol*. 2010;2010.
- Moskowitz MA, Lo EH, Iadecola C. The science of stroke: mechanisms in search of treatments. *Neuron*. 2010 Jul 29;67(2):181-98.
- Muhammad S, Barakat W, Stoyanov S, Murikinati S, Yang H, Tracey KJ, Bendszus M, Rossetti G, Nawroth PP, Bierhaus A, Schwaninger M. The HMGB1 receptor RAGE mediates ischemic brain damage. *J Neurosci*. 2008 Nov 12;28(46):12023-31.
- Murray KN, Buggey HF, Denes A, Allan SM. Systemic immune activation shapes stroke outcome. *Mol Cell Neurosci*. 2013 Mar;53:14-25.
- Murta V, Pitossi FJ, Ferrari CC. CNS response to a second pro-inflammatory event depends on whether the primary demyelinating lesion is active or resolved. *Brain Behav Immun*. 2012 Oct;26(7):1102-15.
- Musikachoen T, Matsuguchi T, Kikuchi T, Yoshikai Y. NF-kappa B and STAT5 play important roles in the regulation of mouse Toll-like receptor 2 gene expression. *J Immunol*. 2001 Apr 1;166(7):4516-24.
- Nakajima, K., Kohsaka, S. Microglia: activation and their significance in the central nervous system. *J. Biochem.* (2001) 130, 169–175.
- Napetschnig J, Wu H. Molecular basis of NF-κB signaling. *Annu Rev Biophys*. 2013;42:443-68.
- Neeper Michael, Ann Marie Schmidt, Jerry Brett, ShiD u YanQ, FengW ang, Yu-Ching E. Pan, Keith Elliston, David Stern, and Alan Shaw. Cloning and Expression of a Cell Surface Receptor for Advanced Glycosylation End Products of Proteins. 1992. Vol. 267, No. 21, Issue of July 25, pp. 14998-15004.
- Neumann, H., Schmidt, H., Cavalie, A., Jenne, D.,Wekerle, H., 1997. Major histocompatibility complex (MHC) class I gene expression in single neurons of the central nervous system: differential regulation by interferon (IFN)-gamma and tumor necrosis factor (TNF)-alpha. *J. Exp. Med.* 185, 305–316.

- Neumann, J., Gunzer, M., Gutzeit, H. O., Ullrich, O., Reymann, K. G., Dinkel, K. Microglia provide neuroprotection after ischemia. *FASEB J.* (2006) 20, 714–716.
- Niederberger E, Geisslinger G. Proteomics and NF- κ B: an update. *Expert Rev Proteomics.* 2013 Apr;10(2):189-204.
- Nozaki K, Nishimura M, Hashimoto N. Mitogen-activated protein kinases and cerebral ischemia. *Mol Neurobiol.* 2001 Feb;23(1):1-19.
- Nurmi A, Lindsberg PJ, Koistinaho M, Zhang W, Juettler E, Karjalainen-Lindsberg ML, Weih F, Frank N, Schwaninger M, Koistinaho J. Nuclear factor-kappaB contributes to infarction after permanent focal ischemia. *Stroke.* 2004 Apr;35(4):987-91.
- Oberheim NA, Goldman SA, Nedergaard M. Heterogeneity of astrocytic form and function. *Methods Mol Biol.* 2012; 814:23-45.
- O'Dea E, Hoffmann A. The regulatory logic of the NF-kappaB signaling system. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2010 Jan;2(1):a000216.
- Olney JW, Ho OL. Brain damage in infant mice following oral intake of glutamate, aspartate or cysteine. *Nature.* 1970 Aug 8;227(5258):609-11.
- Olney, J.W., 1971. Glutamate-induced neuronal necrosis in the infant mouse hypothalamus. An electron microscopic study. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 30, 75–90.
- Olney, J.W., Price, M.T., Samson, L., Labruyere, J., 1986. The role of specific ions in glutamate neurotoxicity. *Neurosci. Lett.* 65, 65–71.
- Pahan K, Raymond JR, Singh I. Inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase induces nitric-oxide synthase in lipopolysaccharide- or cytokine-stimulated C6 glial cells. *J Biol Chem.* 1999 Mar 12;274(11):7528-36.
- Pandian JD, Padma V, y col., Stroke and thrombolysis in developing countries, *Intl J Stroke* (2007) 2:17-26.
- Paratcha G, Ledda F, Baars L, Couplier M, Besset V, Anders J, Scott R, Ibáñez CF. Released GFRalpha1 potentiates downstream signaling, neuronal survival, and differentiation via a novel mechanism of recruitment of c-Ret to lipid rafts. *Neuron.* 2001 Jan;29(1):171-84.
- 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 HJ, Kim SK, Yun DH, Kim DH, Chon J, Kim JW, Chung JH. Association of Toll-like receptor 2 polymorphisms with National Institute of Health Stroke Scale scores of ischemic stroke patients. *J Mol Neurosci.* 2012 Mar;46(3):536-40.

