

IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN IMPLICADOS EN LA REGULACIÓN DE PROCESOS MOLECULARES Y CEREBROREPARADORES EN EL ICTUS

Susanna Camós Badia

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi doctoral i la seva utilització ha de respectar els drets de la persona autora. Pot ser utilitzada per a consulta o estudi personal, així com en activitats o materials d'investigació i docència en els termes establerts a l'art. 32 del Text Refós de la Llei de Propietat Intel·lectual (RDL 1/1996). Per altres utilitzacions es requereix l'autorització prèvia i expressa de la persona autora. En qualsevol cas, en la utilització dels seus continguts caldrà indicar de forma clara el nom i cognoms de la persona autora i el títol de la tesi doctoral. No s'autoritza la seva reproducció o altres formes d'explotació efectuades amb finalitats de lucre ni la seva comunicació pública des d'un lloc aliè al servei TDX. Tampoc s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant als continguts de la tesi com als seus resums i índexs.

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis doctoral y su utilización debe respetar los derechos de la persona autora. Puede ser utilizada para consulta o estudio personal, así como en actividades o materiales de investigación y docencia en los términos establecidos en el art. 32 del Texto Refundido de la Ley de Propiedad Intelectual (RDL 1/1996). Para otros usos se requiere la autorización previa y expresa de la persona autora. En cualquier caso, en la utilización de sus contenidos se deberá indicar de forma clara el nombre y apellidos de la persona autora y el título de la tesis doctoral. No se autoriza su reproducción u otras formas de explotación efectuadas con fines lucrativos ni su comunicación pública desde un sitio ajeno al servicio TDR. Tampoco se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al contenido de la tesis como a sus resúmenes e índices.

WARNING. Access to the contents of this doctoral thesis and its use must respect the rights of the author. It can be used for reference or private study, as well as research and learning activities or materials in the terms established by the 32nd article of the Spanish Consolidated Copyright Act (RDL 1/1996). Express and previous authorization of the author is required for any other uses. In any case, when using its content, full name of the author and title of the thesis must be clearly indicated. Reproduction or other forms of for profit use or public communication from outside TDX service is not allowed. Presentation of its content in a window or frame external to TDX (framing) is not authorized either. These rights affect both the content of the thesis and its abstracts and indexes.



TESIS DOCTORAL

**IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE FACTORES DE
TRANSCRIPCIÓN IMPLICADOS EN LA REGULACIÓN DE
PROCESOS MOLECULARES Y CEREBROREPARADORES EN
EL ICTUS**

Susanna Camós Badia

2014



Universitat de Girona

TESIS DOCTORAL

**IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE FACTORES DE
TRANSCRIPCIÓN IMPLICADOS EN LA REGULACIÓN DE
PROCESOS MOLECULARES Y CEREBROREPARADORES EN
EL ICTUS**

Susanna Camós Badia

2014

Ciències Experimentals i Sostenibilitat

Dirigida por: Dra. Judith Mallolas Jiménez y Dr. Joaquín Serena Leal

Tutor: Dra. Ma Teresa Puig

Memoria presentada para optar al título de Doctora por la Universitat de Girona

Judith Mallolas Jiménez, Doctora en Farmàcia y **Joaquín Serena Leal**, Doctor en Medicina,
Coordinador de la Unitat d'Ictus i hospitalització de l'Hospital Dr. Josep Trueta i Director del
Programa d'Ictus a la Regió Sanitària de Girona,

Certifiquen que,

La SUSANNA CAMÓS BADIA ha realitzat sota direcció i supervisió durant els últims quatre anys el treball de recerca titulat “ **Identificación y caracterización de factores de transcripción implicados en la regulación de procesos moleculares y cerebropreparadores en el ictus**”. És la seva intenció presentar-lo com a treball de tesi i així optar al Títol de Doctora per la Universitat de Girona (UdG). Per la dedicació, rigor i serietat del mateix pot àmpliament ser defensat per aquest fi. Els sotasignants volen informar que han dirigit i supervisat personalment els experiments i el treball reflectits en el mateix. Consideren que aquest treball de recerca té els requisits de qualitat necessaris per ser presentat i defensat com a treball de tesi.

Per a què així consti, firmem el present certificat a Girona, dia 30 de Juny de 2014.

Dra. Judith Mallolas

Dr. Joaquín Serena

*A en Joan, als meus pares i a la Laura,
per recolzar-me i estar sempre al meu costat.*

*La vida és un viatge, un viatge en què l'objectiu no és l'arribada al lloc de destinació, ni allò que
hi trobarem, sinó el procés mateix del viatge, el camí interior que es fa dia rere dia vers el
coneixement d'un mateix.*

Kavafis

Agradecimientos

La presente tesis doctoral ha sido principalmente financiada por:

- El *Centre d'Innovació i Desenvolupament Empresarial* (CIDEM) de la *Generalitat de Catalunya* (RDITSCON07-1-0006).
- El Grupo Ferrer Internacional, S.A.
- El Ministerio de Economía y Competitividad (MINECO) y el Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER) (PROFIT, CIT 090000-20008-11).
- El Instituto de Salud Carlos III (ISCI) (FIS, PI070322) del MINECO.
- La Red de Investigación Cooperativa de Enfermedades Vasculares Cerebrales (INVICTUS) (RD07/0026/2002 y RD06/0026/0005) del MINECO, de la cual formamos parte el Grupo de Investigación en Patología Cerebrovascular del *Institut d'Investigació Biomèdica de Girona Dr. Josep Trueta* (IdIBGi) (donde se ha desarrollado el presente trabajo) y la Unidad de Investigación Cerebrovascular de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid (UCM) (donde se han llevado a cabo los modelos experimentales de isquemia *in vivo* de la presente tesis).
- Fondos privados del Grupo de Investigación en Patología Cerebrovascular a través del IdIBGi.



Listado de publicaciones derivadas de la tesis

ARTÍCULO I:

Camós S, Mallolas J. *Experimental models for assaying microvascular endothelial cell pathophysiology in stroke*. *Molecules*. 2010 Dec 10; 15(12):9104-34. doi:10.3390/molecules15129104. Review. FI: 2,428.

ARTÍCULO II:

Camós S, Gubern C, Sobrado M, Rodríguez R, Romera VG, Moro MA, Lizasoain I, Serena J, Mallolas J, Castellanos M. *Oct-2 Transcription Factor Binding Activity and Expression Up-Regulation in Rat Cerebral Ischaemia is Associated with a Diminution of Neuronal Damage In Vitro*. *Neuromolecular Med*. 2014 Jun; 16(2):332-49. doi: 10.1007/s12017-013-8279-1. Epub 2013 Nov 27. FI: 4,492.

ARTÍCULO III:

Camós S, Gubern C, Sobrado M, Rodríguez R, Romera VG, Moro MA, Lizasoain I, Serena J, Mallolas J, Castellanos M. *The High Mobility Group I-Y transcription factor is involved in cerebral ischaemia and modulates the expression of angiogenic proteins*. *Neuroscience*. 2014 Jun 6; 269:112-30. doi: 10.1016/j.neuroscience.2014.03.036. Epub 2014 Mar 27. *Neuroscience*. FI: 3.122.

Tabla de abreviaturas

ACC	Arteria carótida común
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario
AMPA	Ácido alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico
ANGPT-1	Angiopietina-1
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
BHE	Barrera hematoencefálica
B2m	<i>β2-microglobulin</i>
C _T	<i>Cycle threshold</i>
CTD	Dominio de transactivación C-terminal
DG	Giro dentado
DIV	Días <i>in vitro</i>
DMEM	Medio esencial mínimo de Dulbecco
DMSO	Dimetilsulfóxido
ECV	Enfermedad cerebro vascular
EGR	Proteína de respuesta al crecimiento temprano (<i>Early growth response</i>)
EMEM	Medio esencial mínimo de Eagle
FSC	Flujo sanguíneo cerebral
FT	Factor de transcripción
Gapdh	<i>Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>
GFAP	Proteína fibrilar ácida de la glía
HMG1Y	<i>High mobility group 1/Y</i>
Hprt	<i>Hypoxanthine phosphoribosyltransferase</i>
HS	Suero de caballo (<i>Horse serum</i>)
HIF	Factor inducible a la hipoxia (<i>Hipoxya-inducible factor</i>)

IFM	Intensidad de fluorescencia media
IP	Inmunoprecipitación
LDH	Lactato deshidrogenasa
MTT	3 - (4,5-dimetiltiazol) -2,5-difenil tetrazolio
NeuN	Antígeno nuclear neuronal
NMDA	N-metil-D-aspartato
NF1	Factor nuclear 1 (<i>Nuclear factor 1</i>)
NRD	Dominio regulador negativo
OCT-2	Octamer-2
PBS	Tampón fosfato salino (<i>Phosphate buffered saline</i>)
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
pMCAO	<i>Permanent middle cerebral artery occlusion</i>
POG	Privación de oxígeno y glucosa
Ppia	<i>Peptidyl-prolyl cis-trans isomerasa A</i>
Ppib	<i>Peptidyl-prolyl cis-trans isomerasa B</i>
P/S	Penicilina/estreptomicina
qPCR	<i>Quantitative polymerase chain reaction</i>
RBMVEC	Células endoteliales de microvasculatura cerebral de rata (<i>Rat brain microvascular endothelial cells</i>)
RECA-1	Antígeno de células endoteliales de rata 1 (Rat endothelial cell antigen)
RN	Neuronas de rata
Rpl13a	<i>Ribosomal Protein L13A</i>
r-TPA	Activador tisular del plasminógeno humano recombinante
Sdha	<i>Succinate dehydrogenase complex, subunit A, flavoprotein</i>
siRNA	ARN de interferencia pequeño (<i>small interference RNA</i>)
tMCAO	<i>Transitory middle cerebral artery occlusion</i>
VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular (<i>Vascular endothelial growth factor</i>)

WB	Western blot
Ywhaz	<i>Tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, zeta polypeptide</i>
18S	<i>18S rRNA</i>

Índice de figuras

- Figura 1.** Frecuencia aproximada de los principales tipos de ictus y de los principales subtipos de isquemia cerebral, según estudios poblacionales. Datos procedentes de RENISEN y Warlow et al., 2003 ¹ **23**
- Figura 2.** Clasificación del ictus hemorrágico según la localización topográfica y la extensión. Adaptada de Arboix A et al., 2006 ² **24**
- Figura 3.** La obstrucción de la arteria cerebral media (flecha corta) origina un gradiente de presiones. En la zona central, con FSC < 10 mL/100 g/min, se produce una rápida muerte celular. Rodeando a este núcleo intensamente isquémico existe una zona de “penumbra” con FSC < 22 mL/100 g/min. Más periféricamente en la zona de oligohemia, con FSC > 22 mL/100 g/min, el riesgo de convertirse en infarto sólo sucede en circunstancias adversas. Adaptada de Castillo, 2000 ³ **39**
- Figura 4.** Esquema simplificado de los mecanismos implicados en la isquemia cerebral. Extraído y adaptado de José Castillo, 2001 ⁴ **40**
- Figura 5.** Curso temporal de la expresión génica tras la isquemia cerebral. ATP: adenosina trifostato; GET: genes de expresión temprana; HSP: proteínas de choque térmico. Adaptada de <http://www.neurowikia.es/content/bases-moleculares-de-la-isquemia-cerebral> **48**
- Figura 6.** Mecanismos principales de angiogénesis: por *sprouting* o angiogénesis del brote (A) e *intussusception* o angiogénesis por partición (B). CE: célula endotelial. Imagen adaptada de Carmeliet and Jain 20011 ⁵ **51**
- Figura 7.** Esquema de la recogida de muestras después de la tMCAO en rata. El cerebro se cortó en secciones coronales correspondiente a la zona de la ACM. El tejido cortical ipsilateral a la MCAO se identificó por su característica consistencia tisular. Para el resto de regiones, se procedió tal y como indica la figura **71**
- Figura 8.** Esquema general del protocolo de isquemia cerebral *in vitro* empleado en la presente tesis: la privación de oxígeno y glucosa (POG) **73**
- Figura 9.** Protocolo de extracción de ARN total a partir de tejido cerebral o de muestras procedentes de cultivo celular **100**
- Figura 10.** Componentes de la sonda TaqMan utilizada para la qPCR. Las propiedades del *quencher* (Q) combinadas con la corta longitud del ligando de unión al surco menor (MGB)

proporciona una menor señal de fondo que aumentan la sensibilidad y la precisión en los datos, comparado con otras sondas (non-MGF/NFQ). F: fluoróforo; Q ó NFQ: *non-fluorescent quencher*; MGB: ligando de unión al surco menor (del inglés *minor groove binder*). Adaptada de http://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/brochures/cms_085696.pdf **107**

Figura 11. Esquema del comportamiento de los ensayos de expresión TaqMan® (constituidos por un par de cebadores y una sonda TaqMan) durante un ciclo de amplificación por qPCR. *Forward*: iniciador que avanza ‘adelante’ siguiendo la hebra sentido. *Reverse*: iniciador que avanza en sentido opuesto al *forward*. Figura adaptada de la web http://www.asuragenservices.com/Services/services/gene_expression/ab_taqman.aspx **108**

Figura 12. Ejemplo de gráfica de amplificación del ADNc obtenida por qPCR, dónde se indican diferentes parámetros necesarios para la cuantificación de la expresión. En cada ciclo de amplificación se cuantifica la fluorescencia y se registra el número de ciclos necesarios para generar una fluorescencia umbral o *Threshold*. El ciclo umbral o CT es el número del ciclo de la PCR en el que ΔR_n corta el umbral en la gráfica de amplificación. La fluorescencia que se emite por debajo de este valor es la fluorescencia de fondo o *background*). El momento en que se produce la saturación de la reacción de PCR se denomina fase *plateau*. ΔR_n : intensidad normalizada del fluorocromo *reporter* con línea basal corregida frente al ciclo **109**

Figura 13. Esquema del protocolo del ensayo *Multiplex Transcription Factor Profiling*, que se utilizó para el análisis del perfil de activación de diferentes FTs en corteza cerebral de rata, con el fin de seleccionar FTs involucrados en isquemia cerebral. Figura adaptada de http://www.panomics.com/downloads/LUMINEX_V1.pdf **125**

Figura 14. Esquema del protocolo del kit *TranSignal Array™ TF-TF* versión I, que se utilizó para determinar las interacciones de HMG1Y y Oct-2 con otros FTs en muestras de cerebro de rata sometida a isquemia. Figura adaptada de [affymetrix.com](http://www.affymetrix.com) **131**

Figura 15. Esquema del proceso de silenciamiento post transcripcional del ARN mensajero mediante la técnica de ARN interferencia (ARNi). Figura adaptada de [arthritis-research.com](http://www.arthritis-research.com) **134**

Figura 16. Diagrama de trabajo del ensayo de invasión utilizado para analizar la capacidad invasiva de las células endoteliales transfectadas con el siRNA contra HMG1Y, respecto el grupo control **146**

Figura 17. Análisis y comparación de la viabilidad celular (A) y la integridad del ARN (B) de las RBMVEC después de 90 y 150 minutos de POG (0h de reperfusión) y utilizando dos medios de POG diferentes: DMEM libre de glucosa (DMEM LG) y solución de Krebs. La viabilidad celular se analizó mediante el ensayo MTT y la integridad del ARN mediante electroforesis en geles de agarosa/TBE/BrEt). Las flechas indican las bandas correspondientes a la subunidad 28 y 18S del ARN ribosomal (28S y 18S, respectivamente). Cntr: muestra control; POG: privación de oxígeno y glucosa. *=p<0.05; **=p<0.01; #=p<0.001 **151**

Figura 18. Comparación de la viabilidad de las RBMVEC a diferentes tiempos de reperfusión (2h, 24h, 72h) después de 90 minutos de POG, utilizando diferentes protocolos de POG (ver tabla 7 apartado 1.2.2.1.2 sección IV. Metodología). *=p<0.05; **=p<0.01; #=p<0.001. Cntr: control **152**

Figura 19. Análisis y comparación de la citotoxicidad de RBMVEC a diferentes tiempos de reperfusión (2, 24 y 72 horas) después de someter a las células a 90 minutos de POG, utilizando diferentes protocolos de POG (apartado 1.2.2.1.2 de la sección IV. Metodología). *=p<0.05; **=p<0.01; #=p<0.001. Cntr: control **153**

Figura 20. Análisis de la integridad del ARN de las RBMVEC a diferentes tiempos de reperfusión (2h, 24h, 72h y 5 días) después de someter a las células a 90 minutos de POG utilizando los diferentes protocolos de estudio (apartado 1.2.2.1.2 de la sección IV. Metodología). 28S: subunidad 28 del ARN ribosomal; 18S: subunidad 18S del ARN ribosomal **154**

Figura 21. Análisis de la estabilidad génica de diferentes genes como potenciales controles endógenos a diferentes tiempos de reperfusión tras someter las RBMEC a las condiciones de POG previamente optimizadas. *=p<0.05; **=p<0.01; #=p<0.001. La estabilidad de expresión génica se determinó mediante qPCR y el método $2^{-\Delta CT}$ **156**

Figura 22. Análisis de la expresión mediante qPCR de COX-2 (A) y VEGF (B) en las RBMVEC a diferentes tiempos de reperfusión (2h, 24h, 72h y 5 días), tras someter las células a POG utilizando el protocolo optimizado. El gen endógeno *Sdha* se utilizó para la normalización de los resultados. *=p<0.05; **=p<0.01; #=p<0.001. Cntrl: control **157**

Figura 23. Análisis de la actividad de unión de 50 FTs diferentes en extractos nucleares de tejido isquémico y control de rata (tejido contralateral a la MCAO). Comparación de la actividad de unión de los FTs en el núcleo del infarto, el tejido peri-infartado y el tejido no dañado ipsilateral a la MCAO respecto al tejido contralateral (CL) a la MCAO, recogidas a las 6, 24 y 72 horas y 7 y 14 días de reperfusión. La actividad de unión se midió como la intensidad

de fluorescencia media (IFM). La actividad de unión de la familia Octamer está indicada mediante un círculo rojo **201**

Figura 24. Análisis de la actividad de unión (medida en IFM) de la familia de FTs Octamer, en extractos nucleares de cerebro de rata sometida a tMCAO, en diferentes áreas del infarto (núcleo: C, peri-infarto: P, no dañado: ND) en la fase aguda (A) y crónica de la isquemia cerebral (B) comparado con el tejido control contralateral (CL) correspondiente . (*) Indica cambios significativos, es decir aquellos en que se ha observado una inducción de la actividad de unión $\geq 1,25$ veces y una Dev F $\geq 2,0$ respecto al control o bien una inducción $\leq 0,75$ veces (es decir una reducción de su actividad) y una Dev F $\geq 2,0$ respecto al control. Los valores de IFM específicos se muestran en la Tabla 22 **203**

Figura 25. Resultados de la predicción de los transcritos de Oct-2 (gen *Pou2f2*) en la especie de rata (*Rattus norvegicus*) mediante el programa *Ensembl* **206**

Figura 26. Alineamiento de las secuencias de ADNc de las isoformas de Oct-2 predichas por *Ensembl*, realizado con *ClustalW2*. Las secuencias subrayadas indican los sitios de unión de los primers diseñados para su detección mediante PCR convencional. Al final del alineamiento se indica el porcentaje de homología de cada transcrito respecto a la isoforma de referencia (Oct-2_002) **207-210**

Figura 27. Identificación de las isoformas de Oct-2 expresadas en corteza cerebral de rata control y sometida a isquemia mediante su amplificación por PCR convencional. Cntr: muestra control; 6h: 6 horas post-pMCAO; 24h: 24 horas post-pMCAO; 24h: 24 horas post-pMCAO; 72h: 72 horas post-pMCAO; 7d: 7 días post pMCAO; 14d: 14 días post-pMCAO; bp: tamaño de los fragmentos amplificados en pares de bases **210**

Figura 28. Media de los ciclos de amplificación (CT) de las diferentes isoformas obtenidos por qPCR en los diferentes tiempos después de la isquemia cerebral experimental (pMCAO). En rojo se indica el valor de la media global de CT's para cada isoforma **211**

Figura 29. Análisis de la expresión génica a nivel de ARNm (A) y proteína (B-C) de las variantes transcripcionales de Oct-2 en corteza cerebral de rata en condiciones control y a diferentes tiempos después de la isquemia (pMCAO). La cuantificación de la expresión a nivel de ARNm se realizó mediante qPCR y el método $2^{-\Delta\Delta CT}$. *Ywhaz* y *Sdha* se utilizaron como genes endógenos para normalizar los resultados de la qPCR. El análisis a nivel de proteína se llevó a cabo por WB mediante el anticuerpo sc-25400 que detecta todas las isoformas y el anticuerpo sc-233, capaz de detectar específicamente la variante Oct-2_678 (análisis realizado mediante BLAST;

apartado 2.1.3 de la sección IV). El análisis de la expresión proteica del resto de transcritos por separado no fue posible debido a que no hay anticuerpos específicos disponibles para cada uno. Los resultados del WB fueron normalizados con β -actina. Los transcritos de Oct-2 se han abreviado con los tres últimos números del código de *Ensembl*. (*= $p<0.05$; **= $p<0.01$; #= $p<0.001$) **213-214**

Figura 30. El factor de transcripción Oct-2 se expresa en células neuronales de corteza cerebral de rata en condiciones control e isquémicas. El estudio de localización de Oct-2 se realizó en cortes corticales de cerebro de rata control y sometida a pMCAO (24h), mediante inmunofluorescencia y utilizando los anticuerpos correspondientes contra: Oct-2 (verde), el marcador celular NeuN (rojo) y el marcador nuclear DAPI (azul) **214**

Figura 31. Identificación de los principales dominios proteicos de las isoformas de Oct-2 presentes en cerebro de rata. En el alineamiento de sus secuencias se han marcado: el dominio regulador negativo (NRD) está señalado en verde, los nueve aminoácidos esenciales C-terminales en rojo, el dominio de transactivación N-terminal con una línea de puntos naranja, El dominio de transactivación C-terminal con una línea discontinua azul y el dominio de unión a ADN (bipartido: el subdominio específico POU y el subdominio homeo POU) en morado. Los nombres de los transcritos se han abreviado con los últimos números del código de *Ensembl* **217**