- Pasparakis M, Luedde T, Schmidt-Supprian M. Dissection of the NF-kappaB signalling cascade in transgenic and knockout mice. *Cell Death Differ.* 2006 May;13(5):861-72.
- Paxinos G and Watson C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*, 6th Ed, Elsevier, San Diego, 2007.
- Pellicer EM, Sundblad A. Antigen retrieval by microwave oven with buffer of citric acid. *Medicina (B Aires).* (1994) 54(2):129-32.
- Perea G, Navarrete M, Araque A. Tripartite synapses: astrocytes process and control synaptic information. *Trends Neurosci.* 2009 Aug;32(8):421-31.
- Persson L, Hårdemark HG, Gustafsson J, Rundström G, Mendel-Hartvig I, Esscher T, Pålman S. S-100 protein and neuron-specific enolase in cerebrospinal fluid and serum: markers of cell damage in human central nervous system. *Stroke.* 1987 Sep-Oct;18(5):911-8.
- Phulwani NK, Esen N, Syed MM, Kielian T. TLR2 expression in astrocytes is induced by TNF-alpha- and NF-kappa B-dependent pathways. *J Immunol.* 2008 Sep 15;181(6):3841-9.
- Pichiule P, Chávez 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 Dec 14;282(50):36330-40.
- Pizzi M, Sarnico I, Lanzillotta A, Battistin L, Spano P. Post-ischemic brain damage: NF-kappaB dimer heterogeneity as a molecular determinant of neuron vulnerability. *FEBS J.* 2009 Jan;276(1):27-35.
- Planas AM. *Advances in stroke: translational medicine 2012.* *Stroke.* 2013 Feb;44(2):318-9
- 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 Mar;184(1-2):214-22.
- Privat A. Astrocytes as support for axonal regeneration in the central nervous system of mammals. *Glia.* 2003 Jul;43(1):91-3.
- Qiu Jianhua, Jian Xu, Yi Zheng, Ying Wei, Xiaoxia Zhu, Eng H Lo, Michael A Moskowitz, John R Sims. HMGB1 promotes MMP-9 upregulation through TLR4 after cerebral ischemia. *Stroke.* 2010 September; 41(9): 2077–2082.
- Ramakers GJ, Moolenaar WH. Regulation of astrocyte morphology by RhoA and lysophosphatidic acid. *Exp Cell Res.* 1998 15; 245(2):252-262.