Figura 32. Análisis de la expresión proteica de Oct-2 en cultivo primario de neuronas corticales de rata (RN) a diferentes tiempos después de ser sometidas a POG. Los resultados se normalizaron con β -actina. *= $p<0.05$ **218**

Figura 33. Patrón de interacciones de Oct-2 con otros factores de transcripción en condiciones control (B: control) y de isquemia experimental (C: tejido isquémico a 7 días de reperusión después de tMCAO, núcleo ipsilesional), mediante el kit TransSignal TF-TF Array versión I. Las interacciones fuertes están indicadas en negro, las débiles, en gris. Los FTs observados en el control negativo (A) (muestra inmunoprecipitada con el anticuerpo normal IgG, el cual no tiene ningún antígeno como diana), corresponden a interacciones inespecíficas **220**

Figura 34. Análisis de la expresión génica de HMGIY, mediante qPCR (A) y Western blot (B) en muestras de cerebro de rata control y sometida a isquemia. *Ywhaz*, *Sdha* y *Hprt* se utilizaron como genes de referencia en la qPCR. Los resultados de WB fueron normalizados con β -actina. *= $p<0.05$, **= $p<0.01$, #= $p<0.001$ **224**

Figura 35. El factor de transcripción HMGIY se expresa en células neuronales y endoteliales en corteza cerebral de rata control e isquémica. El estudio de localización de HMGIY se realizó en cortes corticales de cerebro de rata control y sometida a pMCAO (24h), mediante inmunofluorescencia y utilizando los anticuerpos correspondientes contra HMGIY (verde) y contra el marcador de tipo celular: neuronal (A: NeuN; rojo), astrocitario (B: GFAP: rojo) y endotelial (C: RECA-1; rojo) **225**

Figura 36. Comparación del patrón de interacción de HMGIY con otros FTs entre muestras de extractos nucleares de cerebro de rata control (panel C) y sometido a isquemia (6 horas y 14 días de reperusión después de la tMCAO, paneles A y B, respectivamente). En el panel A', se muestran los nombres de las interacciones que sólo se observan a las 6 horas después de la isquemia (interacciones nuevas, marcadas en rojo en el panel A), entre las cuales, las interacciones fuertes están señalizadas en negrita y subrayadas, mientras que el resto son interacciones débiles **227**

Figura 37. Resultados del silenciamiento de la expresión del FT Oct-2 en cultivo primario de neuronas corticales de rata, mediante la transfección de un *pool* de siRNAs contra Oct-2. La disminución de la expresión proteica de Oct-2 se analizó por WB utilizando el anticuerpo sc-25400. El cultivo neuronal transfectado con el siRNA mostró una reducción de la expresión de Oct-2 del 30% a los 4 días post-transfección ($p < 0,01$) (A). Esta reducción se correlacionó con un aumento significativo de la liberación de LDH del cultivo, de los 4 a los 6 días después de la transfección (B). Los resultados del análisis proteico se normalizaron con β -actina. La citotoxicidad se expresó en función del porcentaje del valor máximo de LDH y se representaron en comparación con el grupo control negativo. $*=p < 0,05$; $**=p < 0,01$; $\#=p < 0,001$

230

Figura 38. Evaluación de la eficiencia de transfección (A) y la toxicidad (B) de diferentes reactivos de transfección (DF1, 2, 3 y 4: DharmaFECT 1, 2, 3 y 4) utilizados a distintas concentraciones (al 0,15%, al 0,45%, 0,75%) en las RBMVEC en cultivo. La eficiencia de transfección y la citotoxicidad de los diferentes reactivos testados se evaluó mediante la transfección de *TOX transfection control* y el posterior ensayo de viabilidad (MTT) **232**

Figura 39. Determinación de la dosis de siRNA óptima a transfectar en las RBMVEC, mediante la monitorización por inmunofluorescencia de la co-localización de células DAPI-positivas (azul) y siGLO-positivas (indicador de transfección verde) en células fijadas. Las dosis de siRNA evaluadas fueron 10, 20, 35 y 50 nM **235**

Figura 40. Determinación de la dosis de siRNA óptima a transfectar en RBMVEC, mediante la transfección de distintas concentraciones de siRNA (10, 20, 35 y 50nM) contra el gen endógeno Ciclofilina B (Ppiβ) y el posterior análisis de su expresión génica mediante qPCR (A) y el método $-2^{\Delta CT}$ y de la viabilidad celular mediante el ensayo MTT (B). siRNA-TOX: TOX transfection control, Mock: reactivo de transfección sólo (sin siRNA), NT: células no tratadas

236

Figura 41. Resultados del análisis de la expresión génica de HMGIY (A), ANGPT-1 (B) y VEGF(C) en las RBMVEC transfectadas con siRNAs contra HMGIY. El estudio se realizó a nivel de ARNm mediante qPCR y a nivel de proteína mediante Western blot, a los 5 días después de la transfección. Los genes *Ywhaz* y *Sdha* se utilizaron como genes endógenos para la normalización de la qPCR y la β-actina para Western blot. *p<0.05, **p<0.01, #p<0.001

237

Figura 42. Resultados de la evaluación de la expresión de HMGIY y del análisis de su función angiogénica *in vitro* en las RBMVEC. La viabilidad celular se estudió mediante MTT (A), la migración celular mediante el ensayo *wound scratch* (B), y la capacidad invasiva mediante el ensayo *BD BioCoat™ Angiogenesis System: Endothelial Cell Invasion* (C), 5 días después de la transfección del siRNA contra HMGIY en RBMVEC en cultivo. La expresión de HMGIY se analizó en los tres casos (A', B', C') con la técnica de qPCR. *p<0.05, **p<0.01, #p<0.001

239

Índice de tablas

Tabla 1. Factores de riesgo de la enfermedad cerebrovascular. Adaptada de Sacco <i>et al.</i> , 1997 ⁶	20
Tabla 2. Objetivos terapéuticos actuales según la fase de la enfermedad. Adaptado de Ruíz-Giménez N <i>et al.</i> , 2002 ⁷	27
Tabla 3. Criterios de inclusión y exclusión de la terapia trombolítica con r-TPA	30
Tabla 4. Ventajas y desventajas de la trombólisis mecánica como opción terapéutica en el ictus isquémico agudo. Adaptado de Chaudhary <i>et al.</i> , 2011; Yeo and Sharma 2013 ^{8,9}	33
Tabla 5. Fármacos neuroprotectores ensayados en clínica humana. Adaptado de Castillo, 2000 ³	35
Tabla 6. Compuestos neuroprotectores para el ictus isquémico agudo en los ensayos clínicos de Fase II o III en marcha. Adaptado de Schmidt <i>et al.</i> , 2013 ¹⁰	36
Tabla 7. Eventos y moléculas que participan en las diferentes fases del proceso de angiogénesis	53
Tabla 8. Descripción de los medios utilizados para la optimización de la POG en RBMVEC	77
Tabla 9. Oligonucleótidos sentido y anti-sentido (<i>forward</i> y <i>reverse</i>) utilizados para amplificar mediante PCR las diferentes variantes transcripcionales de Oct-2 en cerebro de rata control e isquémico. Los diferentes pares de cebadores fueron diseñados mediante el programa <i>Primer3</i>	106
Tabla 10. Ensayos de expresión TaqMan de Applied Biosystems específicas. Las sondas " <i>custom</i> ", hacen referencia a aquellas que han sido diseñadas en esta tesis para cuantificar la expresión génica de isoformas concretas. " <i>Rn</i> ": <i>Rattus norvegicus</i> ; " <i>_m1</i> ": sonda localizada en la unión entre dos exones; " <i>_s1</i> ": <i>primers</i> y sonda localizados dentro de un exón	113
Tabla 11. Anticuerpos primarios utilizados para la detección de proteínas mediante Western blot (WB) y/o inmunofluorescencia (IF)	119
Tabla 12. Factores de transcripción analizados en el ensayo de la actividad de unión. Cincuenta factores de transcripción se analizaron simultáneamente con el kit <i>Multiplex Transcription</i>	

Factor Profiling Assay, para determinar su actividad de unión en muestras de cerebro de rata control y muestras de cerebro de rata sometida a isquemia (tMCAO) **124**

Tabla 13. El símbolo y el nombre completo de las secuencias de ADN consenso (secuencias diana conocidas de FT) analizadas en el array de interacciones FT-FT **132**

Tabla 14a y b. Genes candidatos involucrados en la regulación de la función angiogénica, seleccionados para el análisis bioinformático (I) y (II) **191-192**

Tabla 15. Sitios de unión para factores de transcripción (TFBS) comunes entre genes candidatos que se sobreexpresan en la zona subventricular del cerebro después de la isquemia cerebral. Se han marcado los genes de estudio que comparten TFBS para el FT HMGIY **194**

Tabla 16. Sitios de unión para factores de transcripción (TFBS) comunes entre genes candidatos involucrados en la regulación de las funciones de estimulación, muerte/supervivencia de las células endoteliales **195**

Tabla 17. Sitios de unión para factores de transcripción (TFBS) comunes entre genes candidatos implicados en la regulación de la adhesión y supervivencia de las células endoteliales **196**

Tabla 18. Sitios de unión para factores de transcripción (TFBS) comunes entre genes candidatos involucrados en la inhibición de la angiogénesis **196**

Tabla 19. Sitios de unión para factores de transcripción (TFBS) comunes entre genes candidatos que codifican para FTs involucrados en angiogénesis, clasificados según su función específica **197**

Tabla 20. Sitios de unión para factores de transcripción (TFBS) comunes entre genes candidatos de respuesta inmediata **198**

Tabla 21. Resumen de los genes candidatos que comparten sitios de unión para factores de transcripción (TFBS) comunes para HMGIY en sus promotores, de acuerdo con el análisis bioinformático (Tablas 14-19) **198**

Tabla 22. Comparación de la actividad de unión de octamer, en las diferentes áreas del infarto en las fases aguda y crónica de la isquemia cerebral. Se consideran cambios significativos aquellos en que se ha observado una inducción de la actividad de unión $\geq 1,25$ veces y una Dev F $\geq 2,0$ respecto al control o bien una inducción $\leq 0,75$ veces (es decir una reducción de su actividad) y una Dev F $\geq 2,0$ respecto al control **204**

Tabla 23. Nombre y número de identificación (ID) de los transcritos según el programa <i>Ensembl</i> y su correspondiente abreviatura utilizada en la presente tesis	206
Tabla 24. Abreviatura y nombre completo de los FTs que interactúan con Oct-2 tanto en condiciones control como en condiciones de isquemia experimental	221
Tabla 25. Resultados del análisis bibliográfico de la función de los FTs que interactúan con Oct-2	222
Tabla 26. Nuevas interacciones de HMGIY con otros FTs, en corteza cerebral de rata sometida a isquemia (6 horas post-isquemia), respecto al control	228

Índice

Agradecimientos	i
Listado de publicaciones derivadas de la tesis	iii
Tabla de abreviaturas	v
Índice de figuras	ix
Índice de tablas	xvii
Resum	9
Resumen	11
Summary	13
I INTRODUCCIÓN	15
1 Enfermedad cerebrovascular	17
1.1 Sintomatología	17
1.2 Epidemiología y factores de riesgo	18
1.3 Clasificación de la ECV	20
1.3.1 Isquemia cerebral	21
1.3.2 Hemorragia cerebral	22
1.4 Diagnóstico y pronóstico	24
1.5 Tratamiento del ictus isquémico	26
1.5.1 Medidas generales: unidades de ictus	27
1.5.2 La recanalización como estrategia terapéutica	28
1.5.2.1 Trombólisis intravenosa	28
1.5.2.2 Trombólisis intraarterial	32
1.5.2.3 Trombólisis mecánica	33
1.5.3 La neuroprotección como estrategia terapéutica	33
1.5.3.1 Agentes neuroprotectores en fase de estudio	36
2 Fisiopatología de la isquemia cerebral	36
2.1 Fallo energético	40
2.2 Excitotoxicidad	41
2.3 Extensión de la despolarización (depresión)	41
2.4 Aumento del calcio intracelular	42

2.5 Generación de radicales libres	42
2.6 Disrupción de la barrera hematoencefálica	43
2.7 Inflamación	44
2.8 Contribución de la glía	44
2.9 Cambios en neurotransmisores y sustancias neuroactivas	45
2.10 Apoptosis	45
2.11 Expresión génica	46
3 La cerebroreparación en el ictus	48
3.1 La neurogénesis, la gliogénesis y la sinaptogénesis	49
3.2 La angiogénesis	51
3.2.1 Mecanismos moleculares de la angiogénesis	51
3.2.2 La angiogénesis en el contexto del ictus	53
4 Mecanismos de regulación de la expresión génica	55
4.1 Factores de transcripción	55
4.1.1 Factores de transcripción en el ictus	57
II HIPÓTESIS	59
III OBJETIVOS	63
IV METODOLOGÍA	67
1 Modelos experimentales de isquemia cerebral	69
1.1 Modelos de isquemia cerebral <i>in vivo</i>	69
1.1.1 <i>Transient middle cerebral artery occlusion</i> (tMCAO)	70
1.1.2 <i>Permanent middle cerebral artery occlusion</i> (pMCAO)	71
1.2 Modelos de isquemia cerebral <i>in vitro</i> : privación de oxígeno y glucosa (POG)	72
1.2.1 Generalidades de las técnicas de cultivo celular	74
1.2.2 Cultivo de células endoteliales de microvasculatura cerebral de rata (RBMVEC)	74
1.2.2.1 Optimización del protocolo de POG de las RBMVEC	76
1.2.2.1.1 Revisión bibliográfica y comparación de los protocolos de POG utilizados en RBMVEC	76
1.2.2.1.2 Optimización del protocolo de POG de las RBMVEC	76
1.2.2.1.2.1 Evaluación de la viabilidad celular: ensayo MTT	78

1.2.2.1.2.2 Evaluación de la citotoxicidad: Ensayo LDH	79
1.2.2.1.2.3 Electroforesis en gel de agarosa (integridad del ARN)	80
1.2.3 Cultivo de neuronas corticales de rata (RN)	82
1.2.3.1 POG de las RN	84
2 Herramientas bioinformáticas	85
2.1 Selección de genes candidatos implicados en angiogénesis e identificación de FTBS putativos	85
2.1.1 <i>PubMed</i>	85
2.1.2 <i>GenBank</i>	86
2.1.3 <i>Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)</i>	87
2.1.4 <i>Reference Sequence (RefSeq)</i>	87
2.1.5 <i>Protein Data Bank (PDB)</i>	88
2.1.6 <i>PROMO</i>	88
2.1.7 <i>TRANSFAC</i>	89
2.2 Identificación y caracterización de isoformas	90
2.2.1 <i>Ensembl</i>	90
2.2.2 <i>ClustalW2</i>	91
2.2.3 Identificación de los dominios proteicos de las isoformas de Oct-2	92
2.3 Diseño de oligonucleótidos: <i>Primer3</i>	93
2.4 Diseño de ensayos de expresión génica ‘personalizados’: <i>Custom TaqMan® Assay Design Tool</i>	93
2.5 Cuantificación relativa de la expresión génica por qPCR: <i>7000 System SDS Software</i>	95
2.6 Análisis estadístico: SPSS	95
3 Procesamiento de las muestras de tejido cerebral de rata y de los cultivos celulares	97
3.1 Obtención de ARN	97
3.1.1 Precauciones al trabajar con ARN	97
3.1.2 Extracción y cuantificación del ARN	98
3.1.2.1 Homogeneización de las muestras de tejido cerebral	98
3.1.2.2 Homogeneización de las muestras de cultivos celulares	98

3.1.2.3 Extracción de ARN	98
3.1.2.4 Cuantificación del ARN	99
3.2 Obtención de ADN complementario (ADNc)	100
3.3 Obtención y cuantificación de proteína	101
3.4 Obtención y cuantificación de extractos nucleares	102
3.5 Obtención de cortes cerebrales de rata para inmunofluorescencia	103
4 Análisis de la expresión génica a nivel de ARNm y proteína	104
4.1 <i>Polymerase chain reaction</i> (PCR)	104
4.2 <i>Quantitative PCR</i> (qPCR)	106
4.2.1 Selección y diseño de ensayos de expresión TaqMan	110
4.2.2 Controles endógenos	111
4.2.2.1 Evaluación de la estabilidad de genes endógenos en el modelo de POG optimizado en las RBMVEC	112
4.2.3 Método de cuantificación relativa de la expresión génica	113
4.2.4 Preamplificación del ADNc	114
4.2.5 TaqMan® Gene Expression Cells-to-CT™ Kit	115
4.3 Western blot (WB)	117
4.4 Inmunofluorescencia	120
4.4.1 Procesamiento de cortes cerebrales para inmunofluorescencia	120
4.4.2 Obtención e interpretación de las imágenes	121
5 Selección y análisis de factores de transcripción (FT) implicados en isquemia cerebral y cerebroreparación	122
5.1 Selección de genes candidatos implicados en angiogenesis	122
5.2 Análisis bioinformático de las regiones promotoras de los genes candidatos	123
5.3 Cuantificación de la actividad de unión de FTs	123
5.3.1 Preparación de las muestras y puesta a punto del equipo Luminex	125
5.3.2 Análisis de la actividad de unión	126
5.4 Identificación de interacciones entre factores de transcripción FT-FT	127
5.4.1 Preparación de complejos TF-ADN	127
5.4.2 Pre-hibridación de la membrana	128
5.4.3 Inmunoprecipitación del FT y elución de las sondas	128

5.4.4 Hibridación de las membranas del array	129
5.4.5 Detección y análisis de resultados	130
6 Estudios funcionales <i>in vitro</i>	133
6.1 Silenciamiento génico mediante interferencia del ARN (RNAi)	133
6.1.1 Selección de la mejor estrategia ARNi para nuestro sistema	135
6.1.2 Silenciamiento del gen HMGIY en RBMVEC	136
6.1.2.1 Optimización de la transfección de siRNA en RBMVEC	136
6.1.2.2 Silenciamiento del gen HMGIY mediante transfección de siRNA	140
6.1.3 Silenciamiento del gen Oct-2 en neuronas corticales de rata (RN)	141
6.2 Análisis del daño celular	142
6.3 Análisis de la actividad angiogénica	142
6.3.1 Ensayo de viabilidad celular	143
6.3.2 Ensayo de migración celular	143
6.3.3 Ensayo de invasión de células endoteliales	144
V RESULTADOS	147
1 Modelos experimentales de isquemia cerebral: Optimización del protocolo de privación de oxígeno y glucosa (POG) en las RBMVEC	149
1.1 Resultados de la revisión bibliográfica	149
1.2 Optimización del protocolo de POG	150
a) Viabilidad celular, integridad del ARN y tiempo de POG	150
b) Viabilidad celular y tiempo de reperusión	151
c) Citotoxicidad y tiempo de reperusión	152
d) Integridad del ARN y tiempo de reperusión	153
1.3 Evaluación de la estabilidad de genes endógenos en el modelo de POG optimizado	154
1.3.1 Análisis de la expresión de marcadores de inflamación y angiogénesis en el modelo de POG optimizado	156
ARTÍCULO I	159
2 Identificación de FTs implicados en isquemia cerebral y cerebroreparación	190
2.1 Identificación de FTs implicados en angiogénesis mediante análisis bioinformático	190

2.1.1 Selección de genes candidatos implicados en angiogénesis tras la isquemia cerebral	190
2.1.2 Identificación de sitios de unión putativos: genes candidatos co-expresados e involucrados en procesos de angiogénesis comparten sitios de unión para el FT HMGIY	193
2.2 Identificación de FTs con una actividad de unión diferencial tras la isquemia cerebral	199
2.2.1. La isquemia cerebral modifica la actividad de unión de la familia de factores de transcripción Octamer	202
3 Estudio y caracterización de los FTs seleccionados en isquemia cerebral de rata	205
3.1 Caracterización del factor de transcripción Oct-2	205
3.1.1 Identificación de isoformas en cerebro de rata: los transcritos del FT Oct-2 se expresan en condiciones control e isquémicas	205
3.1.1.1 Predicción de las isoformas de Oct-2 en cerebro de rata mediante el <i>Ensembl</i>	205
3.1.1.2 Identificación de las isoformas de Oct-2 expresadas en cerebro de rata mediante PCR	206
3.1.2 Análisis del perfil de expresión de Oct-2 en isquemia cerebral de rata: la expresión de Oct-2 a nivel de ARNm y de proteína aumenta en la fase crónica de la isquemia	210
3.1.2.1 Perfil de expresión de Oct-2 a nivel de ARNm mediante qPCR	210
3.1.2.2 Perfil de expresión proteica de Oct-2 mediante WB	212
3.1.3 Localización celular y subcelular de Oct-2 en corteza cerebral de rata: Oct-2 se expresa en células neuronales	214
3.1.4 Identificación de los dominios proteicos de las isoformas de Oct-2: análisis bibliográfico	215
3.1.5 Análisis de la expresión proteica de Oct-2 en RN expuestas a POG mediante WB: la expresión de Oct-2 aumenta a las 24h post-POG	218
3.1.6 Análisis del perfil de interacciones de Oct-2 en corteza cerebral de rata: la isquemia induce cambios en las interacciones de Oct-2 con otros FTs	219
3.1.6.1 Análisis bibliográfico de la función de los FTs que interaccionan con Oct-2	221
3.2 Caracterización del factor de transcripción HMGIY	222
3.2.1 Análisis del perfil de expresión en isquemia cerebral: la expresión de HMGIY a nivel de ARNm y proteína aumenta tras la isquemia en corteza cerebral de rata	222

3.2.1.1 Perfil de expresión de HMGIY a nivel de ARNm mediante qPCR	222
3.2.1.2 Perfil de expresión de HMGIY a nivel de proteína mediante WB	223
3.2.2 Localización celular y subcelular de HMGIY en corteza cerebral de rata: HMGIY se expresa en células neuronales y endoteliales de la corteza cerebral de rata	224
3.2.3 Perfil de interacciones de HMGIY en corteza cerebral de rata: la isquemia induce cambios en las interacciones de HMGIY con otros FTs	226
3.2.3.1 Análisis bibliográfico de la función de los FTs que interactúan con HMGIY	227
4 Estudios funcionales <i>in vitro</i> de los factores de transcripción	229
4.1 Silenciamiento de Oct-2 en RN mediante siRNAs: la disminución de Oct-2 <i>in vitro</i> promueve la citotoxicidad y daño neuronal	229
4.2 Silenciamiento de HMGIY mediante transfección de siRNAs en RBMVEC	230
4.2.1 Optimización de la transfección de siRNA en RBMVEC	231
4.2.2 Identificación de genes diana de HMGIY: la inhibición de la expresión de HMGIY reduce la expresión de ANGPT-1 y VEGF	236
4.2.3 La inhibición de la expresión de HMGIY disminuye la viabilidad celular de las RBMVEC	238
ARTÍCULO II	241
ARTÍCULO III	259
VI DISCUSIÓN	279
1 Modelos experimentales de isquemia cerebral	281
1.1 Modelos de isquemia cerebral <i>in vivo</i>	281
1.2 Modelos de isquemia cerebral <i>in vitro</i> : optimización del protocolo de POG de las RBMVEC	281
2 Caracterización del FT Oct-2 en isquemia cerebral de rata	282
3 Caracterización de HMGIY en isquemia cerebral de rata	289
4 Discusión conjunta	296
VII CONCLUSIONES	301
VIII ANEXOS	305
IX BIBLIOGRAFÍA	331

RESUM

En els últims anys s'ha observat que la comprensió dels mecanismes que regulen els programes transcripcionals subjacents de diferents processos fisiopatològics, és essencial per desenvolupar noves estratègies terapèutiques més òptimes. Concretament, en el context de l'ictus, l'estudi dels reguladors transcripcionals i dels gens que participen en la modulació del procés isquèmic, així com el potencial endògen cerebral per compensar i reparar el dany i les lesions isquèmiques, poden ser la base per trobar una via addicional que pugui millorar les limitacions que ofereixen les teràpies que s'utilitzen actualment per al tractament de l'ictus.

En aquesta tesi s'han identificat i caracteritzat dos factors de transcripció involucrats i regulats durant la isquèmia cerebral: Oct-2 i HMG1Y.

Aquest és el primer treball en què s'estudia la família Octamer, concretament el factor de transcripció octamer-2, en el context de la isquèmia cerebral. En aquesta tesi es mostra que la isquèmia indueix diferències en l'activitat d'unió i en l'expressió gènica d'Oct-2 tant en la fase aguda com en la fase crònica de la isquèmia. També es descriu la localització neuronal d'Oct-2 i la seva interacció amb altres FTs en cervell de rata control i sotmesa a isquèmia. Els resultats evidencien que la resposta modulada per Oct-2 té un paper beneficiós en les funcions fisiològiques neuronals, la qual cosa suggereix que podria estar implicat en la reducció del dany neuronal i en promoure la supervivència neuronal en el context de la isquèmia cerebral.

Tanmateix, s'ha identificat HMG1Y com un factor de transcripció involucrat i regulat durant la isquèmia cerebral. S'ha observat que la isquèmia indueix un augment de l'expressió proteica d'HMG1Y i de les seves interaccions amb altres factors de transcripció que modulen funcions cerebroreparadores. D'altra banda, s'ha demostrat una associació entre HMG1Y i proteïnes angiogèniques i la capacitat d'aquest factor de transcripció de promoure la viabilitat de les cèl·lules endotelials cerebrals.

Per tant, la identificació i caracterització dels factors de transcripció Oct-2 i HMG1Y com a potencials dianes terapèutiques en el context de la isquèmia cerebral, permet ampliar els coneixements sobre els mecanismes moleculars que modulen els processos endògens de cerebroreparació i alhora establir les bases pel disseny de nous fàrmacs i estratègies terapèutiques que promoguin aquests processos.

D'altra banda, a causa de l'absència en la bibliografia d'un protocol estandarditzat d'isquèmia cerebral *in vitro* per a les RBMVEC, en la present tesi s'han optimitzat les condicions de privació d'oxigen i glucosa en el context del nostre estudi. D'aquest anàlisi s'ha observat que el protocol òptim de privació d'oxigen i glucosa consisteix en 90 minuts d'exposició utilitzant medi DMEM sense glucosa i medi de RBMVEC convencional durant la reperfusió. Aquest protocol optimitzat promou un augment de la viabilitat de les cèl·lules endotelials tres dies després de la POG (sense l'augment de la citotoxicitat) i permet mantenir la integritat de l'ARN fins als cinc dies de reperfusió. Finalment, es va analitzar l'estabilitat gènica de potencials gens endògens pel model de privació d'oxigen i glucosa definit i es va concloure que el gen *Sdha* és l'òptim per a la normalització dels resultats d'expressió gènica realitzats en el model optimitzat.

RESUMEN

En los últimos años se ha observado que la comprensión de los mecanismos que regulan los programas transcripcionales subyacentes de diferentes procesos fisiopatológicos, es esencial para desarrollar nuevas estrategias terapéuticas más óptimas. Concretamente, en el contexto del ictus, el estudio de los reguladores transcripcionales y los genes que participan en la modulación del proceso isquémico, como el potencial cerebral endógeno para compensar y reparar el daño y las lesiones isquémicas, pueden ser la base para encontrar mecanismos que mejoren las limitaciones que ofrecen las terapias actualmente utilizadas para el tratamiento del ictus.

En la presente tesis se han identificado y caracterizado dos factores de transcripción regulados durante la isquemia cerebral: Oct-2 y HMG1Y.

Este es el primer trabajo en el que se estudia la familia Octamer, concretamente el factor de transcripción Oct-2, en el contexto de la isquemia cerebral. En esta tesis se muestra que la isquemia induce diferencias en la actividad de unión y en la expresión génica de Oct-2 tanto en la fase aguda como en la fase crónica de la isquemia. También se describe la localización neuronal de Oct-2 y su interacción con otros factores de transcripción en cerebro de rata control y sometida a isquemia. Los resultados evidencian que la respuesta modulada por Oct-2 tiene un papel beneficioso en las funciones fisiológicas neuronales, lo que sugiere que podría estar implicado en la reducción del daño neuronal y en la promoción de la supervivencia neuronal en el contexto de la isquemia cerebral.

Asimismo se ha identificado HMG1Y como un factor de transcripción involucrado y regulado durante la isquemia cerebral. Se ha observado que la isquemia induce un aumento de la expresión proteica de HMG1Y y un incremento de sus interacciones con otros FTs que modulan funciones cerebroreparadoras. Asimismo se ha demostrado una asociación entre

HMG1Y y proteínas angiogénicas y la capacidad de este factor de transcripción para promover la viabilidad de células endoteliales cerebrales.

Por lo tanto, la identificación y caracterización de los factores de transcripción Oct-2 y HMG1Y como potenciales dianas terapéuticas en el contexto de la isquemia cerebral, permite conocer parte de los mecanismos moleculares que modulan los procesos endógenos de cerebroreparación y a la vez establecer las bases del diseño de nuevos fármacos y estrategias terapéuticas que promuevan éstos procesos.

Por otro lado, debido a la ausencia en la bibliografía de un protocolo estandarizado de isquemia cerebral *in vitro* para las RBMVEC, en la presente tesis se han optimizado las condiciones de privación de oxígeno y glucosa en el contexto de nuestro estudio. En este análisis se ha observado que el protocolo óptimo de privación de oxígeno y glucosa consiste en 90 minutos de exposición utilizando medio DMEM sin glucosa y medio de RBMVEC convencional durante la reperusión. Este protocolo optimizado promueve un aumento de la viabilidad de las células endoteliales a los tres días después de la privación de oxígeno y glucosa (sin el aumento de la citotoxicidad) y mantiene la integridad del ARN hasta los cinco días de reperusión. Finalmente, se analizó la estabilidad génica de potenciales genes endógenos para el modelo de privación de oxígeno y glucosa definido y se concluyó que el gen *Sdha* es el óptimo para la normalización de los resultados de expresión génica realizados en el modelo optimizado.

SUMMARY

Recently it has been observed that the understanding of the underlying mechanisms that regulate transcriptional programs in various pathophysiological processes, has become essential in order to develop new optimal therapeutic strategies. Specifically, in the context of stroke, the study of transcriptional regulators and genes involved in the modulation of ischaemic process, as the endogenous brain potential to compensate and repair the damage and ischaemic injury, may be the basis to find out mechanisms to improve the limitations of currently used therapies for the treatment of stroke.

In this thesis there have been identified and characterized two transcription factors regulated during cerebral ischaemia: Oct-2 and HMG1Y.

This is the first work in which the Octamer family, specifically the Oct-2 transcription factor, has been studied in the context of cerebral ischaemia. This thesis shows that ischaemia induces differences in Oct-2 binding activity and gene expression in the acute as well as in the chronic phase of ischaemia. Also it has been described a neuronal localization of Oct-2 as well as its interaction with other transcription factors in control and ischaemic rat brain. Moreover, the results report that the Oct-2 modulated response have a beneficial role in neural physiological functions, suggesting that it could be involved in reducing neuronal damage and promoting neuronal survival in the context of cerebral ischaemia.

In addition, HMG1Y has been identified as a transcription factor involved and regulated during cerebral ischaemia. The present thesis shows that cerebral ischaemia induces an increase of the HMG1Y protein expression and a promotion of the HMG1Y number of interactions with other transcription factors modulating brain repair functions. Furthermore, it has been demonstrated an association between HMG1Y and angiogenic proteins and the transcription factor ability to promote brain endothelial cells viability.

Therefore, the identification and characterization of the Oct-2 and HMG1Y transcription factors as potential therapeutic targets in the context of brain ischaemia, allows to know the molecular mechanisms that modulate the brain repair endogenous mechanisms and to establish the basis for the design of new drugs and therapeutic strategies that promote these processes.

On the other hand, due to the absence of a standardized *in vitro* cerebral ischaemia protocol for RBMVEC in literature, in this thesis we have optimized the oxygen-glucose deprivation conditions (OGD) in the context of our study. From this analysis it has been observed that the optimal protocol is to expose the cells during 90 minutes of OGD using glucose-free DMEM and conventional RBMVEC during the reperfusion phase. This optimized protocol promotes an increase of endothelial cell viability after three days of OGD (without an increase of the cytotoxicity) and maintains the integrity of the RNA until the fifth day of reperfusion. Finally, the stability of potential endogenous genes for the defined OGD model was also analyzed and we found that the *Sdha* gene is the most suitable for the normalization of the gene expression in the optimized model.

I INTRODUCCIÓN

I. INTRODUCCIÓN

1 Enfermedad cerebrovascular

La enfermedad cerebrovascular (ECV) o ictus es la alteración transitoria o permanente, del parénquima encefálico debida a la interrupción o reducción drástica del aporte sanguíneo¹¹. Las lesiones producidas por un ictus isquémico son el resultado de una compleja serie de eventos metabólicos celulares que ocurren rápidamente después de la interrupción del flujo de sangre con nutrientes a una región del cerebro (apartado 2 de esta sección). La duración, la gravedad y localización de la isquemia cerebral focal determina el alcance y la gravedad del ictus¹². Recientemente se han desarrollado terapias recanalizadoras capaces de modificar la evolución natural del ictus, pero lamentablemente sólo son eficaces si se administran de forma muy precoz. Ello obliga a implementar sistemas que coordinen los diferentes niveles asistenciales para asegurar el mínimo tiempo de respuesta que permita la evaluación y el tratamiento del paciente en el medio hospitalario. En este sentido, se ha mostrado útil la implantación del llamado «código ictus» para coordinar los servicios extrahospitalarios de transporte urgente con los servicios hospitalarios (equipos unidades de ictus)¹²⁻¹⁵. A medida que pasa el tiempo, las posibilidades de recuperación se reducen. Así pues, el ictus es una emergencia médica, donde cada minuto que transcurre desde el inicio de los síntomas hasta que se instaura el tratamiento es fundamental¹².

1.1 Sintomatología

Los síntomas más comunes en la enfermedad cerebrovascular son la pérdida de fuerza o sensibilidad en el rostro, el brazo, la pierna o en una mitad del cuerpo; la pérdida de visión en un solo ojo (amaurosis fugax); la pérdida de la capacidad del habla, habla ininteligible o dificultad para entender lo que le dicen; o la aparición de un dolor de cabeza intenso y

repentino claramente diferente de dolores de cabeza que pueda haber presentado previamente el paciente ¹².

1.2 Epidemiología y factores de riesgo

El ictus es una de las principales causas de mortalidad y morbilidad en el mundo industrializado, siendo el motivo más frecuente de hospitalización por enfermedad neurológica. Supone la tercera causa de muerte (después de la enfermedad cardiovascular y el cáncer) ^{12,16,17}, es la primera causa de discapacidad en la población adulta en el mundo y la segunda de demencia ¹⁸. En población española es responsable del 10% de la mortalidad global del país, constituye la segunda causa de muerte en varón y primera en la mujer adulta ¹¹.

La incidencia de las enfermedades cerebrovasculares se incrementa con la edad, por ello, aunque la mortalidad ha descendido en los países industrializados, el envejecimiento progresivo de estas poblaciones determina que su incidencia y su carga social aumente. Considerada en conjunto, la ECV tiene una prevalencia cercana al 5% en los grupos de edad de 65 a 84 años y del 7% a partir de los 75 años. Mientras los países desarrollados muestran tasas estables de mortalidad por ECV, los países en desarrollo incrementan sus tasas anuales de prevalencia y mortalidad por ictus, siendo responsable de cuatro millones y medio del total de diez millones de muertes anuales ¹¹.

La incidencia del ictus varía entre los distintos países europeos. En nuestro país se estima en 150 casos por cada 100.000 habitantes y año ^{17,19} con una prevalencia aproximada de un 4 a 8% en individuos mayores de 65 años ²⁰.

En el año siguiente a padecer un ictus, un tercio de los pacientes fallecerá, otro tercio quedará con graves secuelas, y sólo un tercio quedará con secuelas menores o sin secuelas. Debido a la elevada carga social que condiciona (discapacidad física y psíquica), juntamente

con el enorme gasto sanitario que conlleva (el ictus consume el 3-4% del gasto sanitario total en países desarrollados)^{18,21}, no es de extrañar que en los últimos años se haya generado un gran interés por el conocimiento de esta patología, por sus mecanismos de producción y por el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas.

Un factor de riesgo puede definirse como la característica biológica o hábito que permite identificar a un grupo de personas con mayor probabilidad que el resto de la población general para presentar una determinada enfermedad a lo largo de su vida ²². Su identificación permite establecer estrategias y medidas de control en los sujetos que todavía no han padecido la enfermedad (prevención primaria), o si ya la han presentado evitar o reducir el riesgo de recidivas (prevención secundaria). Los estudios epidemiológicos han identificado un gran número de factores de riesgo para el ictus, lo que refleja la heterogeneidad de este síndrome (Tabla 1). Los factores de riesgo del ictus se dividen habitualmente en: factores modificables, potencialmente modificables y no modificables, y de acuerdo con la solidez de la evidencia en factores bien documentados o menos documentados. Recientemente, el estudio INTERSTROKE puso de manifiesto como sólo diez factores de riesgo pueden explicar el 90% del riesgo de ictus ^{12,23}.

Tabla 1. Factores de riesgo de la enfermedad cerebrovascular. Adaptada de Sacco *et al.*, 1997⁶.

FACTORES DE RIESGO BIEN DOCUMENTADOS O CONFIRMADOS	FACTORES DE RIESGO MENOS DOCUMENTADOS O POSIBLES
<p>1. Modificables:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Hipertensión arterial - Cardiopatía: Fibrilación auricular - Endocarditis infecciosa - Estenosis mitral - Infarto de miocardio reciente - Tabaquismo - Anemia de células falciformes - Ictus o AIT previos - Estenosis carotídea asintomática - Hipercolesterolemia - Consumo de alcohol <p>2. Potencialmente modificables :</p> <ul style="list-style-type: none"> - Diabetes mellitus - Hiperhomocisteinemia - Estados de hipercoagulación - Hipertrofia ventricular izquierda <p>3. No modificables:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Edad - Sexo - Factores hereditarios - Raza/etnia - Localización geográfica - Nivel sociocultural 	<p>1. Potencialmente modificable:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Cardiopatía: <ul style="list-style-type: none"> • Miocardiopatía • Discinesia de la pared ventricular • Endocarditis no bacteriana • Calcificación del anillo mitral • Estenosis aórtica • Prolapso mitral • Foramen oval permeable • Aneurisma del septo auricular • Contraste ecocardiográfico espontáneo - Uso de anticonceptivos orales - Consumo de drogas - Inactividad física - Obesidad - Hematocrito elevado - Factores dietéticos - Hiperinsulinemia y resistencia a la insulina - Desencadenantes agudos: estrés - Infecciones - Migrañas - Procesos subclínicos <p>2. No modificables:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Estación y clima

1.3 Clasificación de la ECV

La clasificación más sencilla y extendida de la ECV es la que hace referencia a su naturaleza, que la divide en dos grandes grupos: isquémica (constituyen el 85% de los ictus) y hemorrágica (el 15%) (Figura 1). Asimismo, y al considerar en ellas variables como la etiología, la localización o el mecanismo de producción, se aplican distintos términos con el objetivo de mejorar su descripción. La isquemia se produce como consecuencia de la falta de aporte sanguíneo al encéfalo, mientras que la hemorragia se debe a la extravasación de sangre por la rotura de un vaso sanguíneo intracraneal².

1.3.1 Isquemia cerebral

En el término isquemia cerebral se incluyen todas las alteraciones del encéfalo secundarias a un trastorno del aporte circulatorio, ya sea cualitativo o cuantitativo. La isquemia puede afectar solamente a una zona del encéfalo (isquemia focal) como cuando se ocluye una arteria cerebral, o comprometer a todo el encéfalo de forma simultánea (isquemia global) como sucede en caso de una parada cardíaca o hipotensión grave. La isquemia focal es la forma más frecuente de afectación vascular del cerebro.

Asimismo, dependiendo de la duración, actualmente hablamos de ataque isquémico transitorio (AIT) cuando los síntomas/signos provocados por la isquemia cerebral duran menos de una hora y sin que se demuestre evidencia de infarto en las pruebas de neuroimagen. Siguiendo esta misma definición, hablamos de infarto cerebral cuando el déficit neurológico focal tiene una duración superior a una hora o se produce una necrosis tisular demostrada en neuroimagen ^{2,24-26}.

El infarto cerebral puede clasificarse a su vez, en función de diferentes variables. Según el perfil evolutivo (infarto progresivo, con tendencia a la mejoría o estable); por el mecanismo de producción (infarto trombótico, embólico o hemodinámico); según la etiología (infarto aterotrombótico, cardioembólico, lacunar, inhabitual o de causa indeterminada); según las características de neuroimagen (infarto isquémico, hemorrágico, silente, leucoaraiosis o penumbra isquémica); según la topografía vascular (de origen arterial, de territorio frontera o de origen venoso); según el tamaño de la arteria (por afectación de vaso arterial grande o por afectación de vaso pequeño) y finalmente por la topografía parenquimatosa (infarto completo de la circulación anterior o TACI, infarto parcial de la circulación anterior o PACI, infarto lacunar o LACI e infarto de la circulación posterior o POCI) ^{2,24,25,25,26}.

1.3.2 Hemorragia cerebral

En el ictus hemorrágico podemos distinguir principalmente dos tipos: la hemorragia cerebral y la subaracnoidea.

Se define como hemorragia cerebral o ictus hemorrágico a la extravasación de sangre dentro de la cavidad craneal, secundaria a la rotura de un vaso sanguíneo, arterial o venoso. Dependiendo de donde se produzca primariamente el sangrado se distingue:

- La hemorragia parenquimatosa o intracerebral (HIC): es la colección hemática dentro del parénquima cerebral producida por la rotura espontánea de un vaso. Dependiendo de la topografía del sangrado se puede clasificar en profunda (ganglios basales o tálamo), lobar (cortical o subcortical), cerebelosa o de tronco cerebral ²⁵.
- La hemorragia intraventricular: el sangrado se produce en el interior de los ventrículos cerebrales ²⁵.

Por otro lado, la hemorragia subaracnoidea espontánea o no traumática, se debe a la extravasación de sangre directamente en el espacio subaracnoideo y es la causa más frecuente de la rotura de un aneurisma congénito ^{2,24-26}.