- Ramalingam M, Kim SJ. Insulin on hydrogen peroxide-induced oxidative stress involves ROS/Ca²⁺ and Akt/Bcl-2 signaling pathways. *Free Radic Res.* 2014 Jan 7.
- Ramasamy R., Yan S. F. and Schmidt A. M. (2009) RAGE: therapeutic target and biomarker of the inflammatory response-the evidence mounts. *J. Leukoc. Biol.* 86, 505–512.
- 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 Feb 7;27(6):1498-506.
- Ramos AJ, Rubio MD, Defagot C, Hischberg 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) 1030(2): 201-220.
- Ransohoff RM, Brown MA. Innate immunity in the central nervous system. *CNS Neurol Disord Drug Targets.* 2011 Feb;10(1):25-43.
- Rauvala H, Rouhiainen A. Physiological and pathophysiological outcomes of the interactions of HMGB1 with cell surface receptors. *Biochim Biophys Acta.* 2010 Jan-Feb;1799(1-2):164-70.
- Reínés A, Bernier LP, McAdam R, Belkaid W, Shan W, Koch AW, Séguéla P, Colman DR, Dhaunchak AS. N-cadherin prodomain processing regulates synaptogenesis. *J Neurosci.* 2012 May 2;32(18):6323-34.
- Rong L. L., Gooch C. and Szaboles M. (2005) 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.* 23, 355–365.
- Rosin D. L. and Mark D. Okusa. Dangers Within: DAMP Responses to Damage and Cell Death in Kidney Disease. *J Am Soc Nephrol* 22: 416–425, 2011.
- Rossi David J, James D Brady & Claudia Mohr. Astrocyte metabolism and signaling during brain ischemia *Nat Neurosci.* 2007 Nov;10(11):1377-86.
- Rothermundt M, Peters M, Prehn JH, Arolt V. S100B in brain damage and neurodegeneration. *Microsc Res Tech.* 2003. 60:614-632.
- Rothermundt M, Missler U, Arolt V, Peters M, Leadbeater J, Wiesmann M, Rudolf S, Wandinger KP, Kirchner H. Increased S100B blood levels in unmedicated and treated schizophrenic patients are correlated with negative symptomatology. *Mol Psychiatry.* 2001 Jul;6(4):445-9.
- Rothman, S.M. The neurotoxicity of excitatory amino acids is produced by passive chloride influx. *J. Neurosci.* (1985). 5, 1483–1489.

- Rothoerl RD, Woertgen C, Brawanski A. S-100 serum levels and outcome after severe head injury. *Acta Neurochir* (2000). Suppl 76:97-100.
- Sarnico I, 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.* (2009) Jan;108(2):475-85.
- Sathe K, Maetzler W, Lang JD, Mounsey RB, Fleckenstein C, Martin HL, Schulte C, Mustafa S, Synofzik M, Vukovic Z, Itohara S, Berg D, Teismann P. S100B is increased in Parkinson's disease and ablation protects against MPTP-induced toxicity through the RAGE and TNF- α pathway. *Brain.* 2012 Nov;135(Pt 11):3336-47.
- Schafer DP, Lehrman EK, Stevens B. The "quad-partite" synapse: Microglia-synapse interactions in the developing and mature CNS. *Glia.* 2013 Jan;61(1):24-36.
- Schmidt Ann Marie, Maria Vianna, Marlene Gerlach, Jerold Brett, Jane Ryan, Kao Janet, Ciro Esposito, Helen Hegarty, Walter Hurley, Matthias Clauss, Feng Wangl, Yu-Ching E. Panl, T. Christopher Tsang, J and David Ster. Isolation and Characterization of Two Binding Proteins for Advanced Glycosylation End Products from Bovine Lung Which Are Present on the Endothelial Cell Surface. *J Biol Chem* 1992 Vol. 267, 14987-14997.
- Schmidt Ann Marie, Shi Du Yan, Shi Fang Yan , David M. Stern. The biology of the receptor for advanced glycation end products and its ligands. *Biochimica et Biophysica Acta* 1498 (2000) 99-111.
- Schmidt-Ott KM, Xu AD, Tuschick S, Liefeldt L, Kresse W, Verkhratsky A, Kettenmann H, Paul M. Hypoxia reverses dibutyl-cAMP-induced stellation of cultured astrocytes via activation of the endothelin system. *FASEB J.* 2001; 15(7):1227-1229.
- Schmidt-Ullrich R, Memet S, Lilienbaum A, Feuillard J, Raphael M, Israel A. 1996. NF-kB activity in transgenic mice: Developmental regulation and tissue specificity. *Development* 122: 2117–2128.
- Schmued LC, Albertson C, Slikker W Jr. Fluoro-Jade: a novel fluorochrome for the sensitive and reliable histochemical localization of neuronal degeneration. *Brain Res.* 1997 Mar 14;751(1):37-46.
- Schwaninger M, Inta I, Herrmann O. NF-kappaB signalling in cerebral ischaemia. *Biochem Soc Trans.* 2006 Dec;34(Pt 6):1291-4.
- Selinfreund RH, Barger SW, Pledger WJ, Van Eldik LJ. Neurotrophic protein S100 beta stimulates glial cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci USA* (1991) 88:3554-3558.