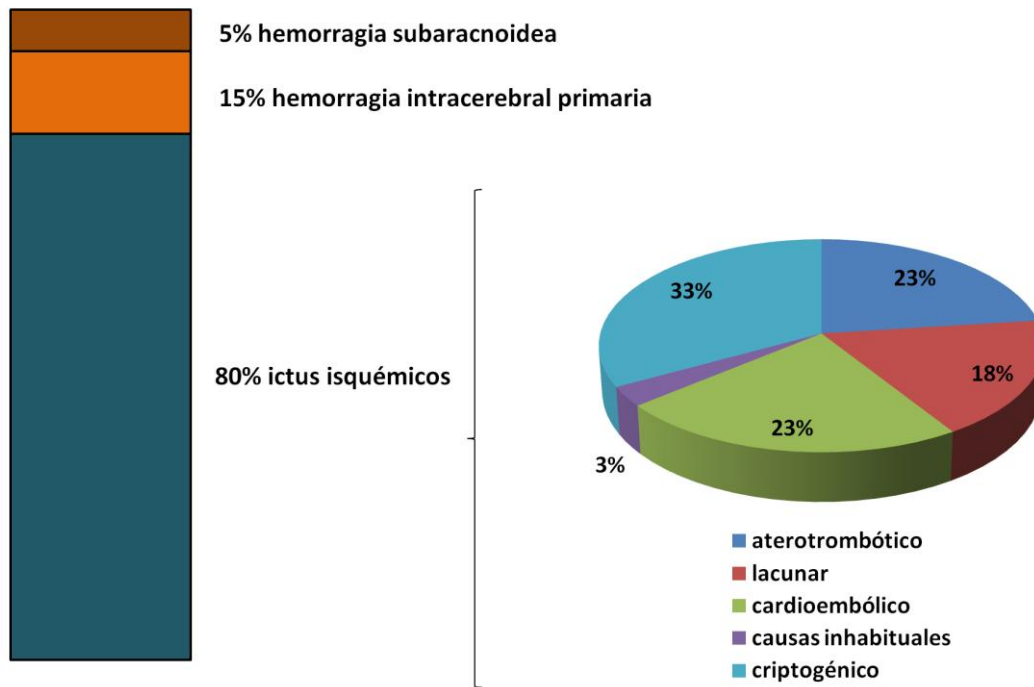


Figura 1. Frecuencia aproximada de los principales tipos de ictus y de los principales subtipos de isquemia cerebral, según estudios poblacionales. Datos procedentes de RENISEN y Warlow *et al.*, 2003 ¹

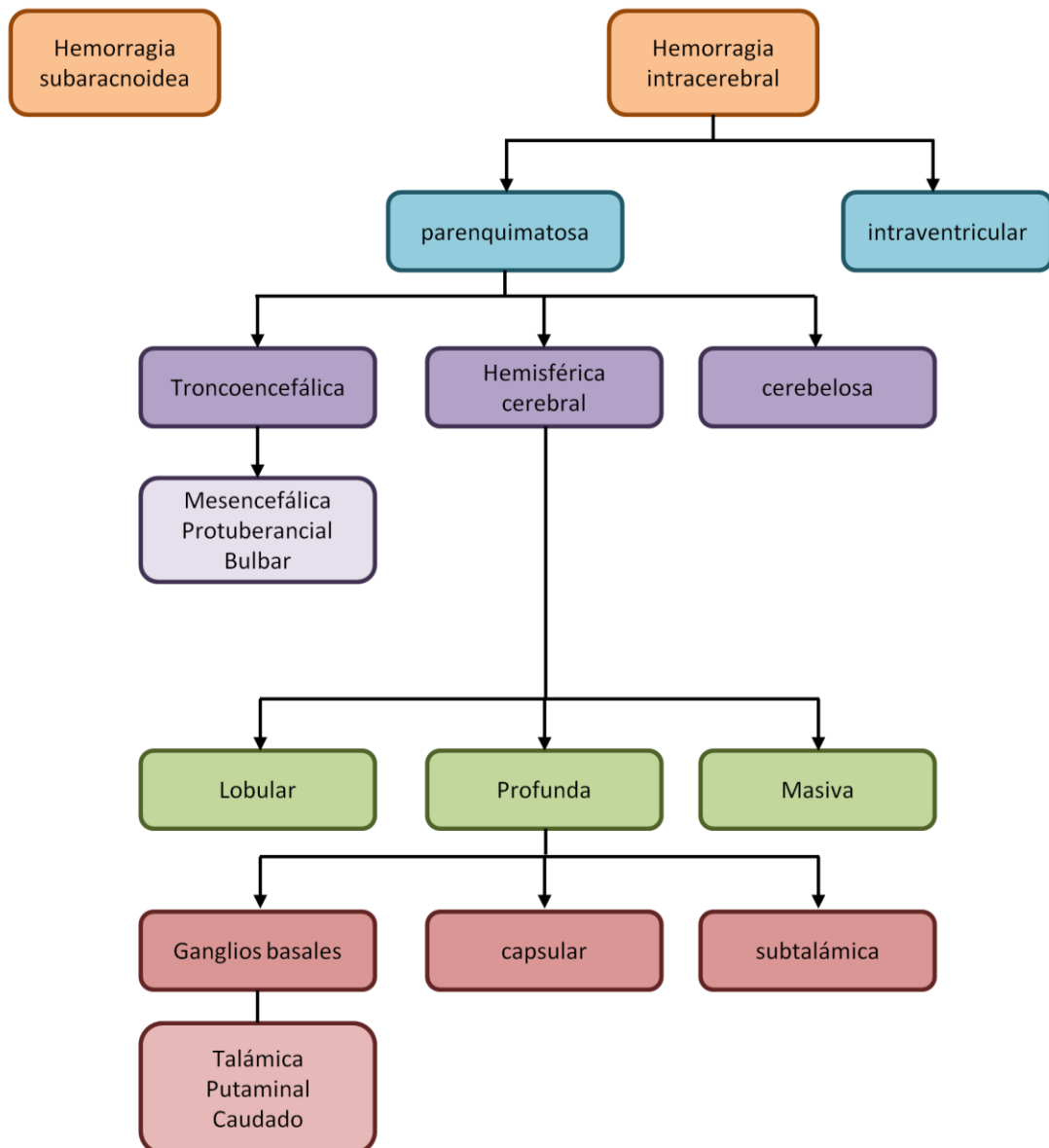


Figura 2. Clasificación del ictus hemorrágico según la localización topográfica y la extensión. Adaptada de Arboix A et al., 2006 ²

1.4 Diagnóstico y pronóstico

La identificación rápida del ictus, su diagnóstico etiopatogénico y su adecuado tratamiento con la aplicación de terapias específicas, cuidados generales en unidades de ictus (ver apartado 1.5.1 de esta sección) y tratamiento preventivo específico para cada subtipo de ictus, es vital para disminuir el daño cerebral irreversible, evitar recurrencias y, así, conseguir una mejor recuperación funcional del paciente ²⁷.

El proceso diagnóstico incluye los siguientes apartados: historia clínica, exploración general y neurológica, y exploraciones complementarias.

En la historia clínica se debe prestar atención a los antecedentes vasculares personales y familiares, la forma de instauración de la focalidad neurológica y, especialmente, la hora de inicio de los síntomas. La exploración neurológica debe confirmar la sospecha de una focalidad neurológica y permitirá realizar una orientación acerca de la topografía del ictus. Estos datos, juntamente con la exploración general, los datos de la analítica, el electrocardiograma y la radiografía de tórax, nos permitirán realizar una aproximación diagnóstica sobre la posible etiología del ictus ²⁷.

En las exploraciones más específicas es esencial la realización de una tomografía computarizada (TC) craneal urgente para descartar la hemorragia cerebral, otras causas de focalidad neurológica y confirmar la naturaleza isquémica del proceso. La TC craneal es de gran ayuda para valorar la extensión del infarto e instaurar un tratamiento fibrinolítico ²⁷.

En los pacientes que han experimentado un ictus isquémico se realiza un estudio dúplex/Doppler de troncos supraaórticos y transcraneal. El estudio carotídeo permite diagnosticar la etiología aterotrombótica del ictus isquémico y valorar tratamientos preventivos específicos. A pesar de la elevada sensibilidad y especificidad del estudio ultrasonográfico (dúplex color de troncos supraaórticos más Doppler/dúplex transcraneal) esta técnica también se puede asociar a otras técnicas de imagen no invasivas como la angi-resonancia magnética o la angio-TC.

La resonancia magnética (RM) craneal resulta muy útil en el diagnóstico y manejo del ictus, no sólo porque ayuda a confirmar y localizar topográficamente los infartos, sino también por su utilidad en su tratamiento agudo. En la actualidad se dispone de secuencias de difusión (DWI) que nos muestran el tejido infartado en la fase aguda, y mediante secuencias de perfusión (PWI) podemos cuantificar la extensión del tejido hipoperfundido; la diferencia entre

ambas zonas nos identificará el tejido en penumbra o *mismatch* y, por lo tanto potencialmente recuperable con tratamientos recanalizadores. Esta técnica se recomienda para localizar y confirmar infartos lacunares y para valorar el ictus de territorio vertebrobasilar. Se recomienda completar el estudio con angio-RM ²⁷.

Es muy complicado establecer un pronóstico para los ictus. Como se ha visto, dependerá enormemente del tipo de ictus de que se trate y del tiempo que ha permanecido el tejido cerebral sin recibir sangre; de la zona afectada; de la edad, sexo y raza del paciente; y de su propia capacidad de recuperación ²⁷.

Los avances en diagnóstico y tratamiento han sido fundamentales; y el control de los factores de riesgo resulta vital para impedir la aparición de un primer ictus (prevención primaria) o de una recaída (prevención secundaria).

1.5 Tratamiento del ictus isquémico

Desde el punto de vista terapéutico se pueden actuar en cuatro fases de la enfermedad: prevención primaria, fase aguda (desde el inicio de los síntomas hasta la finalización del empeoramiento neurológico y estabilización médica del paciente -horas o días-), fase subaguda (desde la finalización de la fase aguda hasta el control de las complicaciones médicas derivadas del ictus -días o semanas-) y fase crónica (desde la terminación de la fase subaguda hasta alcanzar los máximos niveles de recuperación y de prevención secundaria -meses o años)

⁷. Los objetivos terapéuticos actuales de cada una de estas fases se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2. Objetivos terapéuticos actuales según la fase de la enfermedad. Adaptado de Ruíz-Giménez N *et al.*, 2002⁷.

FASE TERAPÉUTICA	TRATAMIENTO
Prevención primaria	<i>Control de los factores de riesgo vascular</i>
Fase aguda	<i>Control de los factores que pueden agravar la lesión cerebral</i> <i>Tratamiento recanalizador</i>
Fase subaguda	<i>Prevención de las complicaciones médicas</i> <i>Inicio de la rehabilitación</i>
Fase crónica	<i>Prevención de las recurrencias</i> <i>Rehabilitación</i> <i>Tratamiento de la depresión</i>

Respecto al tratamiento agudo del ictus, éste se puede subclasificar en dos partes principales: las medidas generales y el tratamiento recanalizador.

1.5.1 Medidas generales: unidades de ictus

Los cuidados generales han demostrado ser eficaces en mejorar el pronóstico de los pacientes con ictus. La hipoxia, la hipertensión arterial grave o la hipotensión, la hiperglucemia, la deshidratación y la desnutrición son factores que influyen negativamente en el pronóstico funcional del ictus al provocar mayor daño neuronal^{28,29}. El control de constantes, el tratamiento y la detección precoz de estas complicaciones, así como la movilización precoz, son medidas incluidas en todas las guías y recomendaciones de atención al ictus².

Las unidades de ictus son unidades de cuidados agudos no intensivos destinadas de forma exclusiva a la atención de pacientes con ictus. Estas unidades están formadas por equipos multidisciplinares, coordinadas por neurólogos con formación especializada en enfermedades cerebrovasculares, con atención inmediata, disponibilidad continua de técnicas

diagnósticas (la TC, el Doppler/dúplex de troncos supraaórticos y transcraneal, y con frecuencia la RM o TC multimodal con protocolos con secuencias de difusión, perfusión y angio). Las unidades están formadas por 4-8 camas, según las necesidades y donde los pacientes son monitorizados de forma continuada para detectar y corregir precozmente los factores que puedan agravar el proceso isquémico agudo y donde puedan recibir tratamiento específico para el infarto cerebral. En estas unidades se mantiene una observación continua por el personal de enfermería y se sigue un protocolo estandarizado de evaluación diagnóstica, tratamiento y rehabilitación. Esta atención multidisciplinar y especializada es la base del concepto de las unidades de ictus. El desarrollo de estas unidades ha mostrado una reducción significativa de la mortalidad, la morbilidad, la estancia hospitalaria y los costes³⁰⁻³³.

1.5.2 La recanalización como estrategia terapéutica

La recanalización o reperfusión trata de reinstalar el flujo de sangre antes que se desarrolle daño tisular irreversible. La reperfusión de un vaso ocluido puede lograrse mediante la administración de un agente trombolítico (ya sea a través de la vía intravenosa o intraarterial) que disuelve el coágulo de sangre, o mediante la captura mecánica o disolución del émbolo ocluyente, que a menudo se realiza en conjunto con la trombólisis arterial. La terapia de reperfusión representa hoy en día la piedra angular de la terapia actual del ictus, y es un requisito indispensable para la supervivencia del tejido, ya que sin la reperfusión el tejido está destinado a morir³⁴.

1.5.2.1 Trombólisis intravenosa

En junio de 1998, la *Food and Drug Administration* (FDA) en Estados Unidos y en 1999 en Canadá aprobaba el uso del activador tisular del plasminógeno recombinante (r-TPA) como el primer tratamiento para el ictus isquémico agudo. Desde marzo de 2003, la utilización de r-TPA por vía intravenosa está aprobada por la Agencia Europea del Medicamento en pacientes

con infarto cerebral agudo de menos de 3 horas de evolución que cumplan criterios de selección estrictos (ver criterios de exclusión en la Tabla 3).

El beneficio se basa en los resultados del estudio NINDS, que demostró que el uso de r-TPA en menos de 3 horas mejora la evolución clínica y funcional de los pacientes a los tres meses de experimentar el ictus ^{2,35}. Las complicaciones hemorrágicas, y en concreto la hemorragia cerebral sintomática, son el principal riesgo del tratamiento con r-TPA. Un metaanálisis de los estudios poscomercialización indica que, en la práctica habitual, el riesgo de hemorragia es del 5,2% ³⁶, pero la tasa de complicaciones hemorrágicas disminuye y el tratamiento tiene un margen de seguridad adecuado si se siguen estrictamente las recomendaciones de administración y los criterios de selección de los pacientes.

Tabla 3. Criterios de inclusión y exclusión de la terapia trombolítica con r-TPA

Criterios de inclusión
<ul style="list-style-type: none">- Pacientes con ictus isquémico agudo de menos de 3 horas de evolución en los que no concurra alguno de los siguientes criterios de exclusión
Criterios de exclusión
<ul style="list-style-type: none">- Hemorragia intracraneal en TC- Evolución de los síntomas superior a 3 horas o desconocimiento de la hora de inicio- Síntomas menores o en mejoría franca antes del inicio de la infusión- Ictus grave según criterios clínicos (NIHSS>25) o de neuroimagen- Crisis comiciales al inicio del ictus- Síntomas indicativos de hemorragia subaracnoidea aunque la TC sea normal- Tratamiento con heparina en las 48 horas previas y TTPA elevado- Ictus previo en cualquier momento e historia de diabetes- Ictus en los 3 meses previos- Recuento de plaquetas por debajo de 100000- Glucemia por debajo de 50 mg/dl o por encima de 400 mg/dl- PAS > 185 mmHg, PAD > 110 mmHg o necesidad de medidas drásticas para bajar la PA a estos límites- Diátesis hemorrágica conocida- Tratamiento con anticoagulantes orales. Podría considerarse tratamiento con r-TPA si INR < 1,7- Hemorragia grave reciente o manifiesta- Historia de hemorragia intracraneal- Antecedentes de hemorragia subaracnoidea por rotura aneurismática- Historia de lesión del sistema nervioso central (aneurismas, neoplasias, cirugía intracraneal o espinal)- Retinopatía hemorrágica (p. ej., retinopatía diabética)- Antecedentes de masaje cardíaco, parto o punción en vaso sanguíneo no accesible en los 10 días previos- Endocarditis bacteriana y pericarditis- Pancreatitis aguda- Enfermedad ulcerativa gastrointestinal documentada en los 3 meses previos. Varices esofágicas. Malformaciones vasculares intestinales conocidas- Neoplasia con aumento del riesgo de hemorragia- Enfermedad hepática grave (insuficiencia hepática, cirrosis, hipertensión portal, hepatitis activa)- Cirugía mayor o traumatismo significativo en los 3 meses previos

En 2007 se publicaron los resultados del estudio SITS-MOST, de fase IV, realizado por exigencia de la Agencia Europea del Medicamento (6483 pacientes incluidos procedentes de 285 centros de 14 países) y se demostró definitivamente la eficacia del tratamiento trombolítico endovenoso con r-TPA aplicado en las primeras 3 horas desde el inicio del ictus,

(54,8% de los pacientes tratados independientes a los 3 meses y una incidencia de hemorragias sintomáticas del 7,3%). Tal como ha demostrado el estudio ECASS III (*European Cooperative Acute Stroke Study III*) y ha sido aprobado en práctica clínica habitual el margen terapéutico se extiende hasta las 4,5 horas desde el inicio del ictus¹⁵, aunque como ya se ha comentado, el beneficios de la trombólisis es mayor cuanto antes se administre. No obstante, hay pruebas de que los beneficios de la trombólisis son mayores cuanto antes se administre el tratamiento. Dos estudios europeos (ECASS I y ECASS II), no mostraron beneficio al ampliar la ventana a 6 horas, lo que demuestra la estrecha ventana terapéutica del tratamiento. Por ello se debe evitar cualquier retraso innecesario³⁷.

Se ha descrito que hasta un 15-20% de pacientes tratados con trombólisis intravenosa pueden presentar una reoclusión arterial, principalmente en los casos en los que se produce una recanalización incompleta. El estudio CLOTBUST (*Combined Lysis of Thrombus in Brain ischemia with Transcranial Ultrasound and Systemic TPA*), demuestra que la aplicación de ultrasonidos sobre la arteria ocluida de forma simultánea a la administración de r-TPA mejora la tasa de recanalización y la evolución de los pacientes. Otros tratamientos, como la asociación de antiacoagulantes (el argatrobano) o antiagregantes de acción rápida (el tirofiban, el abciximab o la eptifibatida) con el r-TPA para evitar la reoclusión, muestran resultados prometedores, sin embargo los datos son limitados y aún hay estudios en marcha (*ARTSS-2, Randomized Controlled Trial of Argatroban With tPA for Acute Stroke*; *ARTTS, Argatroban TPA Stroke Study*; *CLEAR-FDR, Study of the Combination Therapy of Rt-PA and Eptifibatide to Treat Acute Ischemic Stroke*)³⁸⁻⁴⁰.

También se han estudiado nuevos trombolíticos de síntesis modificados para mejorar la capacidad trombolítica y la afinidad y selectividad por el sustrato (desmoteplasa, reteplasa, tenecteplasa), con el fin de reducir las complicaciones hemorrágicas asociadas. Sin embargo, actualmente la desmoteplasa en una ventana de hasta 9 horas utilizando RM multimodal es el

único activador del plasminógeno de tercera generación que está en desarrollo avanzado en ensayos clínicos (DIAS-4, *Efficacy and Safety Study of Desmoteplase to Treat Acute Ischemic Stroke*)^{37,38,41}.

1.5.2.2 Trombólisis intraarterial

El uso de la trombolisis intra-arterial (IA) tiene algunas ventajas y desventajas, respecto al tratamiento trombolítico IV. Por un lado permite administrar concentraciones mayores de agentes trombolíticos directamente o cerca del coágulo mejorando el índice de recanalización. Por otro lado, permite un mejor ajuste de la dosis con una visualización angiográfica directa de la lisis del trombo y la posibilidad de usar disrupción mecánica para facilitar la trombolisis (a diferencia de la trombolisis IV). Además, permite trabajar a dosis menores de fármacos lo cual minimiza los efectos adversos sistémicos y la incidencia de hemorragia intracerebral^{8,9}. En los ensayos *Prolyse in Acute Cerebral Thrombo-embolism* (PROACT) I y II, se analizó el uso de la Urokinasa y la pro-Urokinasa, respectivamente, administradas de forma IA. El estudio PROACTII fue el primero que mostró la eficacia clínica del uso de la trombolisis IA en pacientes con ictus isquémico agudo con una oclusión de menos de 6 horas de duración. Ambos estudios mostraron un aumento de la tasa de recanalización juntamente con un diagnóstico clínico más favorable en el grupo de estudio. Sin embargo, la tasa de hemorragia intracerebral sintomática observada fue el doble de la observada en el ensayo NINDS. Además, estos estudios sugirieron que la terapia trombolítica IA sola no es adecuada para conseguir una rápida y completa recanalización de los vasos cerebrales ocluidos^{8,9}. La limitación más importante del tratamiento trombolítico intraarterial es la necesidad de realizar una angiografía superselectiva de urgencia, que requiere un neurólogo/neuroradiólogo intervencionista y un equipo especial de cuidados de ictus²⁷.

De momento, los datos existentes acerca de los ensayos clínicos que han estudiado la combinación de trombólisis intravenosa e intraarterial (EMS, *Emergency Management of*

Stroke Bridging Trial; IMS I, II, *Interventional management of stroke trial I, II*) indican que no existe ningún beneficio significativo en la evolución de los pacientes ³⁸, sin embargo, destacan el potencial de los dispositivos mecánicos para conseguir una recanalización más eficiente.

1.5.2.3 Trombólisis mecánica

La trombectomía mecánica (o disrupción mecánica del coágulo arterial) representa una alternativa viable respecto a la trombólisis química para los pacientes con ictus agudo isquémico en los que la terapia IV ha fallado o los que han sido excluidos de la terapia IV por cumplir alguno los criterios de exclusión. Los métodos mecánicos comprenden una amplia variedad de aparatos diseñados para retirar mecánicamente (dispositivo MERCI, Catch, Phenox Clot), fragmentar (dispositivo *Endovascular Photoacoustic Recanalization*, EPAR; dispositivo LaTIS Laser), aspirar (sistema de embolectomía de la penumbra) o capturar (*self-expandable stents* (SES): Neuroform, Enterprise, Solitaire/Solo, Wingspan) el trombo, la placa aterosclerótica y otras oclusiones vasculares ^{42,43}. En la Tabla 4 se muestran algunas de las ventajas y desventajas relacionadas con esta terapia ⁹.

Tabla 4. Ventajas y desventajas de la trombólisis mecánica como opción terapéutica en el ictus isquémico agudo. Adaptado de Chaudhary *et al.*, 20011; Yeo and Sharma 2013 ^{8,9}.