- Shi SR, Chaiwun B, Young L, Cote RJ, Taylor CR. Antigen retrieval technique utilizing citrate buffer or urea solution for immunohistochemical demonstration of androgen receptor in formalin-fixed paraffin sections. *J Histochem Cytochem*. 1993 Nov;41(11):1599-604.
- Shichita T, Ago T, Kamouchi M, Kitazono T, Yoshimura A, Ooboshi H. Novel therapeutic strategies targeting innate immune responses and early inflammation after stroke. *J Neurochem*. 2012 Nov;123 Suppl 2:29-38.
- Shih AY, Blinder P, Tsai PS, Friedman B, Stanley G, Lyden PD, Kleinfeld D. The smallest stroke: occlusion of one penetrating vessel leads to infarction and a cognitive deficit. *Nat Neurosci*. 2013 Jan;16(1):55-63. doi: 10.1038/nn.3278. Epub 2012 Dec 16.
- Shimada IS, LeComte MD, Granger JC, Quinlan NJ, Spees JL. Self renewal and differentiation of reactive astrocyte derived neural stem/progenitor cells isolated from the cortical peri-infarct area after stroke. *J Neurosci*. 2012 Jun 6;32(23):7926-40.
- Shimamura H, Terada Y, Okado T, Tanaka H, Inoshita S, Sasaki S. The PI3-kinase-Akt pathway promotes mesangial cell survival and inhibits apoptosis in vitro via NF-kappa B and Bad. *J Am Soc Nephrol*. 2003 Jun;14(6):1427-34.
- Shin YJ, Kim HL, Park JM, Cho JM, Kim SY, Lee MY. Characterization of nestin expression and vessel association in the ischemic core following focal cerebral ischemia in rats. *Cell Tissue Res*. 2013 Mar;351(3):383-95.
- Sims GP, Rowe DC, Rietdijk ST, Herbst R, Coyle AJ. HMGB1 and RAGE in inflammation and cancer. *Annu Rev Immunol*. 2010;28:367-88.
- Sipos E, Kurunczi A, Kasza A, Horváth J, Felszeghy K, Laroche S, Toldi J, Párducz A, Penke B, Penke Z. Beta-amyloid pathology in the entorhinal cortex of rats induces memory deficits: implications for Alzheimer's disease. *Neuroscience*. 2007 Jun 15;147(1):28-36.
- Sofroniew MV. Molecular dissection of reactive astrogliosis and glial scar formation. *Trends Neurosci*. 2009 Dec;32(12):638-47.
- Sorci Guglielmo, Francesca Riuzzi, Cataldo Arcuri, Claudia Tubaro, Roberta Bianchi, Ileana Giambanco, Rosario Donato. S100B protein in tissue development, repair and regeneration. *World J Biol Chem* 2013 February 26; 4(1): -12.
- Sorci Guglielmo, Roberta Bianchi, Francesca Riuzzi, Claudia Tubaro, Cataldo Arcuri, Ileana Giambanco and Rosario Donato. S100B Protein, a Damage Associated Molecular Pattern Protein in the Brain and Heart, and Beyond. *Cardiovasc Psychiatry Neurol*. 2010;2010.

- Sposato LA, Esnaola MM, Zamora R, Zurrú MC, Fustinoni O, Saposnik G; ReNACer. Quality of ischemic stroke care in emerging countries: the Argentinian National Stroke Registry (ReNACer). *Stroke*. 2008 Nov;39(11):3036-41.
- Stevens, S. L., Bao, J., Hollis, J., Lessov, N. S., Clark, W. M., Stenzel- Poore, M. P. The use of flow cytometry to evaluate temporal changes in inflammatory cells following focal cerebral ischemia in mice. *Brain Res.* (2002) 932, 110–119.
- Streit, W. J. Microglia as neuroprotective, immunocompetent cells of the CNS. *Glia* (2002) 40, 133–139.
- Strong K, Mathers C, Bonita R. Preventing stroke: saving lives around the world. *Lancet Neurol.* 2007 Feb;6(2):182-7.
- Szydłowska K, Tymianski M. Calcium, ischemia and excitotoxicity. *Cell Calcium.* 2010 Feb;47(2):122-9.
- Terai K, Matsuo A, McGeer EG, McGeer PL. Enhancement of immunoreactivity for NF-kappa B in human cerebral infarctions. *Brain Res.* 1996 Nov 11;739(1-2):343-9.
- Tong E, Hou Q, Fiebach JB, Wintermark M. The role of imaging in acute ischemic stroke. *Neurosurg Focus.* 2014 Jan;36(1):E3.
- 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 Mar 1;542(2):280-5.
- Verkhatsky A, Sofroniew MV, Messing A, deLanerolle NC, Rempe D, Rodríguez JJ, Nedergaard M. Neurological diseases as primary gliopathies: a reassessment of neurocentrism. *ASN Neuro.* 2012 Apr 5;4(3).
- Villarreal A, Seoane R, González TA, Rosciszewski G, Angelo MF, Rossi A, Barker P A, Ramos AJ. S100B protein activates a RAGE-dependent autocrine loop in astrocytes: Implications for its role in the propagation of reactive gliosis, *J. Neurochem.* (en revision).
- Wang CY, Mayo MW, Korneluk RG, Goeddel DV, Baldwin AS Jr. NF-kappaB antiapoptosis: induction of TRAF1 and TRAF2 and c-IAP1 and c-IAP2 to suppress caspase-8 activation. *Science.* 1998 Sep 11;281(5383):1680-3.
- Wang T, Lafuse WP, Zwilling BS. NFkappaB and Sp1 elements are necessary for maximal transcription of toll-like receptor 2 induced by *Mycobacterium avium*. *J Immunol.* 2001 Dec 15;167(12):6924-32.
- Wang ZQ, Wu DC, Huang FP, Yang GY. Inhibition of MEK/ERK 1/2 pathway reduces pro-inflammatory cytokine interleukin-1 expression in focal cerebral ischemia. *Brain Res.* 2004 Jan 16;996(1):55-66.

- Wanner Ina B., Mark A. Anderson, Bingbing Song, Jaclynn Levine, Ana Fernandez, Zachary Gray-Thompson, Yan Ao, and Michael V. Sofroniew. Spinal Cord Injury Glial Scar Borders Are Formed by Newly Proliferated, Elongated Astrocytes That Interact to Corral Inflammatory and Fibrotic Cells via STAT3-Dependent Mechanisms after spinal cord injury. *The Journal of Neuroscience*, July 31, 2013 • 33(31):12870 – 12886.
- 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 Nov;119(5):1209-18.
- White, R.J., Reynolds, I.J., 1995. Mitochondria and Na⁺/Ca²⁺ exchange buffer glutamate-induced calcium loads in cultured cortical neurons. *J. Neurosci.: Off. J. Soc. Neurosci.* 15, 1318–1328.
- 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 Nov 14;103(46):17513-8.
- Winters L, Winters T, Gorup D, Mitrečić D, Curlin M, Križ J, Gajović S. Expression analysis of genes involved in TLR2-related signaling pathway: Inflammation and apoptosis after ischemic brain injury. *Neuroscience*. 2013 May 15;238:87-96.
- Xia YP, Dai RL, Li YN, Mao L, Xue YM, He QW, Huang M, Huang Y, Mei YW, Hu B. The protective effect of sonic hedgehog is mediated by the phosphoinositide [corrected] 3-kinase/AKT/Bcl-2 pathway in cultured rat astrocytes under oxidative stress. *Neuroscience*. 2012 May 3;209:1-11.
- Yan SF, Yan SD, Ramasamy R, Schmidt AM. Tempering the wrath of RAGE: an emerging therapeutic strategy against diabetic complications, neurodegeneration, and inflammation. *Ann Med*. 2009;41(6):408-22.
- Yang C, Iyer RR, Yu AC, Yong RL, Park DM, Weil RJ, Ikejiri B, Brady RO, Lonser RR, Zhuang Z. β -Catenin signaling initiates the activation of astrocytes and its dysregulation contributes to the pathogenesis of astrocytomas. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012 May 1;109(18):6963-8.
- Yang H, Cheng XP, Li JW, Yao Q, Ju G. De differentiation response of cultured astrocytes to injury induced by scratch or conditioned culture medium of scratch-insulted astrocytes. *Cell Mol Neurobiol*. 2009 Jun;29(4):455-73.
- Yang QW, Wang JZ, Li JC, Zhou Y, Zhong Q, Lu FL, Xiang J. High-mobility group protein box-1 and its relevance to cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2010 Feb;30(2):243-54.