VENTAJAS	DESVENTAJAS
-Recanalización más rápida que trombolisis IA	-Se requiere un personal altamente capacitado con habilidades técnicas
-Más efectivo en quitar grandes trombos en vasos proximales	-Lleva asociado riesgos inherentes
-Lleva asociado un menor riesgo de hemorragia	-Riesgo de hemorragia en el sitio de la punción arterial (catéteres voluminosos)
	-Puede causar daño endotelial y ruptura del vaso
	-Puede provocar riesgos isquémicos adicionales (si el coágulo emboliza desplazándose distalmente)

1.5.3 La neuroprotección como estrategia terapéutica

Otra estrategia terapéutica en el ictus isquémico agudo es la neuroprotección. El objetivo básico de esta estrategia es bloquear los procesos clave de la cascada isquémica

(disminuir el metabolismo, detener la apoptosis, reducir la neurocitotoxicidad) (ver apartado 2 de esta sección) mediante agentes farmacológicos para prevenir que el tejido cerebral isquémico donde el flujo cerebral aún persiste evolucione a tejido infartado. La eficacia y distribución de los agentes neuroprotectores depende de la existencia de tejido cerebral isquémico que aún no está dañado de forma irreversible (la penumbra). Esto promueve la reducción del tamaño final del infarto y por tanto un mejor pronóstico clínico ^{44,45}. Algunas ventajas del uso de agentes neuroprotectores respecto la terapia trombolítica es que no llevan asociados efectos adversos de alto riesgo (HIC), se pueden administrar en un lapso de tiempo más largo (hasta días después del ictus) y su fácil aplicación (la vía de administración acostumbra a ser la oral) ya que en muchos casos la administración IV o IA de trombolíticos es difícil o está contraindicada ^{34,44,45}.

Se han desarrollado diferentes agentes neuroprotectores con el objetivo de bloquear la cascada isquémica a diferentes niveles y así evitar el daño progresivo. No obstante, el efecto neuroprotector depende de la influencia de varios factores como el tiempo después del inicio del ictus, la persistencia de la interrupción del flujo sanguíneo, la presencia o ausencia de mecanismos de daño secundario (como la ola depresiva o el estrés de los radicales libres), o la temperatura cerebral. En los últimos veinte años, se han testado más de 1000 compuestos en modelos animales de isquemia cerebral pero de los 114 que han sido aceptados para ser testados en humanos mediante ensayos clínicos, hasta ahora ninguno de ellos ha conseguido ser eficiente en un ensayo de fase III ³⁴. Estos estudios fallidos incluyen: los inhibidores de la liberación del glutamato, los antagonistas de los canales del calcio voltaje-dependientes, los antagonistas de los receptores N-metil-D-aspartato (NMDA), los hiperpolarizantes de las membranas neuronales, los inhibidores de la peroxidación lipídica, los protectores de membranas celulares y los antiinflamatorios ⁴⁴. En la Tabla 5 se muestran los fármacos neuroprotectores ensayados en clínica humana. Para intentar solventar esta falta de traslación entre los estudios preclínicos en modelos animales y los ensayos clínicos en humanos, en 1999

se publicaron los criterios de *Stroke Therapy Academic Industry Roundtable* (STAIR), y posteriormente en 2009 se revisaron, donde se recopilan las recomendaciones para el desarrollo preclínico de potenciales agentes neuroprotectores para el ictus. Según estas recomendaciones, se deben analizar resultados histológicos y funcionales en múltiples especies animales mediante la monitorización fisiológica adecuada; la relación dosis-respuesta y la ventana terapéutica óptima para el tratamiento deben ser analizados; se deben definir los criterios de inclusión y exclusión *a priori*, se deben realizar cálculos apropiados y potentes del tamaño de la muestra; la aleatorización y la evaluación de los sesgos debe ser eliminados cuando sea posible; se recomiendan experimentos adicionales con animales hembras, adultos y con comorbidades, después de realizar experimentos en animales machos, jóvenes y sanos

46

Tabla 5. Fármacos neuroprotectores ensayados en clínica humana. Adaptado de Castillo, 2000³.

	BENEFICIO	EFFECTOS ADVERSOS
Inhibidores de la liberación de glutamato		
Fosfenitoína	-	-
Lubeluzol	+-	-
Lifarizina	-	+
Antagonistas de los canales del Ca²⁺ voltaje-dependientes		
Nimodipino	-	+
Flunaricina	-	+
Antagonistas de los receptores NMDA		
Selfotel	-	+
Dextrofan	-	+
Aptiganel	-	+
Eliprodi	-	-
Gavestinel	-	-
Hiperpolarizantes de las membranas neuronales		
Clometiazol	+-	-
MaxiPost	-	-
Inhibidores de la peroxidación lipídica		
Tirilzad	-	+
Ebselen	+	-
Protectores de membrana celulares		
Citicolina	+	-
Piracetam	+	-
Antiinflamatorios		
Enlimomab	-	+

1.5.3.1 Agentes neuroprotectores en fase de estudio

A pesar de los inconvenientes de la traslación de la preclínica a la clínica, aún hay prometedores ensayos clínicos en fase II y III en marcha sobre neuroprotectores candidatos para el ictus isquémico agudo. En la Tabla 6 se muestran los principales compuestos neuroprotectores que actualmente están siendo evaluados en ensayos clínicos en fase II ó III, juntamente con su mecanismo de acción y los beneficios observados en la fase pre-clínica ³⁸.

Tabla 6. Compuestos neuroprotectores para el ictus isquémico agudo en los ensayos clínicos de Fase II o III en marcha. Adaptado de Schmidt *et al.*, 2013 ¹⁰.

COMPUESTO	MECANISMO ACCIÓN	BENEFICIO OBSERVADO EN PRE-CLÍNICA
Fase III		
Sulfato de magnesio (FAST-MAG)	Anti-excitatorio, antagonista de la vasoconstricción	Reducción del tamaño de infarto, incremento del flujo sanguíneo cerebral, mejora de las funciones cerebrales
Ácido úrico (URICO-ICTUS)	Captador de radicales libres	Reducción del tamaño del infarto, mejora de las funciones cerebrales
Fase II		
Albúmina (Albumin)	Aumenta la perfusión microvascular y el flujo sanguíneo cerebral	Reduce el tamaño de infarto, reduce el edema cerebral, mejora las funciones cerebrales
Ciclosporina A (CsAStroke)	Anti-excitatorio, anti-apoptótico	Reduce el tamaño de infarto
PF-03049423	Anti-oxidante, anti-inflamatorio	Reduce el tamaño de infarto, mejora las funciones cerebral

PF-03049423: Paeoniflorin (PF)

2 Fisiopatología de la isquemia cerebral

Para comprender bien los mecanismos fisiopatológicos y las oportunidades terapéuticas en el ictus isquémico es razonable subdividir la evolución del ictus en tres fases principales:

- La primera fase se caracteriza por un fallo energético celular que resulta en la despolarización de las membranas celulares, ocurre en el centro del infarto y dura desde pocos segundos hasta minutos después de que el flujo cerebral se vea comprometido. Los agentes trombolíticos, previamente comentados, actúan en esta fase, restaurando la deficiencia de flujo sanguíneo cerebral y evitando el daño tisular irreversible.

- En la segunda fase se produce el crecimiento del infarto cerebral y dura desde minutos hasta las 6-72 horas después de la oclusión ^{47,48}, dependiendo de la severidad y duración de la isquemia. Su principal característica es la expansión del núcleo del infarto hacia la penumbra. Los mecanismos subyacentes que llevan a la expansión del infarto son la excitotoxicidad, la liberación de calcio, la formación de radicales libres, la disfunción del retículo endoplasmático y el fallo mitocondrial (eventos moleculares que en conjunto se denominan cascada isquémica). Es en esta fase donde actúan las terapias neuroprotectoras, intentando detener la conversión del tejido de la penumbra a tejido isquémico.
- La tercera es la fase crónica que se extiende durante días e incluso semanas después del daño. Se caracteriza por una plétora de mecanismos de daño secundarios incluidos: el edema vasogénico y citotóxico, la respuesta inflamatoria y la muerte celular tardía, los cuales contribuyen aún más a la progresión del daño tisular ⁴⁹.

La fisiopatología del ictus isquémico es compleja y comprende numerosos procesos. La isquemia se define como la reducción del flujo sanguíneo cerebral (FSC), suficiente para causar un déficit metabólico o funcional ³. El flujo sanguíneo cerebral es en condiciones normales mayor de 50 ml/100 g tejido cerebral/min. En el ictus isquémico, tras la obstrucción de una arteria va a haber una zona que presentará una disminución y/o ausencia de perfusión. La disminución del FSC por debajo de 10 mL/100 g/min produce la rápida muerte celular ⁵⁰. Sin embargo, entre este núcleo intensamente isquémico y el parénquima cerebral con perfusión normal (FSC > 50 mL/100 g/min), existe una zona moderadamente hipoperfundida, cuya extensión depende del mejor o peor funcionamiento de la circulación colateral ^{3,51}. Mediante estudios de tomografía por emisión de positrones (PET) se ha logrado diferenciar en esta zona hipoperfundida dos regiones: una ligeramente hipoperfundida (FSC > 22 mL/100 g/min) en la que el riesgo de convertirse en infarto sólo sucede en circunstancias especialmente adversas

(zona oligohémica), y otra, denominada de penumbra isquémica, con una perfusión cerebral críticamente disminuida ($FSC < 22 \text{ mL}/100 \text{ g}/\text{min}$), pero en la que el consumo de oxígeno es todavía suficiente para preservar la supervivencia tisular (Figura 3). Esta zona de penumbra se caracteriza por presentar una actividad eléctrica disminuida (alteración funcional), pero mantiene conservados los mecanismos de osmoregulación celular (integridad morfoestructural), siendo por tanto, viable. Cuando la disminución del FSC se mantiene en el tiempo más allá de minutos y no se restablece una perfusión adecuada, las zonas de penumbra serán reclutadas por el núcleo del infarto. Durante la fase aguda del ictus, la mayor parte de esta zona de penumbra progresará a infarto cerebral si no se controla adecuadamente^{52,53}. Por eso se dice que las características del daño cerebral dependen de la severidad y duración de la reducción del FSC^{18,54}

La isquemia cerebral es un proceso aponecrotico, ya que participan los dos procesos principales de muerte celular: la necrosis y la apoptosis. Mientras la necrosis es más dominante en el tejido del núcleo del infarto, las células de la penumbra mueren por cualquiera de los mecanismos, siendo la apoptosis el mecanismo de muerte más común en las células más lejanas al núcleo^{18,55}.

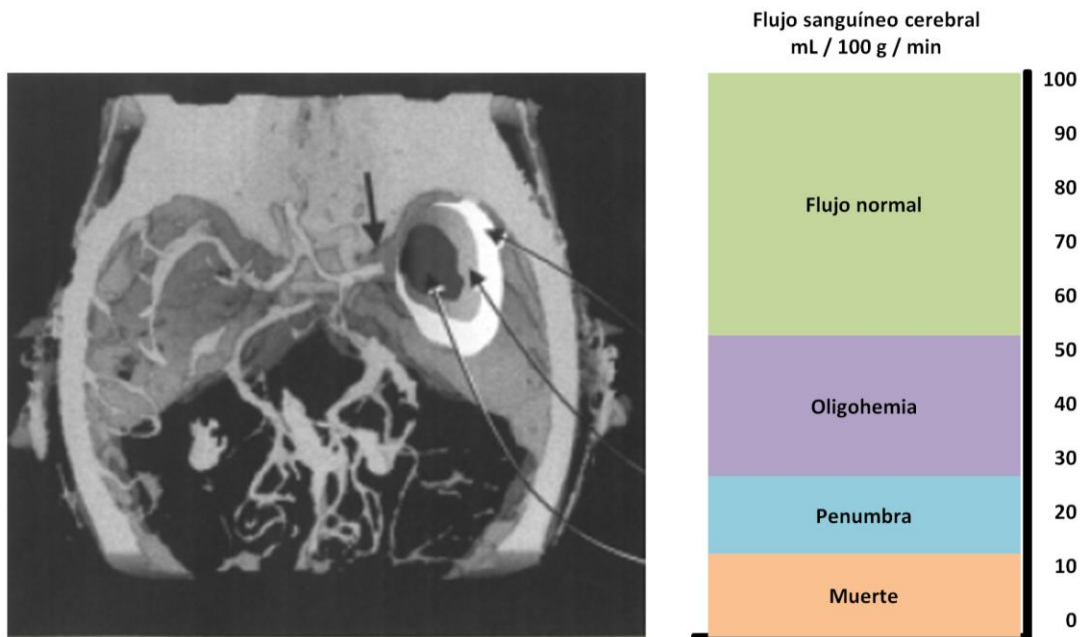


Figura 3. La obstrucción de la arteria cerebral media (flecha corta) origina un gradiente de presiones. En la zona central, con FSC < 10 mL/100 g/min, se produce una rápida muerte celular. Rodeando a este núcleo intensamente isquémico existe una zona de “penumbra” con FSC < 22 mL/100 g/min. Más periféricamente en la zona de oligohemia, con FSC > 22 mL/100 g/min, el riesgo de convertirse en infarto sólo sucede en circunstancias adversas. Adaptada de Castillo, 2000 ³.

En el ictus, después de la oclusión vascular, ocurre una compleja secuencia de eventos fisiopatológicos espaciales y temporales denominada cascada isquémica. Cada uno de estos eventos no sucede con un estricto orden sino que son fenómenos que se van solapando. A continuación los vamos a describir brevemente.

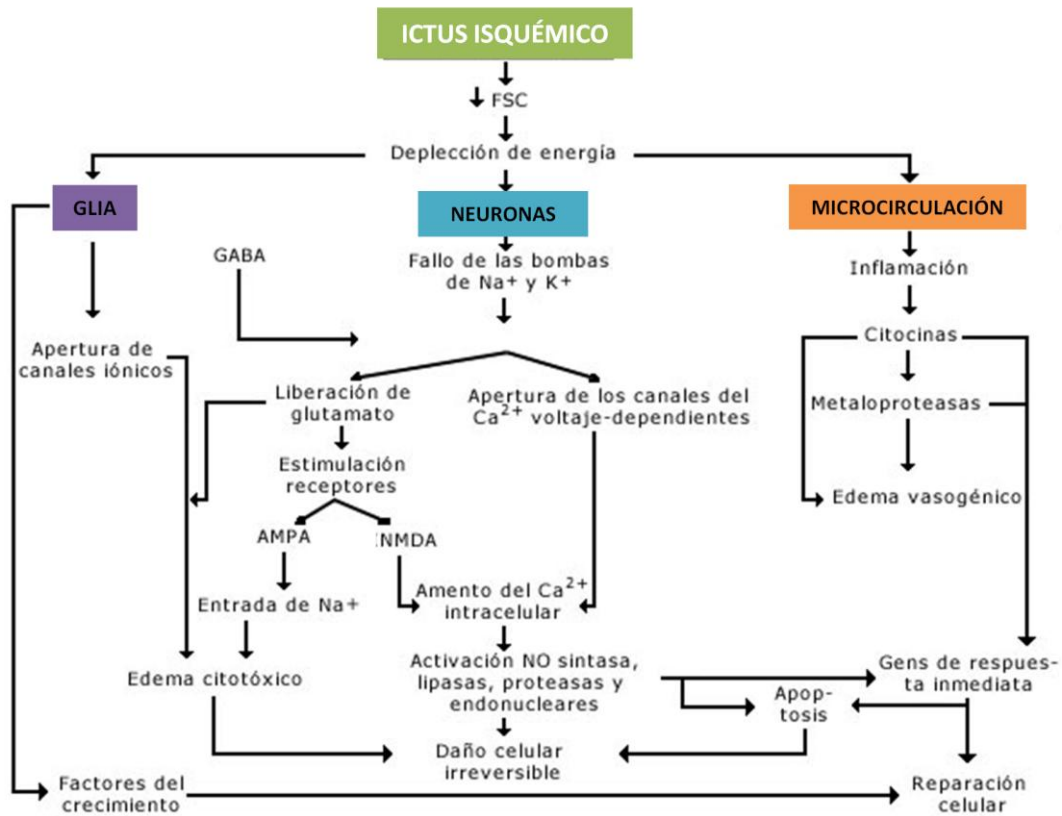


Figura 4. Esquema simplificado de los mecanismos implicados en la isquemia cerebral. Extraído y adaptado de José Castillo, 2001⁴.

2.1 Fallo energético

La primera consecuencia de la reducción del FSC es la depleción de los sustratos, particularmente el oxígeno y la glucosa, que causan la acumulación de lactato a través de la glicólisis anaerobia. El fallo energético lleva a la perturbación de las bombas ATPasa Na^+/K^+ y $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$, y a la reversión de los transportadores $\text{Na}^+-\text{Ca}^{2+}$, ocasionando la elevación del Na^+ , Ca^{2+} y Cl^- intracelulares y K^+ a nivel extracelular. Esta desregulación de la homeostasis iónica causa edema citotóxico y conduce a la activación de los eventos promovidos por el exceso de Ca^{2+} intracelular^{50,51,56,57}.

2.2 Excitotoxicidad

Con el fallo energético, el potencial energético se pierde y como consecuencia las neuronas y células de la glía se despolarizan. La intensa despolarización de la membrana neuronal condiciona el aumento de la liberación de cantidades excesivas de glutamato y de otros aminoácidos excitadores⁵⁶⁻⁵⁸. El glutamato estimula receptores de membrana ionotrópicos, fundamentalmente el ácido alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico (AMPA) y el NMDA, y receptores metabotrópicos. La estimulación del receptor AMPA consigue una mayor despolarización de la membrana al aumentar la concentración de Na^+ intracelular, incrementando la liberación de más glutamato, ocasionando edema celular y abriendo nuevos canales no específicos voltaje-dependientes permeables al Ca^{2+} . Además la activación del receptor AMPA contribuye a sensibilizar a más receptores NMDA, ya que facilita la extrusión de más moléculas de Mg^{2+} . La estimulación de los receptores NMDA es responsable del notable aumento de Ca^{2+} intracelular ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) y de la puesta en marcha de la cascada isquémica Ca^{2+} -dependiente, que originará la muerte celular. La activación de los receptores metabotrópicos producirá un mayor incremento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ por la liberación de depósitos intracelulares de Ca^{2+} ⁵⁶.

2.3 Extensión de la despolarización (depresión)

El daño celular en la región de penumbra también puede producirse a partir de las olas recurrentes de despolarización originadas en el núcleo del infarto y que se extienden hacia el tejido circundante. La difusión de la depresión consume energía e incrementa el volumen de infarto. La fuente más probable de esta despolarización son los elevados niveles de K^+ extracelular y el incremento de liberación de glutamato entre el núcleo y la penumbra³.

2.4 Aumento del calcio intracelular

El calcio entra en las neuronas a través de canales regulados por receptores NMDA y AMPA, canales regulados por voltaje, canales regulados por los almacenes intracelulares de calcio y por el canal intercambiador revertido de $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$. Además la liberación de calcio por parte de organelas (retículo endoplasmático, mitocondria), de vesículas sinápticas y de proteínas de unión a calcio, pueden incrementar aún más los niveles de calcio intracelular. El calcio juega un papel único en la fisiopatología del ictus ya que causa daño a través de la activación de varias enzimas dependientes de este ion: la proteína quinasa C, las fosfolipasas A2 y C, la ciclooxigenasa, la óxido nítrico sintasa (NOS) dependiente de calcio, la calpaína y varias proteasas y endonucleasas. Como resultado de la formación de productos citotóxicos (radicales libres y leucotrienos) raíz del exceso de calcio intracelular, se produce daño mitocondrial irreversible, inflamación y muerte por necrosis y apoptosis^{56,59}.

2.5 Generación de radicales libres

Como consecuencia de la isquemia cerebral y particularmente durante la reperfusión, se producen radicales de oxígeno que provienen de conversiones enzimáticas (la conversión del ácido araquidónico a prostanoides por la ciclooxigenasa, la degradación de hipoxantina). La formación de poros permeables en la mitocondria ocurre en condiciones isquémicas y lleva a la liberación de radicales libres de oxígeno y de moléculas apoptóticas. También se generan radicales libres durante la respuesta inflamatoria post-isquémica. Estas especies de oxígeno reactivas reaccionan irreversiblemente con los diferentes constituyentes celulares (las proteínas, los dobles enlaces de fosfolípidos y el ADN) causando peroxidación lipídica, daño en la membrana celular, desregulación de procesos celulares y mutaciones en el genoma. A la vez, este daño celular provoca aberraciones en la homeostasis iónica, en la señalización celular y en

la expresión génica. Los radicales de oxígeno son importantes moléculas de señalización que desencadenan inflamación y apoptosis ^{3,60}.

2.6 Disrupción de la barrera hematoencefálica

El daño mecánico o hipóxico del endotelio vascular, el daño tóxico de moléculas inflamatorias y radicales libres y especialmente la destrucción de la lámina basal por parte de las metaloproteinasas de matriz, son potenciales causas de la disrupción de la barrera hematoencefálica (BHE) en el ictus ⁶¹. Esta rotura lleva al edema vasogénico, al flujo de sustancias tóxicas, a la inflamación y a las complicaciones hemorrágicas que se dan después del ictus. Una de estas complicaciones es la conversión o transformación hemorrágica (HT) que se trata de un infarto asociado con una hemorragia secundaria en áreas infartadas isquémicas. La conversión hemorrágica puede dar lugar a un infarto hemorrágico, o menos común, a un infarto parenquimatoso (PH). La alteración temprana de la BHE que tiene lugar en el infarto cerebral, junto con el efecto inflamatorio secundario a la llegada de componentes plasmáticos al tejido cerebral, sería el principal mecanismo fisiopatológico del desarrollo de la transformación hemorrágica ⁶². Por otro lado, el edema cerebral agrava el proceso isquémico por su efecto volumétrico causando una compresión local de la microcirculación, provocando un aumento de la presión intracraneal, y una dislocación de partes del cerebro. El grado de inflamación cerebral es proporcional al tamaño del infarto y pueden provocar una hernia transtentorial fatal ⁶³.

2.7 Inflamación

La lesión isquémica desencadena una cascada inflamatoria en el parénquima cerebral que además puede amplificar el daño tisular a través de muchos mecanismos. Minutos después de la oclusión, hay un aumento de la expresión de genes proinflamatorios que produce moléculas moduladoras de la inflamación (factor activador plaquetario, el factor necrótico tumoral alfa y la interleuquina 1 beta) ⁶⁴. Después de la expresión de moléculas de adhesión en el endotelio vascular se produce la transmigración de la sangre al parénquima cerebral por parte de neutrófilos primero, y seguido de los macrófagos y los monocitos. Por un lado, la obstrucción microvascular por parte de los neutrófilos puede empeorar el grado de isquemia, y por otro lado, la producción de mediadores tóxicos por células inflamatorias activadas y neuronas dañadas puede ampliar aún más el daño tisular. Las primeras células inflamatorias que llegan al tejido isquémico después de la reperusión son los neutrófilos (a las pocas horas), seguido de los macrófagos y monocitos, que llegan a los pocos días. Además el proceso inflamatorio también puede ir asociado a apoptosis. El papel patogénico de los neutrófilos y otros leucocitos en la isquemia cerebral aún es sujeto de debate. La microglía y los macrófagos pueden ser beneficiosos a través de su rol como remodeladores del tejido ^{64,65}.