- Yenari MA, Hemmen TM. Therapeutic hypothermia for brain ischemia: where have we come and where do we go?. *Stroke*. 2010 Oct;41(10 Suppl):S72-4.
- Zamanian JL, Xu L, Foo LC, Nouri N, Zhou L, Giffard RG, Barres BA. Genomic analysis of reactive astrogliosis. *J Neurosci*. 2012 May 2;32(18):6391-410.
- Zhai Dong-Xu, Qing-Fei Kong, Wang-Shu Xu, Sha-Sha Bai, Hai-Sheng Peng, Kai Zhao, Guo Zhong Li, Dan-Dan Wang, Bo Sun, Jing-Hua Wang, Guang-You Wang, Hu-Lun Li. RAGE expression is up-regulated in human cerebral ischemia and pMCAO rats. *Neuroscience Letters* 445 (2008) 117–121.
- Zhang Q, Huang WD, Lv XY, Yang YM. Puerarin protects differentiated PC12 cells from H₂O₂-induced apoptosis through the PI3K/Akt signalling pathway. *Cell Biol Int*. 2012 May 1;36(5):419-26.
- Zhang SJ, Ke Z, Li L, Yip SP, Tong KY. EEG patterns from acute to chronic stroke phases in focal cerebral ischemic rats: correlations with functional recovery. *Physiol Meas*. 2013 Apr;34(4):423-35.
- Zhang, L., Zhang, Z. G., Zhang, R. L., Lu, M., Krams, M., Chopp, M. (2003) Effects of a selective CD11b/CD18 antagonist and recombinant human tissue plasminogen activator treatment alone and in combination in a rat embolic model of stroke. *Stroke* 34, 1790–1795.
- Zhang Y, Barres BA. Astrocyte heterogeneity: an underappreciated topic in neurobiology. *Curr Opin Neurobiol*. 2010 Oct;20(5):588-94. 2010 Jul 23.
- Zhong J, Paul A, Kellie SJ, O'Neill GM. Mesenchymal migration as a therapeutic target in glioblastoma. *J Oncol*. 2010. 430142.
- Zhu D, Tan KS, Zhang X, Sun AY, Sun GY, Lee JC. Hydrogen peroxide alters membrane and cytoskeleton properties and increases intercellular connections in astrocytes. *J Cell Sci*. 2005 Aug 15;118(Pt 16):3695-703. Epub 2005 Jul 26.
- Zlokovic BV. The blood-brain barrier in health and chronic neurodegenerative disorders. *Neuron*. 2008 Jan 24;57(2):178-201.

Apéndice

7.1 Materiales

Materiales para cultivo celular

DMEM alta glucosa suplementado con Glutamina 1% (Invitrogen)

OPTI-MEM I Reduced Serum Medium (Invitrogen)

Penicilina/Streptomycin (Invitrogen)

Suero fetal bobino Inactivado e Irradiado para cultivo celular (Natocor)

Placas *multiwell*, botellas, tubos de cultivo, etc (BD, GBO)

Materiales para inmunohistoquímica e inmunofluorescencia

Suero equino (Natocor)

Peróxido de hidrogeno (H₂O₂) (Sigma)

Complejo streptavidina-peroxidasa (Extravidin, Sigma)

Anticuerpos secundarios conjugados a biotina (Sigma)

Anticuerpos secundarios conjugados a Alexa Fluor, FITC, Rhodamina (Jackson)

Materiales inmunoblot

ECL (Pierce)

Acrilamida, Bisacrilamida, APS, Tris-base, etc (Sigma)

Membranas de nitrocelulosa, TEMED, Fuentes, cubas, etc (Biorad)

Anticuerpos secundarios conjugados a peroxidasa (Sigma, Jackson)

Reactivos específicos

Bay 117082 (Sigma) (Goffi y col., 2005; Phulwani y col., 2008)

Sulfasalazina (Sigma) (Freudenthal y col., 2005; Weber y col., 2000; Chávez y col., 2012)

S100B purificada de cerebro bovino (Sigma)

Ly294002 (Sigma) (Pahan y col., 1999; Paratcha y col., 2001)

PD98059 (Sigma) (Kim J y col., 2009; Paratcha y col., 2001)

Bromodioxiridina (Sigma)

7.2 Anticuerpos

Antígeno reconocido	Tipo/Origen	Dilución final	Fabricante
GFAP	Policlonal/Conejo	1/1500	Dako
Vimentina	Monoclonal/Raton	1/1000	Sigma
Nestina	Monoclonal/Rata	1/1000	Hybridome Bank
RAGE	Monoclonal/Raton	1/1000	Millipore
MAP-2	Policlonal/Conejo	1/1000	Millipore
p65	Policlonal/Conejo	1/800	Santa Cruz
p65-NLS	Monoclonal/Raton	1/800	Millipore Cell Signalling
P-p65 (serina 536)	Monoclonal/Raton	1/800	Technnologies
IκB-α	Policlonal/Conejo	1/1000	Santa Cruz
Erk_{1/2} total	Policlonal/Conejo	1/1000	Cell Signalling Tech.
P-Erk_{1/2} (treonina 180/tirosina 182)	Monoclonal/Conejo	1/1000	Cell Signalling Tech.
Akt total	Policlonal/Conejo	1/1000	Cell Signalling Tech.
P-Akt (serina 473)	Monoclonal/Conejo	1/1000	Cell Signalling Tech.
BrdU	Monoclonal/Raton	1/2000	Millipore
NSE	Policlonal/Conejo	1/1000	Sigma
Actina	Monoclonal/Raton	1/20000	Millipore
GAPDH	Monoclonal/Raton	1/1000	Sigma

Tabla 7.1: Lista de anticuerpos primarios utilizados en esta tesis. Se detalla la especificidad, la especie en la que fue generado, la dilución utilizada y el nombre del fabricante.

7.3 Reactivos para RT PCR

Reactivos	Stock	Volumen para una reacción
Buffer RT	10x	2 µl
dNTPs Mix	5Mm	2 µl
OligodT primer	10 µM	2 µl
ARNm	50 ng–2 µg	Variable
Omniscript Reverse Transriptase	0.5 µg/µl	1 µl
Inhibidor de RNasa	(10 unidades/µl)	1 µl
Agua libre de RNasa		Variable
Volumen Final	25 µl	25 µl

Tabla 7.2: Reactivos para la retro transcripción. Se detallan los volúmenes utilizados para la reacción de retro transcripción según del protocolo de Onmiscript de Quiagen.

7.4 Primers

RNA_m	Forward	Reverse	Citas
TLR2	GAAAGATGCGCTTCCTGAAC	CGCCTAAGAGCAGGATCAAC	Fan y col., 2009
IL-1β	ACAACAAAAAAGCCTCGTGCTG	CCATTGAGGTGGAGAGCTTTCA	Murta y col.,2012
α-actina	CACCACTTTCTACAATGAGC	CGGTCAGGATCTTCATGAGG	Ramos y col., 2007

Tabla 7.3: Primers. Se detallan las secuencias de los *primers* utilizados en la reacción de PCR y las citas de donde fueron obtenidos.