2.8 Contribución de la glía

Estudios en isquemia cerebral focal en modelos animales sugieren que la activación de la microglía residente precede a la infiltración de macrófagos y que la amplia mayoría de macrófagos en el área infartada deriva de la microglía local. A pesar de que los astrocitos protegen a las neuronas mediante múltiples mecanismos, como la regulación de la homeostasis iónica, el control de los niveles extracelulares de glutamato e incrementando la capacidad glicolítica durante la isquemia, bajo ciertas condiciones, los astrocitos activados

contribuyen a la muerte celular isquémica. Por este motivo las terapias que supriman la activación microglial pero incrementen la respuesta astrocítica, pueden contribuir a una mejor respuesta post-isquémica⁶⁶⁻⁶⁸.

2.9 Cambios en neurotransmisores y sustancias neuroactivas

Estudios de evaluación de los cambios neuroquímicos después de la isquemia cerebral en modelos animales han mostrado que los niveles de sustancias neuroactivas varían de modo espacial y temporal durante la isquemia. Por un lado los niveles de aspartato, glutamato, inosina, hipoxantina, adenosina y gamma-aminobutirato se incrementan durante el periodo agudo de la isquemia. En cambio, la glicina parece aumentar con la isquemia prolongada/crónica y algunas sustancias neuroactivas incrementan en las regiones peri-infartadas (tirosina hidroxilasa, neuropéptido Y) o en la zona no infartada (neuropéptido Y, leuencefalina, neurotensin y dinorfina)⁶⁹.

2.10 Apoptosis

La excitotoxicidad, la formación de radicales libres, la inflamación, el daño mitocondrial, del ADN y la liberación de citocromo C de la mitocondria inducen el proceso de apoptosis después de una lesión isquémica. Este evento se produce principalmente en la penumbra isquémica. La apoptosis es un proceso que consume energía, por eso la reperfusión podría potenciar la apoptosis restableciendo la energía celular. Después de la isquemia, se activan las caspasas en respuesta a señales pro-apoptóticas como la disminución de la familia de proteínas *B-cell lymphoma 2* (Bcl-2) y el aumento de Bax/Bid (Bcl-2-associated X protein/BH3-interacting domain death agonist) y la familia de receptores *Death*. Las caspasas 1, 3, 8 y 9 están

involucradas en la isquemia cerebral. La activación de la caspasa 3 es el último evento de la cascada apoptótica en la isquemia cerebral. Las caspasas activas son enzimas que pueden fragmentar más de 30 proteínas diana diferentes (laminina, actina, gelsolina) esenciales para la integridad nuclear y celular. La morfología de células apoptóticas difiere de la de las células necróticas. Estas últimas presentan edema y pierden su arquitectura celular debido a la rotura del citoesqueleto. Las células apoptóticas se caracterizan por tener un citoplasma encogido, una marcada condensación de la cromatina y una fragmentación celular debido a la separación de protuberancias para formar múltiples cuerpos pequeños unidos a la membrana que contienen organelas intactas. Las células apoptóticas son rápidamente eliminadas por fagocitosis sin promover una reacción inflamatoria⁷⁰⁻⁷³.

2.11 Expresión génica

La tecnología de los microarrays de ADN ha permitido mapear el curso temporal de la expresión génica diferencial de miles de genes en el cerebro, activados por la lesión isquémica. La isquemia cerebral induce cambios complejos en el perfil genómico que abarcan tanto la expresión de nuevos genes, como el incremento y disminución de los que ya se expresan, ocurriendo en distintos patrones temporales. La detección de genes que cambian su expresión después de la isquemia y el estudio de la proteómica y la peptidómica, es el primer paso y primordial para la comprensión de los diferentes eventos moleculares.

Uno de los primeros grupos de genes que sufren cambios en su expresión tras la isquemia cerebral son los genes de expresión temprana (GET). Estos genes son activados transitoriamente y de forma rápida en respuesta a una gran variedad de estímulos celulares. Representan un mecanismo de respuesta que es activado a nivel de transcripción en respuesta al estímulo y que ocurre antes de que se sinteticen nuevas proteínas⁷⁴. Además, la mayor

parte de los GET codifican para factores de transcripción con una función reguladora⁷⁵. Tras la isquemia cerebral existe un claro incremento de estos genes, entre los cuales encontramos C-FOS (oncogen fos, homólogo al oncogen del virus osteosarcoma murino Finkel-Biskis-Jinkins), FOS-B (oncogen fos B), FOSL1 (fos-like antigen 1), C-JUN (oncogen jun, homólogo al oncogen 17 del virus de sarcoma aviar v-jun), JUN-B (oncogen jun-B), JUN-D (oncogen jun-D), EGR-1, 2, 3, 4 (gen de respuesta al crecimiento temprana 1, 2, 3, 4), NR4A1 y NR4A2 (receptor nuclear subfamilia 4, grupo A miembros 1 y 2; también denominados nur77 y nurr1)^{76,77}. Varios trabajos sugieren que la activación sostenida de estos factores de transcripción provoca la muerte celular. Por otro lado, también existe un evidente incremento en genes relacionados con el estrés oxidativo, como pueden ser la superóxido dismutasa, la glutatión-transferasa o las metalotioneínas. De la misma manera, numerosos genes relacionados con la inflamación como interleuquinas, quimioquinas o antígenos de cúmulo de diferenciación (CD, del inglés *cluster of differentiation*), están claramente incrementados en la isquemia cerebral. Del mismo modo, una de las primeras respuestas endógenas tras la isquemia es el incremento de la expresión de proteínas de choque térmico (HSP, *heat shock proteins*)⁷⁸. Posteriormente, se produce una respuesta a la acumulación de proteínas mal plegadas mediada por el estrés del retículo endoplasmático que provoca un aumento de grp78 y grp94. Estos aumentos de la expresión de HSP se ven claramente reflejados en diferentes estudios con microarrays⁷⁹⁻⁸³.

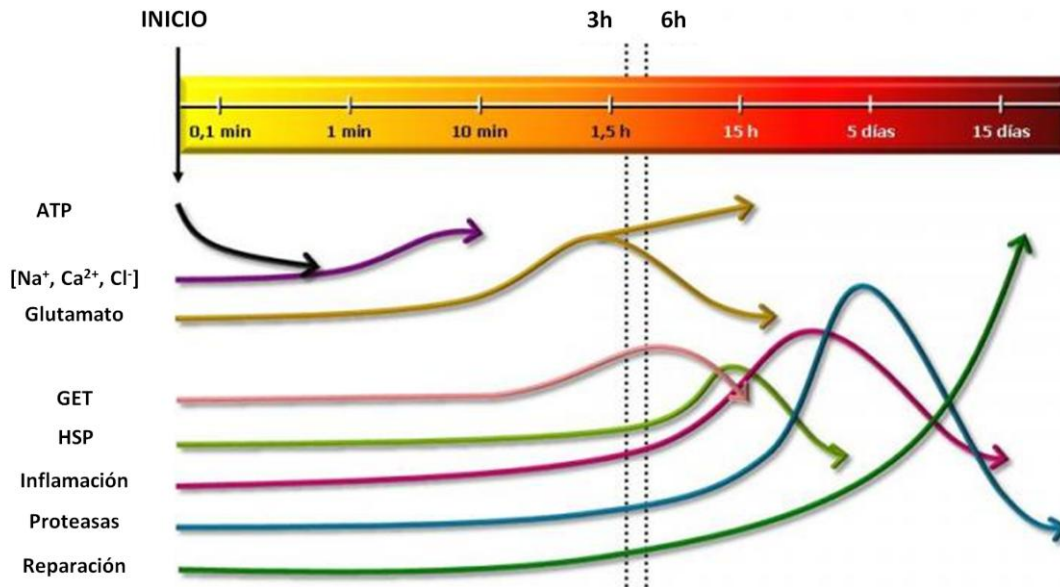


Figura 5. Curso temporal de la expresión génica tras la isquemia cerebral. ATP: adenosina trifostato; GET: genes de expresión temprana; HSP: proteínas de choque térmico. Adaptada de <http://www.neurowikia.es/content/bases-moleculares-de-la-isquemia-cerebral>.

3 La cerebroreparación en el ictus

Tal y como hemos comentado previamente (apartado 2 de esta sección), en la fase crónica del ictus se producen una serie de mecanismos de daño secundarios (edema, inflamación, muerte celular tardía, etc.) que contribuyen a la progresión del daño tisular. No obstante, en la fase crónica también actúan los mecanismos de reparación endógenos (activados a las pocas horas después del ictus), que tienen el objetivo de restablecer y “limpiar” los daños sufridos. Estos mecanismos son activados por el mismo tejido isquémico con el propósito de intentar recuperar las funciones cerebrales perdidas mediante procesos de plasticidad. La plasticidad cerebral, incluye todos los mecanismos celulares y moleculares que conducen a una reorganización funcional (ya sea la neurogénesis, la sinaptogénesis la gliogénesis o la angiogénesis) con el objetivo de restablecer las funciones cerebrales fisiológicas⁴⁹.

3.1 La neurogénesis, la gliogénesis y la sinaptogénesis

El proceso de neurogénesis consiste en la formación de nuevas neuronas a partir de células madre ya existentes en el tejido. En 1998, mediante técnicas inmunohistoquímicas que detectan la incorporación de 5-bromodeoxyuridina (5-BrdU) en las células de nueva formación (células recién divididas), se encontró que tras una isquemia global se producía un aumento de células en la zona subgranular del giro dentado (DG) de roedores⁸⁴. A partir de entonces, los estudios sobre neurogénesis tras isquemia cerebral han ido en aumento y ha quedado suficientemente demostrado que hay un incremento en la neurogénesis endógena después del daño isquémico⁸⁵. La neurogénesis ocurre en dos regiones del cerebro: la zona subgranular (SGZ) del DG del hipocampo y la zona subventricular (SVZ) de los ventrículos laterales⁸⁶ donde se forman nuevas células que alcanzan el bulbo olfatorio por la corriente migratoria rostral. Se ha observado que después de la isquemia cerebral hay un aumento de la neurogénesis en ambas zonas, tanto en la SGZ del DG como en la SVZ⁸⁷. El proceso de la neurogénesis consiste principalmente en tres etapas: (1) la proliferación de precursores (participan factores de crecimiento, neurotransmisores, hormonas, factores de células madre, eritropoyetina, inhibidores de caspasas, fármacos antiinflamatorios y la enzima convertora de TNF- α (TACE)); (2) la migración (regulada por factores quimiotróficos como las integrinas, las efrinas y las reelinas); y la diferenciación, integración y supervivencia de las células formadas (modulada por los astrocitos)⁸⁸.

La gliogénesis, es la formación de células gliales específicas de soporte (neuroglía) a partir de células madre existentes en el tejido. La neuroglía es esencial para el abastecimiento metabólico de las neuronas y esencial para su buen funcionamiento. El proceso de la gliogénesis es el mismo que el de la neurogénesis, debido a que las células precursoras neuronales multipotenciales (que constituyen las primeras células precursoras propiamente neurales e incluyen precursores bipotenciales neuro-gliales, neuroblastos y glioblastos) son

capaces de diferenciarse dando lugar tanto a neuronas como a células gliales. Se han descrito diferentes factores externos, principalmente morfogenes, que regulan la función de los precursores multipotenciales después del daño isquémico, promoviendo la formación de células gliales. Algunos de ellos son: la Beta-catenina de la vía de señalización Wnt (del inglés *wingless-type MMTV intergrations site family*), la cual favorece la gliogenesis en ratón ⁸⁹; la vía de señalización de las proteínas morfogénicas de hueso (BMP, del inglés *bone morphogenic proteins*), la cual inhibe la diferenciación neuronal ⁹⁰; y el factor inhibidor de la leucemia (LIF, del inglés *leukemia inhibitory factor*), el cual promueve un fenotipo de célula progenitora astrogial ⁹¹.

Por otro lado, la sinaptogénesis es el proceso de establecimiento de nuevas sinapsis mediante el desarrollo de nuevas terminaciones axonales y dendríticas regulado por una gran variedad de moléculas como los receptores de glutamato (AMPA y NMDA), las proteínas de densidad postsináptica (PSD), las guanosina trifosfatasa (GTPasas) pequeñas, las efrinas, moléculas de adhesión (α N-catenina) y los esteroides sexuales ⁹². La proteína asociada al crecimiento de 43 kDa (GAP-43), proteína de membrana expresada en los conos de crecimiento axonal, y la sinaptofisina (proteína vesicular presináptica expresada en todas las terminaciones nerviosas) son marcadores moleculares del proceso de la sinaptogénesis ⁹³, los cuales han sido utilizados por numerosos laboratorios para cuantificar los cambios neuroanatómicos después del daño cerebral ⁹⁴⁻¹⁰⁰. Se ha observado que el factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF) regula la sinaptogénesis (modulando el crecimiento de los conos axonales, las dendritas y la plasticidad sináptica) después de la isquemia cerebral, mediante la activación de diferentes vías de señalización: BDNF/PI3K/Akt (*brain-derived neurotrophic factor/phosphatidylinositol 3'-kinase/v-Akt murine thymoma viral oncogene homolog*), BDNF/Ras/Raf/MAPK (*brain-derived neurotrophic factor/v-ras harvey rat sarcoma viral oncogene homolog/v-raf-1 murine leukemia viral oncogene homolog/mitogen-activated*

protein kinase), BDNF/PLC/PKC (*brain-derived neurotrophic factor/protein lipase c/protein kinase c*)¹⁰¹.

3.2 La angiogénesis

3.2.1 Mecanismos moleculares de la angiogénesis

La angiogénesis es el proceso fisiológico que implica el crecimiento de nuevos vasos sanguíneos a partir de vasos preexistentes. Es un mecanismo esencial en muchos de los procesos fisiológicos y fisiopatológicos, tales como la retinopatía diabética, la psoriasis, el crecimiento del tumor y la metástasis, y el ictus¹⁰². Folkman *et al.*, fueron pioneros en destacar la importancia de comprender el mecanismo del proceso angiogénico a nivel bioquímico y molecular dados los posibles beneficios diagnósticos y terapéuticos en una amplia gama de enfermedades¹⁰³. El proceso angiogénico se caracteriza por la combinación de dos procesos: la formación de nuevos vasos desde los lados y extremos de los pre-existentes (*sprouting* ó angiogénesis por brote), y por la división longitudinal de los vasos existentes a partir de células peri-endoteliales (*intussusception* o angiogénesis por partición) (Figura 6). Cualquiera de estos mecanismos, permiten que el vaso inicial se separe y ramifique en arteriolas precapilares y capilares.

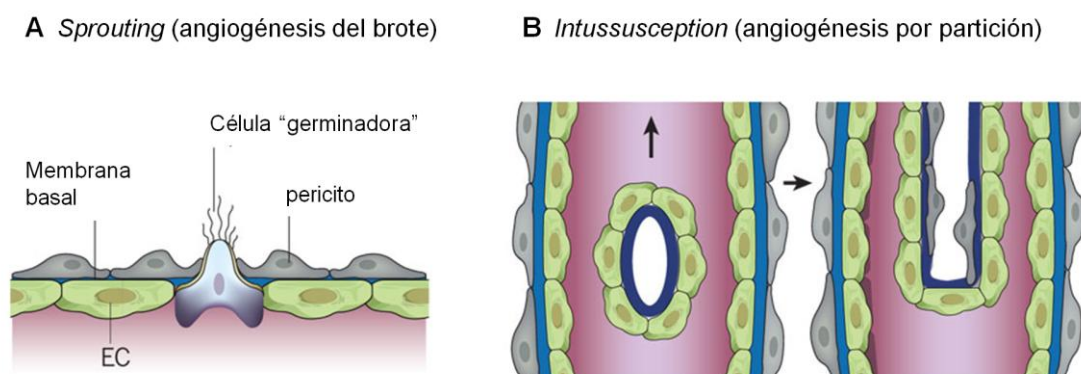


Figura 6. Mecanismos principales de angiogénesis: por *sprouting* o angiogénesis del brote (A) e *intussusception* o angiogénesis por partición (B). CE: célula endotelial. Imagen adaptada de Carmeliet and Jain 2011⁵.

Para que el proceso de la angiogénesis se desarrolle correctamente, en condiciones fisiológicas o patológicas, es esencial que el conjunto de factores pro-angiogénicos y anti-angiogénicos que interactúan con múltiples células y tejidos sea estrecha y finamente regulado. A pesar de que las células endoteliales son el principal tipo celular de los vasos sanguíneos, por si solas no pueden completar el proceso angiogénico, necesitan de las células peri-endoteliales y de los componentes de la matriz extracelular, los cuales proporcionan el apoyo molecular y funcional. Concretamente, la angiogénesis implica una variedad de eventos coordinados, que incluyen: (1) la degradación de la matriz extracelular que rodea el vaso principal, la migración y la proliferación de las células endoteliales y murales (células musculares lisas vasculares y pericitos) para formar el nuevo vaso (angiogénesis por brote o *sprouting*), (2) la formación del lumen (luz del vaso), y (3) la construcción de la capa de células murales de la pared del vaso a partir de la asociación de pericitos y/o células musculares lisas¹⁰⁴. En la Tabla 7 se muestran los procesos que ocurren en cada paso juntamente con las moléculas que participan en cada uno.

Tabla 7. Eventos y moléculas que participan en las diferentes fases del proceso de angiogénesis.

FASE	EVENTO		MOLÉCULAS QUE PARTICIPAN
1	Dilatación de los vasos existentes, aumento de la permeabilidad vascular y degradación de la matriz extracelular.		NO, VEGF, PECAM-1, VE-cadherina, Ang1 y MMPs.
2	Proliferación y migración de las células endoteliales.		VEGF, angiopoyetinas, FGFs, integrinas, PECAM, efrinas/Eph, VE-cadherinas y miembros de la familia de las connexinas
3	Ensamblaje y agrupación de células endoteliales, formación de estructuras en cuerda y adquisición de lúmenes.		VEGF, angiopoyetinas, integrinas.
4	Supervivencia del endotelio vascular a largo plazo: una vez los vasos se han ensamblado, las células endoteliales adquieren resistencia a los factores externos (quiescentes).		p53, p21, p16, p27, Bax y p42/44 MAPK.
5	Diferenciación del endotelio vascular para satisfacer las necesidades locales.	BHE	Interacción entre GFAP, pericitos y angiotensina.
		Complejos de uniones estrechas	Caderinas, ocludinas y proteínas homólogas a la quinasa guanilato

NO: óxido nítrico; VEGF: factor de crecimiento del endotelio vascular (del inglés *vascular endothelial growth factor*); PECAM-1: molécula de adhesión celular endotelial plaquetaria (del inglés *platelet endothelial cell adhesion molecule*, también conocida como CD31); VE-cadherina: caderina del endotelio vascular; Ang1: angiopoyetina 1; MMPs: metaloproteinasas de matriz; FGFs: factor de crecimiento fibroblástico (del inglés *fibroblast growth factor*); efrinas/Eph: los ligandos efrinas y sus receptores Eph; p53: proteína tumoral 53; p21, p16 y p27: inhibidores de la quinasa dependiente de ciclina 1A, 2A y 1B; Bax: proteína X asociada a Bcl2 (del inglés *Bcl2-associated X protein*); p42/44 MAPK: proteínas quinasas activadas por mitógeno p44 y p42 (del inglés *mitogen activated protein kinases*); GFAP: proteína ácida fibrilar glial (del inglés *glial fibrillary acidic protein*); BHE: barrera hematoencefálica. Tabla adaptada de Camós and Mallolas¹⁰⁵.

3.2.2 La angiogénesis en el contexto del ictus

La remodelación vascular es un componente clave de la recuperación después del accidente cerebrovascular¹⁰⁶. Estudios de autopsias cerebrales han puesto de manifiesto que la angiogénesis es parcialmente inducida en la isquemia cerebral a través de la vía del factor inducible por hipoxia (HIF)¹⁰⁷. Varios trabajos han demostrado que los mecanismos angiogénicos endógenos activados después de la isquemia cerebral tienen un papel beneficioso. En 1993, Krupinski *et al.*, observaron que el número de vasos nuevos en regiones

de penumbra isquémica se correlacionaba con una mayor supervivencia en los pacientes con ictus isquémico, lo que sugirió que la activación de la angiogénesis en el cerebro isquémico podría ser beneficioso ¹⁰⁸. Por otro lado, Manoonkittinwongsa *et al.*, observaron que la densidad de microvasos sólo aumentaba en el margen isquémico adyacentes a las áreas de pan-necrosis en un modelo de isquemia cerebral de rata, y que siempre se asociaba con un aumento del número de macrófagos. Las áreas cerebrales isquémicas sin macrófagos no mostraron cambios vasculares en comparación con los animales control, lo que sugiere que los microvasos inducidos por la isquemia se forman para facilitar la infiltración de macrófagos y la eliminación del cerebro necrótico ¹⁰⁹. Estos estudios y otros trabajos recientes realizados por diferentes laboratorios ¹¹⁰⁻¹¹⁵ sugieren que las estrategias que promueven la angiogénesis después de la isquemia cerebral focal pueden ofrecer oportunidades únicas para mejorar los resultados clínicos en la recuperación del paciente de ictus.

Para explorar los beneficios terapéuticos de la angiogénesis en el ictus es esencial comprender los mecanismos moleculares que lo regulan ⁸⁸, ya que algunos factores de crecimiento que favorecen la angiogénesis (pro-angiogénicos) pueden aumentar la permeabilidad vascular después del ictus favoreciendo la transformación hemorrágica ¹¹⁶⁻¹¹⁸. En el contexto de la cerebropreparación en el ictus, se considera una terapia óptima, aquella que fomente la angiogénesis cerebral sin promover el edema cerebral ¹¹⁹. Existen múltiples elementos que están involucrados en el proceso de la angiogénesis en el cerebro isquémico, incluyendo factores de crecimiento, moléculas de adhesión y células progenitoras, entre otras. Una mejor comprensión de la interacción molecular entre todas estas moléculas puede conducir a nuevas vías terapéuticas para el ictus isquémico ¹⁰⁶.

4 Mecanismos de regulación de la expresión génica en el ictus

Con el fin de comprender la base neurobiológica responsable de la lesión cerebral prematura y el potencial para la recuperación cerebral, es necesario comprender y conocer las proteínas y genes reguladores clave de estos procesos.

4.1 Factores de transcripción

Todos los procesos celulares en las células vivas tales como el crecimiento, el desarrollo, la morfogénesis y la diferenciación celular son un producto de programas de expresión génica que implican la complicada regulación transcripcional de varios genes. Este proceso de regulación de la transcripción está estrechamente controlado y coordinado por proteínas llamadas reguladores transcripcionales o factores de transcripción (FTs). Estos reguladores de la transcripción son proteínas capaces de unirse específicamente a secuencias cortas de ADN (elementos en cis) localizadas en los promotores de genes o a secuencias potenciadoras (*enhancer*) en el ADN, y de interactuar con el complejo de pre-iniciación de la transcripción para inducir o inhibir la actividad de la enzima ARN polimerasa II. De esta manera, los FTs modulan los genes diana promoviendo la activación o represión de su expresión^{120,121}.

Hay tres tipos principales de FTs: los factores generales o de transcripción basal (necesarios para el comienzo de la síntesis de ARN a partir de todos los promotores de clase II (genes codificantes)), los factores de transcripción aguas arriba (factores ubicuos que reconocen secuencias consenso cortas específicas situadas en 5', proximales del punto de inicio de la transcripción, que incrementan la eficiencia del comienzo de la transcripción), y los factores de transcripción inducibles (factores que se sintetizan o activan en momentos específicos en tejidos determinados y que se unen a secuencias específicas denominadas elementos de respuesta)¹²². La estructura básica de los FTs consiste principalmente en un

dominio de unión a ADN y un dominio activador. Respecto a los dominios de unión a ADN, existen diferentes tipos de motivos en los factores de transcripción incluyendo: dedo de zinc (del inglés *zinc-finger*), la hélice-bucle-hélice (del inglés *helix-loop-helix*), la hélice-giro-hélice (del inglés *helix-turn-helix*), la cremallera de leucina (del inglés *leucine zipper*) y los grupos de alta movilidad (del inglés *high mobility group*). Los factores de transcripción se clasifican en diferentes familias basadas en los motivos previamente comentados. Por otro lado, el dominio activador de estos factores de transcripción interactúa con los componentes de la maquinaria de transcripción, tales como las polimerasas de ARN y los reguladores de la transcripción asociados^{120,122}.

La regulación de los FTs es un mecanismo complejo que asegura la expresión espacio-temporal específica de los genes. En respuesta a un estímulo específico celular, estos factores reguladores se activan de manera secuencial y reclutan co-reguladores de la transcripción (como las histonas que funcionan como co-activadores o co-represores) y ayudan en la modificación de la estructura de la cromatina. La activación alterada de estos reguladores a menudo se asocia con diversas patologías tales como trastornos crónicos y enfermedades malignas. Los estudios recientes en la investigación de diferentes patologías se centran en el desarrollo de mejores estrategias terapéuticas basadas en la identificación y bloqueo de los diferentes patrones de unión de los factores de transcripción que regulan la patología¹²⁰.

Existen diferentes familias de factores de transcripción que controlan vías de señalización celulares críticas implicadas en la proliferación celular, la supervivencia, el desarrollo y la diferenciación de linaje celular. Éstas incluyen la familia Rel/NF- κ B (del inglés *v-rel avian reticuloendotheliosis viral oncogene homolog/nuclear factor kappa-b*), la familia AP-1 (del inglés *adaptor-related protein complex*), la familia de factores de transcripción STAT (del inglés *signal transducer and activator of transcription*), las proteínas homeodomain, las proteínas de ADN de flexión, la familia de factores de transcripción POU (del inglés *Pit-Oct-*

Unc), la familia de receptores hormonales nucleares, la familia p53 (del inglés *tumoral protein p53*) y la familia E2F (del inglés *E2F transcription factor*)¹²⁰.

4.1.1 Factores de transcripción en el ictus

En los últimos años, diferentes laboratorios han demostrado que existen diferentes patrones de expresión génica en los tejidos de modelos de isquemia cerebral (MCAO) de rata y primates no humanos^{79,123-125}. Además, el análisis de microarrays en estudios anteriores ha puesto en evidencia que muchos tipos de genes son activados después de la isquemia cerebral, sin embargo unos de los genes asociados a las primeras fases después del accidente cerebrovascular son los relacionados con la inflamación y la muerte celular¹²⁶. Por otra parte, la isquemia cerebral por sí misma es un estímulo que promueve la activación de genes implicados en procesos de plasticidad cerebral, es decir, que tienen como objetivo remodelar las conexiones cerebrales e inducir cambios estructurales y funcionales en todas las estructuras afectadas^{112,127,128}. A su vez, todos estos genes son regulados por FTs que se unen a los elementos reguladores de sus promotores para inducir o reprimir su expresión¹²⁶. Algunos ejemplos de estos FTs son NF-κB (*nuclear factor kappa-B*), Hes (*hairy/enhancer of split, drosophila, homolog*), HIF-1 (*Hipoxia-inducible factor 1*), STAT3 (*signal transducer and activator of transcription 3*), AP-1 (*adaptor-related protein complex*), CREB (*cAMP response element-binding protein 1*), Sox2 (*sry-box 2*), Pax6 (*paired box gene 6*), Tcf/Lef (*transcription factor 7/lymphoid enhancer-binding factor*), Gli (*glioma-associated oncogene homolog*), Olig2 (*oligodendrocyte lineage transcription factor 2*), Dlx2 (*distal-less homebox 2*), TLX (*tailless, drosophila, homolog*), Bmi-1 (*leukemia viral bmi-1 oncogene, mouse, homolog*), los cuales se han asociado a la activación de la neurogénesis después de la isquemia cerebral¹²⁹. Sin embargo, muchos FTs no ejercen una sola función, sino que están implicados en varias vías de señalización, como en el caso de HIF-1, el cual también participa en procesos de supervivencia

celular ¹³⁰, o bien como CREB que también desempeña un papel crítico en la plasticidad sináptica y la supervivencia neuronal después de la isquemia ¹³¹.

A lo largo de los últimos años, muchos autores han destacado la importancia del estudio de los FTs debido al papel que desempeñan en la prevención del daño en la isquemia cerebral ¹³²⁻¹³⁴. Estas moléculas no siempre actúan como reguladores únicos y directos de la expresión génica, sino que la mayoría dimerizan o forman estructuras multiméricas a través de las cuales modulan la transcripción del ARN ¹³⁵. A pesar de que existan grupos de FTs involucrados en los mismos procesos (plasticidad cerebral, inflamación, muerte celular, citotoxicidad, etc), no siempre comparten un perfil de expresión temporal común después de la isquemia cerebral. El análisis de los reguladores transcripcionales puede ser útil para comprender cómo un conjunto de genes puede ser regulado por un pequeño grupo de moléculas señalizadoras (situadas a 5' o *upstream*). Por otro lado, el conocimiento de los genes y FTs que modulan y participan en la compensación de las lesiones cerebrales isquémicas, es decir en mecanismos de plasticidad puede proporcionar nuevos sustratos para la reparación cerebral y es esencial para el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas óptimas en la isquemia cerebral ¹³⁶.

II HIPÓTESIS

HIPÓTESIS

Las terapias desarrolladas hasta el momento para el tratamiento en fase aguda del ictus se han centrado principalmente en la recanalización y la neuroprotección. Sin embargo ambas estrategias presentan un efecto limitado y parcial en el tratamiento de pacientes con ictus (como la estrecha ventana terapéutica, los efectos secundarios, las incompatibilidades, o la eficiencia limitada o ausente como en el caso de la neuroprotección). Después del ictus se activa un amplio espectro de vías de señalización en respuesta al estímulo isquémico, entre las cuales están los procesos cerebroreparadores endógenos del cerebro (angiogénesis, neurogénesis y gliagénesis). En el presente trabajo nos centramos en el estudio de los mecanismos moleculares que regulan la respuesta a la isquemia cerebral, en concreto en la cerebroreparación endógena como herramienta terapéutica que pueda mejorar las limitaciones y obstáculos que ofrecen los tratamientos actuales para el ictus.

Por otro lado, se sabe que la isquemia cerebral es un gran inductor de la expresión génica. Concretamente, después de un ictus se activan una gran variedad de vías de señalización y moléculas que están fina y estrictamente reguladas por proteínas llamadas factores de transcripción. Actualmente se conoce una gran cantidad de genes que se activan y se expresan tras la isquemia cerebral, sin embargo, se sabe poco sobre los mecanismos que los regulan.

Por ese motivo, en la presente tesis postulamos que la identificación de los factores de transcripción que modulan la respuesta cerebral isquémica y los procesos cerebroreparadores desencadenados tras el ictus, nos permitirán revelar y establecer mecanismos moleculares involucrados en la plasticidad cerebral endógena, a la vez que identificar nuevas dianas para el diseño de nuevas estrategias terapéuticas que promuevan este proceso.

III OBJETIVOS

III. OBJETIVOS

Se han definido dos objetivos principales para esta tesis:

- 1) Identificar factores de transcripción involucrados en los mecanismos de plasticidad cerebral y en la respuesta cerebral isquémica.

Para este fin se han propuesto una serie de objetivos concretos:

- ❖ Seleccionar factores de transcripción implicados en procesos de plasticidad cerebral y en la respuesta isquémica mediante un análisis bioinformático y mediante el cribaje de la actividad de unión de FTs.
- ❖ Caracterizar los FT seleccionados en condiciones de isquemia cerebral, mediante:
 - El análisis del perfil de expresión espacio-temporal y la localización celular de los factores de transcripción seleccionados, en cerebro de rata sometida a isquemia.
 - La identificación del perfil de interacciones con otros factores de transcripción, para conocer las vías de señalización en que están implicados.
- ❖ Validar los factores de transcripción como reguladores de procesos cerebroreparadores y estudiar su función cerebral.

Durante el diseño de esta tesis, hemos observado que no existe un modelo experimental *in vitro* estándar para el estudio de procesos de cerebroreparación como la angiogénesis, en el contexto del ictus. En este marco, otro objetivo de la tesis es:

- 2) Establecer un modelo experimental *in vitro* de la isquemia cerebral, con células endoteliales de microvasculatura cerebral de rata, para el estudio de procesos cerebroreparadores (angiogénesis) en el ictus.

IV METODOLOGÍA

IV. METODOLOGÍA

En el apartado de metodología de esta tesis se detalla la parte experimental de la misma con los modelos de isquemia cerebral utilizados, las técnicas y los equipamientos necesarios para la obtención, procesamiento y análisis de las muestras objeto de estudio.

Asimismo, con el objetivo de simplificar la lectura del presente apartado, los medios de crecimiento y tampones utilizados durante la tesis, así como su composición, se han ordenado y recopilado en los Anexos I-VI (sección X).

1 Modelos experimentales de isquemia cerebral

En esta tesis se han utilizado 2 modelos de isquemia cerebral *in vivo* y un modelo *in vitro*. Dado que nuestro centro carece de estabulario, los modelos de isquemia cerebral *in vivo* se llevaron a cabo en las instalaciones del Departamento de Farmacología, Unidad de Investigación Cerebrovascular, de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid. Todos los procedimientos fueron aprobados por el Comité de Cuidado Animal de la Universidad Complutense de Madrid de acuerdo con las regulaciones de la Unión Europea (86/609/CEE) y la legislación Española (RD223/88)

1.1 Modelos experimentales de isquemia cerebral *in vivo*

Los experimentos se realizaron con ratas Fischer macho adultas de peso comprendido entre 250 y 300 g (Harlan Laboratories Inc., IN). Los animales se estabularon individualmente en condiciones controladas de temperatura y humedad y se las sometió a un ciclo de 12 h de luz/oscuridad (luces encendidas a las 08:00) con acceso libre a la comida y al agua. Las ratas fueron anestesiadas con una mezcla de 70% nitrógeno/30% oxígeno y una inducción inicial de isofluorano al 5% que disminuía al 1.5-2% durante la cirugía. Durante el procedimiento

quirúrgico y la recuperación de la anestesia la temperatura corporal se mantuvo controlada mediante una sonda rectal y un sistema de control de temperatura (Panlab/Harvard Apparatus, Temperature control unit HB101/2; Barcelona, España), manteniéndose a $36\pm 0,5$ °C. En esta tesis se han utilizado 2 modelos de isquemia cerebral focal: la oclusión transitoria de la arteria cerebral media (del inglés *transient middle cerebral artery occlusion*, tMCAO) y la oclusión permanente de la arteria cerebral media (del inglés *permanent middle cerebral artery occlusion*, pMCAO).

1.1.1 Transient middle cerebral artery occlusion (tMCAO)

El modelo de isquemia cerebral transitoria se realizó según el modelo previamente descrito en la literatura¹³⁷⁻¹³⁹. Tras anestesiar a los animales, se llevó a cabo la cirugía: se realizó una pequeña craniectomía a la altura del tronco de la arteria cerebral media (ACM) izquierda, sobre la fisura rinal y se ligó temporalmente el tronco de la arteria cerebral justo antes de su bifurcación entre las ramas frontal y parietal con una sutura 9/0. Se confirmó la interrupción completa del flujo sanguíneo bajo el microscopio quirúrgico. Posteriormente se ocluyeron ambas arterias carótidas comunes (ACC) en el cuello. Después de 90 minutos de oclusión, se desataron las ligaduras de los tres vasos permitiendo la restauración del flujo sanguíneo (reperfusión) que se observó a través del microscopio quirúrgico. Cuando los animales empezaron a recuperarse de la anestesia fueron devueltos a sus jaulas con comida y agua *ad libitum* (hasta el momento de sacrificarlas). Las ratas sometidas a tMCAO se sacrificaron a las 6, 24 y 72 horas y a los 7 y 14 días tras la perfusión (n = 3 en cada grupo). Se extrajeron los cerebros de los grupos control y tMCAO (a los tiempos descritos) y de cada uno de ellos se obtuvieron el núcleo ipsilateral, el peri-infarto ipsilateral y el tejido no dañado ipsilateral a la MCAO, así como el tejido contralateral a la MCAO de la corteza (como se muestra en la Figura 7). El núcleo isquémico o *core* se definió como el tejido cortical circundante a la ACM ocluida, que difiere en consistencia del tejido adyacente. El tejido peri-infartado corresponde a un área cortical inmediatamente adyacente al *core* isquémico. Para identificar el tejido peri-infartado

nos basamos, además, en un estudio longitudinal de neuroimagen, en el que se define esta área como la región sobre el mapa de CDA (coeficiente de difusión aparente) que progresa a infarto con la oclusión permanente de los vasos pero no con la reperusión ¹⁴⁰. El CDA corresponde a la medida de la difusión o movimiento microscópico de los protones del agua y permite evaluar edema y densidad celular en un tejido. Por otro lado, el tejido no dañado ipsilesional, se identificó como la región cortical no infartada en el hemisferio ipsilateral. Y finalmente, el tejido contralesional correspondió a la región cortical no infartada, en el hemisferio contralateral. Las muestras se congelaron inmediatamente a -80 °C hasta el procesamiento de la muestra para la obtención del extracto nuclear.

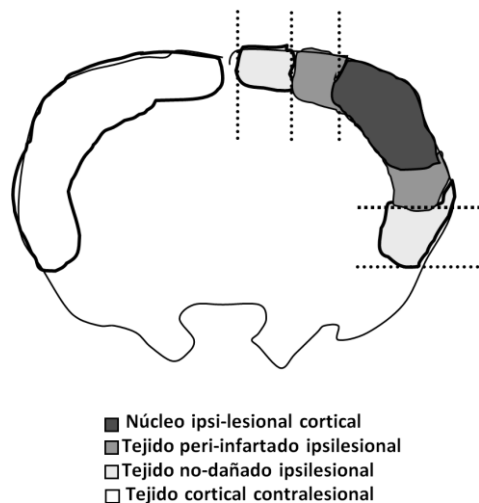


Figura 7. Esquema de la recogida de muestras después de la tMCAO en rata. El cerebro se cortó en secciones coronales correspondiente a la zona de la ACM. El tejido cortical ipsilateral a la MCAO se identificó por su característica consistencia tisular. Para el resto de regiones, se procedió tal y como indica la figura.

1.1.2 pMCAO

Este modelo de isquemia cerebral focal fue descrito por Tamura *et al.*, en el año 1981 ¹⁴¹ y se perfeccionó más tarde ¹⁴² siendo uno de los modelos más utilizados para el estudio de enfermedades cerebrovasculares. Tras anestesiarse a los animales se llevó a cabo la cirugía. En primer lugar, se realizó la oclusión permanente de la ACC izquierda mediante ligadura con doble nudo utilizando hilo de nylon 3/0 (Lorca Marín S.A; Murcia, España). A continuación se colocó el

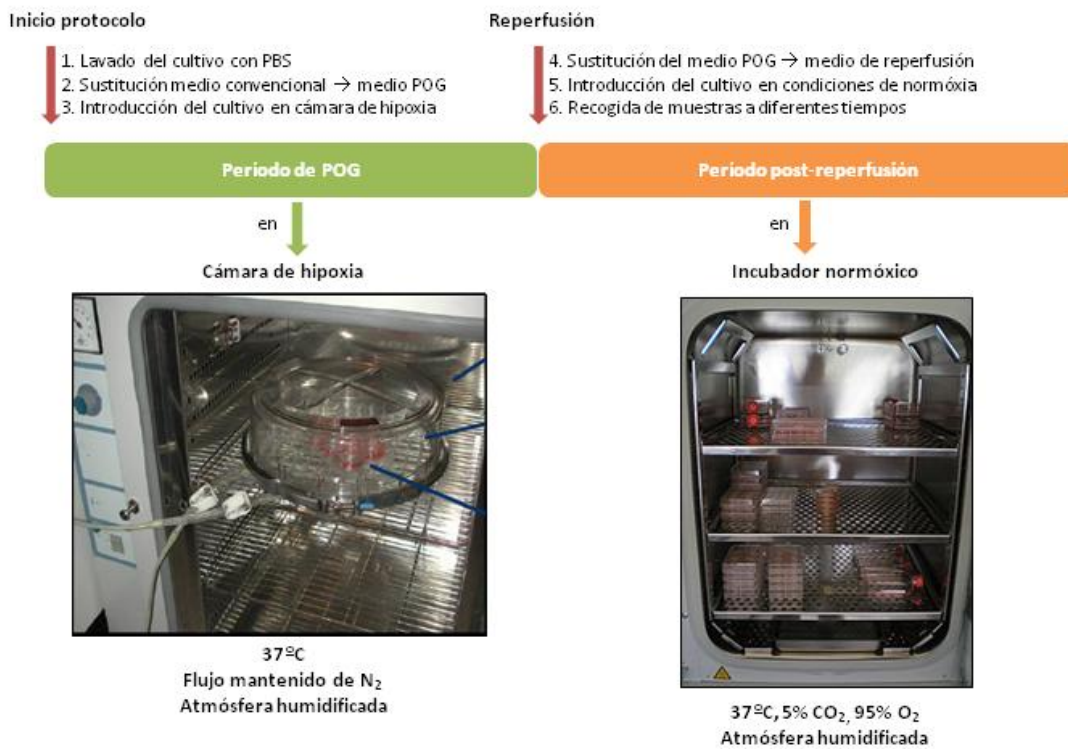
animal recostado sobre el lado derecho y mediante una incisión se expuso el músculo temporal. Con la ayuda de una lupa binocular (Nikon SMZ-1; Nikon Corporation) y mediante un microtorno (Drill Freedom H00, Stoelting; Wood Dale, Illinois, EEUU) se realizó una craneotomía en el hueso temporal, que permitió realizar la oclusión de la ACM mediante electrocoagulación (Geiger Model-100, Stolteing; Wood Dale, Illinois, EEUU)^{143,144}. Finalizada la oclusión, los animales empezaron a recuperarse de la anestesia y fueron devueltos a sus jaulas con comida y agua *ad libitum*. Las ratas sometidas a pMCAO fueron sacrificadas a los 30 minutos, 2, 6, 24, 48 y 72 horas y a los 7 y 14 días después de la oclusión (n = 6 por grupo). Los cerebros fueron extraídos y se recogió el tejido cortical infartado y peri-infartado de cada uno. Cada muestra se dividió en dos partes para la posterior extracción de ARN y proteína y se conservaron a -80 °C hasta su procesamiento. Del mismo modo, las muestras de tejido control de animales sanos, también se recogieron siguiendo el mismo protocolo y se conservaron a -80 °C, para su posterior procesamiento.

1.2 Modelos de isquemia cerebral *in vitro*: privación de oxígeno y glucosa (POG)

Los modelos *in vitro* permiten estudiar la patología fuera de un organismo vivo reproduciendo parcialmente y de forma controlada las condiciones *in vivo*. Se pueden elaborar estudios a nivel celular o tisular. En ambos casos se ejerce un control total sobre el entorno fisicoquímico (pH, temperatura, presión osmótica, presión de O₂ y de CO₂). El estudio de la isquemia cerebral a nivel celular o tisular a través de cultivos *in vitro* permite investigar sobre funciones fundamentales (proliferación y muerte celular), y además permite realizar ensayos de toxicidad o estudios de expresión génica y proteica en un ambiente isquémico. Por lo tanto, los modelos *in-vitro* son una herramienta muy poderosa para realizar estudios a nivel celular y molecular, permitiendo tener una idea más clara de las cascadas de señalización desencadenadas tras la isquemia. El modelo de POG es el modelo de isquemia experimental *in*

vitro más utilizado. Los efectos de la patología a nivel tisular o celular se inducen o se simulan por privación de oxígeno y glucosa ¹⁴⁵. Para inducir la isquemia *in vitro*, se realiza un cambio del medio de los cultivos por un tampón sin glucosa ni suplementos y se incuban las células en una cámara de hipoxia mantenida a 37 ± 1 °C en una atmósfera húmeda con un flujo constante que consisten en del 95% N₂ y 5% CO₂ o el 90% N₂, 5% CO₂ y 5% H₂. Tras la POG, se somete el cultivo celular a reperfusión para mimetizar el restablecimiento del flujo sanguíneo cerebral y la reoxigenación que se produce *in vivo* después de sufrir un ictus, reemplazando la solución de POG por un medio con glucosa y transfiriendo las células al incubador normóxico (Figura 8). Cada tipo celular requiere unas condiciones de POG específicas (medio de POG, tiempo de POG, medio de reperfusión). Por lo tanto, según el tipo celular con el que se trabaje, y sobretodo según el objetivo del estudio, deberemos optimizar las condiciones de POG.

Figura 8. Esquema general del protocolo de isquemia cerebral *in vitro* empleado en la presente tesis: la privación de oxígeno y glucosa (POG).



1.2.1 Generalidades y precauciones de las técnicas del cultivo celular

En esta tesis se han utilizado dos tipos de cultivos celulares primarios: células endoteliales de microvasculatura cerebral de rata (RBMVEC) y neuronas corticales de rata (RN). Independientemente de la técnica de cultivo celular específica empleada, durante todo el proceso se han seguido y mantenido unas estrictas condiciones de esterilidad. Los diferentes tipos de cultivos fueron mantenidos en un incubador de cultivo celular (Galaxy S, RS Biotech, Cultek; Madrid, España) a una temperatura constante de 37 °C en una atmósfera de 95% aire, 5% CO₂ con humedad saturada. Por último, todas las manipulaciones fueron realizadas en el interior de una campana estéril de flujo laminar vertical (810-11-A, Bio II A, Telstar; Terrassa, España).

1.2.2 Cultivo de RBMVEC

Con el fin de estudiar y elucidar la función de uno de los FTs objeto de estudio en el proceso de la angiogénesis, se utilizó el cultivo de células endoteliales de microvasculatura cerebral de rata (RBMVEC del inglés *rat brain microvascular endothelial cells*). Las RBMVEC se obtuvieron comercialmente de Cell Applications (Cell Applications; San Diego, California, EEUU), procedentes de cerebro de ratas adultas Sprague-Dawley, y criopreservadas en el pase 2. Las RBMVEC son células constituyentes de la barrera hematoencefálica (BHE) y se caracterizan por formar un endotelio continuo, sin fenestraciones, con uniones estrechas que confieren una mayor resistencia que las células endoteliales periféricas. Las RBMVEC expresan, entre otros, la proteína quimiotáctica de monocitos 1 (MCP-1), que recluta leucocitos en la BHE; el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF del inglés *vascular endothelial growth factor*) y su receptor VEGFR2 (también denominado F1k1/KDR) implicados en la remodelación vascular^{105,146-148}. Los criotubos de RBMVEC, almacenados a -196 °C (en nitrógeno líquido) fueron descongelados rápidamente en el baño a 37 °C. Cuando se observó una bolita pequeña de hielo, se extrajeron rápidamente los criotubos del baño para evitar una citotoxicidad excesiva promovida por el

crioprotector DMSO a temperatura ambiente. Posteriormente, en la campana de flujo laminar, se homogeneizó el contenido del criotubo y se diluyeron en 1-2 mL de medio de crecimiento convencional de RBMVEC (Anexo I). A continuación se mezclaron 10 µl de la suspensión celular con 10 µl de azul de tripán (Sigma; St Louis, Missouri, EEUU) (consiguiendo una dilución 1/2) y se cargaron 10 µl de la mezcla en la cámara de Neubauer para realizar el conteo celular en el microscopio invertido (Zeiss; Oberkochen, Alemania). La concentración de la suspensión celular se calculó mediante la fórmula siguiente:

$$\text{Concentración inicial (células/ml)} = \text{media contaje}^a \times Fd^b \times 10000^c$$

^a: media del conteo de células de los 4-8 cuadrantes de la cámara de Neubauer

^b: factor de dilución de la suspensión celular en la mezcla con azul de tripán

^c: factor de corrección asociado a la cámara de Neubauer

Una vez determinada la concentración celular de partida, la suspensión celular se diluyó con el medio de crecimiento convencional de las RBMVEC (Anexo I.A) para conseguir la concentración celular final deseada según el experimento, (ver apartados 1.2.2.1.2.1, 1.2.2.1.2.2, 1.2.2.1.2.3, 6.1.2.1, 6.1.2.2 de esta sección). Finalmente, se sembró la suspensión celular en frascos de cultivo (*flasks*) o placas de cultivo, previamente recubiertos con Cell Attachment (Cell Applications; San Diego, California, EEUU). Este reactivo mimetiza la membrana basal de los vasos, favoreciendo la adhesión y el crecimiento de las células endoteliales. Una vez sembradas, las RBMVEC se transfirieron y mantuvieron en cultivo en el incubador a 37 °C y en una atmósfera del 5% de CO₂.

1.2.2.1 Optimización del modelo de isquemia experimental en las RBMVEC

1.2.2.1.1 Revisión bibliográfica y comparación de los protocolos de POG utilizados en RBMVEC

Tal y como se ha comentado, según el tipo celular con el que se trabaje es necesario optimizar el protocolo de POG. Dado que no existía un protocolo de POG establecido para este tipo celular, en la presente tesis se realizó una búsqueda bibliográfica a fin de revisar y comparar los diferentes modelos de isquemia cerebral *in vitro* con células endoteliales de microvasculatura cerebral. Para este fin, se utilizó la base de datos *PubMed* (2.1.1 de esta sección) y en cada estudio se revisó el modelo celular (especie, cultivo primario vs cultivo inmortalizado, cultivo simple vs co-cultivo), el medio de isquemia, el tiempo del tratamiento de POG y el tiempo que se mantenían las células en cultivo después de la reperusión.

1.2.2.1.2 Optimización del protocolo de POG de las RBMVEC

Tras realizar una exhaustiva búsqueda bibliográfica y comparar distintos protocolos de POG, observamos que en el contexto de las células endoteliales de microvasculatura cerebral no hay un protocolo estandarizado para someter a las RBMVEC en condiciones de isquemia experimental. Por este motivo, procedimos a optimizarlo, con el objetivo de conseguir mantener la viabilidad celular el máximo tiempo posible tras la reperusión.

Veinticuatro horas después de sembrar las RBMVEC, se sometieron las células a isquemia cerebral *in vitro*, concretamente se valoraron 3 protocolos de POG diferentes (protocolos 1, 2 y 3; tabla 2). Estos protocolos fueron seleccionados según estudios previos encontrados en la bibliografía realizados con el mismo tipo celular de especies similares¹⁰⁵. Antes de la exposición a la isquemia experimental *in vitro*, las células se lavaron dos veces con tampón fosfato salino (PBS) y posteriormente se añadieron los diferentes medios de POG a testar (solución sin glucosa), previamente burbujeados con N₂. Los medios de POG testados fueron: medio mínimo

esencial de Dulbecco (DMEM) libre de glucosa (Invitrogen, Life Technologies; Grand Island, Nueva York, EEUU) (protocolo 2 y 3) y tampón de Krebs (protocolo 1) (Anexo I.B). Las células se transfirieron a una cámara de hipoxia (Modular incubator chamber, Billups-Rothenberg Inc; Del Mar, California, EEUU;) controlada por temperatura (37 ± 1 °C) conectada a un flujo constante de N₂ y mantenida en una atmósfera húmeda, durante periodos de tiempo diferentes (90 y 150 minutos). La reperfusión se realizó mediante la sustitución del medio de POG por medios que contienen glucosa. Concretamente los medios ensayados para el periodo de reperfusión fueron el tampón de Krebs con glucosa (5 mM) (protocolo 1), DMEM con glucosa (5 mM) (protocolo 2), y el medio convencional para las células endoteliales de microvasculatura cerebral de rata (protocolo 3) (ver Anexo I.B). Los cultivos se devolvieron al incubador en condiciones de normoxia hasta el final del experimento. Los cultivos control se mantuvieron con la misma solución POG (de cada protocolo) a la que se le añadió glucosa (5 mM; solución de control) y se mantuvieron en el incubador en condiciones de normoxia durante el mismo periodo de tiempo que las células sometidas a POG.

Tabla 8. Descripción de los medios utilizados para la optimización de la POG en RBMVEC.

PROTOCOLO	MEDIO POG	MEDIO REPERFUSIÓN
1	Solución de Krebs	Solución de Krebs + glucosa
2	DMEM libre de glucosa	DMEM + glucosa
3	DMEM libre de glucosa	Medio convencional

Para optimizar el protocolo de POG en las RBMVEC se realizaron diferentes análisis que permitieron comparar los distintos protocolos de estudio. Concretamente, se evaluó la viabilidad celular, la citotoxicidad y la integridad del ARN en las RBMVEC después de los distintos protocolos de POG.

1.2.2.1.2.1 Evaluación de la viabilidad celular: ensayo MTT

La viabilidad celular se evaluó con el ensayo MTT. Este es un ensayo colorimétrico para medir la actividad de enzimas mitocondriales que reducen el bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio (o MTT) a formazan, su forma insoluble, dando un color púrpura^{149,150}. Posteriormente se utiliza una solución solubilizadora (normalmente DMSO) para diluir los cristales insolubles de formazan dando una solución de color. La absorbancia de esta solución se puede cuantificar mediante un espectrofotómetro. La absorbancia máxima es dependiente del solvente utilizado. Este análisis permite medir la actividad celular metabólica a través de las enzimas celulares oxidoreductasa dependientes de NAD(P)H, que bajo condiciones definidas, reflejan el número de células viables (proliferación celular). Concretamente, en nuestro estudio, se sembraron las RBMVEC en placas de 96 pocillos tratadas para el cultivo celular (Cultek, Madrid, España) previamente recubiertas con Cell Attachment (Cell Applications; San Diego, California, EEUU) a una densidad de 10000 células/pocillo. Tras el tratamiento de POG/reperfusión (protocolos 1-3), se aspiró el medio de las placas de 96 pocillos y se añadieron 100 µl de medio fresco y 10 µl de MTT (diluido en PBS a una concentración de 5mg/ml) (Sigma, St Louis, Missouri, EEUU) a cada pocillo. Se incubaron las placas con MTT a 37 °C durante 2,5 horas. Posteriormente, se aspiró el medio y se diluyeron los cristales de formazan con 100 µl de DMSO y mediante agitación suave de la placa. Se midió la absorbancia a 570 nm usando un lector de placas (Spectra Max 340PC, BioNova científica; Barcelona, España). La viabilidad celular se expresó como un porcentaje respecto el valor obtenido de los cultivos del grupo control. El ensayo MTT se utilizó para comparar la viabilidad celular tanto a las 0 horas como a las 2, 24, 72 horas y 5 días después de la reperfusión tras someter a las células a los diferentes protocolos de POG.

1.2.2.1.2.2 Evaluación de la citotoxicidad: Ensayo LDH

Se evaluó la citotoxicidad mediante la determinación de lactato deshidrogenasa (LDH). La LDH es un enzima citosólico soluble presente en la mayoría de células eucariotas, que se libera al medio extracelular tras la muerte celular debido a daños en la membrana plasmática, es decir, tras la lisis celular (Koh *et al.*, 1987). El aumento de la actividad de la LDH en el medio de cultivo es proporcional al número de células lisadas. Se utilizó el kit LDH Cytotoxicity Assay (Innoprot; Exalderio, Bizkaia, España). Este kit consiste en un ensayo colorimétrico que mide la actividad de la LDH utilizando un cóctel de reacción que contiene lactato, NAD^+ , diafrosa e INT (sal de tetrazolium). La LDH cataliza la reducción de NAD^+ a NADH en presencia de L-lactato. La formación de NADH puede medirse en una reacción acoplada en la que la sal de tetrazolium INT es reducida a formazan. La cantidad de formazan formado se puede medir a través del espectrofotómetro (490 nm), debido a que es un producto altamente coloreado (rojo) y soluble. Se utilizó el kit siguiendo las instrucciones del fabricante. En el presente estudio, las RBMVEC se sembraron en placas multipocillo de 96 pocillos tratadas para el cultivo celular (Cultek, Madrid, España) previamente recubiertas con Cell Attachment (Cell Applications; San Diego, California, EEUU) a una densidad de 10000 células/pocillo. Tras someter las RBMVEC a POG/reperfusión (protocolos 1-3), se centrifugaron las placas de 96 pocillos a 400 g durante 5 minutos y se transfirieron 150 μl de sobrenadante de cada pocillo al pocillo correspondiente de otra placa de fondo plano de 96 pocillos. Posteriormente, se añadieron 60 μl de cóctel de reacción en cada pocillo y se incubó la mezcla en la oscuridad durante 20 minutos a temperatura ambiente. A continuación se añadieron 20 μl de solución stop (sodio oximato) para detener la reacción y se leyó la absorbancia de cada muestra a 490 nm mediante un lector de placas (Spectra Max 340PC, BioNova científica; Barcelona, España). Unos pocillos se trataron con Tritón X-100 (Sigma; St Louis, Missouri, EEUU) el cual promovió la casi total lisis celular. Este grupo se denominó control positivo y representó la liberación total de LDH (muerte celular completa 100%). Para la expresión de los resultados de citotoxicidad primero se normalizaron los valores

de LDH extracelular (del medio) obtenidos en los grupos de estudio (células sometidas a POG/reperfusión: protocolos 1-3 y células control, no sometidas a isquemia experimental) por el LDH total. A partir de aquí, la tasa de liberación de LDH de los grupos de estudio se expresó como el porcentaje de LDH del medio del grupo control. De este modo, la tasa de muerte celular se expresó según la siguiente fórmula: % citotoxicidad = (LDH del medio grupo de estudio / LDH grupo control) × 100%. El ensayo de LDH se realizó para comparar la citotoxicidad de las RBMVEC a diferentes tiempos de reperfusión después de la exposición del cultivo a 90 minutos de POG utilizando protocolos diferentes (Tabla 8).

1.2.2.1.2.3 Electroforesis en gel de agarosa (integridad del ARN)

Finalmente para la optimización del protocolo de POG en las RBMVEC, también se evaluó la integridad del ARN. Para este estudio las RBMVEC se sembraron en placas de 6 pocillos tratadas para el cultivo celular (Cultek, Madrid, España) previamente recubiertas con Cell Attachment (Cell Applications; San Diego, California, EEUU) a una densidad de 200000 células/pocillo. La obtención y cuantificación del ARN se realizó según el apartado 3.1.2 de la sección de metodología. El análisis de la integridad del ARN se realizó mediante electroforesis en gel de agarosa/TAE al 3%. La electroforesis en gel es un método que se emplea para separar macromoléculas en función del tamaño, la carga eléctrica y otras propiedades físicas. El término electroforesis describe la migración de las partículas cargadas bajo la influencia de un campo eléctrico. La electroforesis en gel de agarosa es un método normalizado que se utiliza para separar, identificar y purificar fragmentos de ácidos nucleicos.

Para realizar la electroforesis en gel, en primer lugar se preparó el gel de agarosa. Se preparó una solución de agarosa (Sigma; St Louis, Missouri, EEUU) en tampón TAE 1X (ver composición en Anexo III.A) al 3% (1,5 gr de agarosa en 50 mL de tampón TAE 1X). El tampón garantiza que durante la carrera el pH se mantenga cercano a 8. Esto es importante ya que la migración del ARN depende de las cargas negativas de los fosfatos, y las cargas dependen del pH

del medio (es decir, de los iones cargados del medio). Si el pH del medio fuera muy ácido, posiblemente los fosfatos no se encontrarían ionizados y esto afectaría la fuerza eléctrica que permite la migración de las moléculas. Brevemente, la agarosa y el TAE se introdujeron en un matraz Erlenmeyer y mediante un microondas se disolvió la agarosa por calor, evitando la ebullición de la solución y la evaporación. La mezcla se enfrió hasta los 50 °C agitando suavemente para evitar la polimerización parcial de la agarosa. Luego, bajo una campana de extracción de gases se añadieron 3,5 µl de bromuro de etidio (Sigma; St Louis, Missouri, EEUU), un agente intercalante que permite la visualización de las bandas del ácido nucleico mediante luz ultravioleta (UV) una vez finalizada la electroforesis. Debido a que el bromuro de etidio es mutagénico, se debe manipular el gel con guantes. A continuación se incorporó la solución de agarosa en un molde, se colocaron los peines, se eliminaron las posibles burbujas y se esperó hasta la polimerización completa del gel (la agarosa al enfriarse forma interacciones entre las moléculas que al solidificarse forma una red). Una vez solidificada la agarosa se retiraron los peines, se colocó el gel en la cubeta de electroforesis y se agregó la cantidad de tampón TAE 1X suficiente para cubrir todo el gel.

A continuación se procedió a la preparación de las muestras. Se utilizaron las muestras de ARN extraídas (apartado 3.1.2 de esta sección) de las RBMVEC sometidas a los diferentes protocolos de POG. Se resuspendió 1 µg de cada muestra en agua libre de ARNs (Ambion, Life Technologies; Grand Island, Nueva York, EEUU) hasta un volumen de 10-12 µl, y se mezclaron con el tampón de carga (Invitrogen, Life Technologies; Grand Island, Nueva York, EEUU) a una ratio aproximada de 1:1. El azul bromofenol (uno de los componentes del tampón de carga) es un colorante que permite ver el recorrido de la muestra durante la electroforesis. El glicerol (otro componente del tampón de carga), es una sustancia viscosa que provee mayor densidad a la muestra, evitando que difunda a través del tampón TAE en el que está inmerso el gel.

Una vez preparadas las muestras y el gel de agarosa, se procedió a la carga de las muestras y del marcador de peso molecular (1-2 µl) (Invitrogen, Life Technologies; Grand Island,

Nueva York, EEUU) en el gel de agarosa. Se conectó la cuba que contenía al gel a una fuente de electroforesis, con el polo positivo en el lado opuesto al sitio de la carga de muestras y se corrió el gel a voltaje constante (5-6V/cm). Para la visualización se expuso al gel a luz UV, colocándolo en un transiluminador (equipo Gel-Doc, Bio-Rad; Hercules, California, EEUU).

Las muestras de ARN intactas, corridas en un gel de agarosa, deben mostrar dos bandas claras que corresponden a las subunidades 28S y 18S del ARN ribosómico (muestras eucarióticas). La banda 28S debe ser el doble de intensa que la 18S. Esta ratio 2:1 (28S:18S), es un buen indicativo de que el ARN está totalmente intacto. El ARN parcialmente degradado tiene una apariencia de “mancha difusa” (del inglés *smear*) y no exhibe la ratio 2:1, que corresponde a un ARN de alta calidad. El ARN completamente degradado aparece como un *smear* de bajo peso molecular. El análisis de la integridad del ARN se usó para comparar la calidad del ARN de las RBMVEC después de ser tratadas con diferentes protocolos de POG.

1.2.3 Cultivo de neuronas corticales de rata (RN)

Otro tipo celular con el que se ha trabajado en esta tesis es el cultivo primario de neuronas corticales de rata. Concretamente se ha utilizado este cultivo para estudiar y analizar la posible participación del FT Oct-2 en citotoxicidad y daño neuronal.

Los cultivos primarios de neuronas corticales de rata se obtuvieron mediante la extracción de los cerebros fetales de ratas Wistar en el día embrionario (E) 16, la posterior disección de la zona cortical, la homogeneización y el conteo celular tal y como se describió previamente^{151,152}.

La rata se sacrificó por decapitación y se extrajeron los fetos. A continuación se lavó la cabeza y la parte superior del cuerpo de los fetos con etanol al 95% y posteriormente con una solución de lavado de fetos (Anexo II A) para retirar los restos del etanol. Se cortó la cabeza por la base del cráneo y se introdujo en una placa con medio de disección *L-15 Medium Leibovitz* (Sigma; St Louis, Missouri, EEUU) (el cual permite incrementar la producción endógena de CO₂

del cultivo haciéndolo independiente de la aportación exógena de éste, gracias a su elevado contenido en piruvato).

Para la obtención de las cortezas cerebrales se trabajó bajo la lupa y a 4 °C (colocando las muestras en soportes sobre hielo). Se colocó la cabeza en una placa con medio L15 limpio, y se extrajo el cerebro, pasándolo a continuación a otra placa con medio L15 limpio. Después de retirar las meninges y los vasos sanguíneos (paso importante para conseguir una buena pureza del cultivo) se diseccionó el cerebro hasta que nos quedamos sólo con las cortezas de los dos hemisferios, y se transfirió a una nueva placa con PBS 1X estéril (Gibco, Life Technologies; Grand Island, Nueva York, EEUU).

A continuación se procedió a la homogeneización de las cortezas, realizando todo el proceso bajo la campana de cultivos. Se empezó el proceso mecánicamente con unas tijeras y se continuó la homogeneización colocando el tejido en un tubo de 15 ml y pasando varias veces (pero no más de diez) el homogeneizado por 3 pipetas Pasteur estériles de diferentes diámetros (estrechadas en la llama), para disgregar completamente el tejido. Después de obtener el tejido completamente disgregado, se añadió PBS 1X estéril hasta un volumen de 10 ml y se centrifugó durante 5 minutos a 900 rpm a temperatura ambiente. Se decantó el sobrenadante y se añadió 1 ml del medio de crecimiento convencional (MC) (Anexo II.B) para volver a homogeneizar con las 3 pipetas, añadiendo progresivamente más medio, hasta un volumen de 11 ml. Tras dejar reposar unos segundos el homogeneizado se recogieron 10 ml de sobrenadante y se procedió al conteo celular. Esta fase se realizó en el hemocitómetro o cámara de Neubauer a la que se cargó a cada lado 10 µl de la dilución obtenida de la suspensión celular con azul de tripán. Se realizó el conteo bajo el microscopio invertido, aplicando la misma fórmula que en el apartado 1.2.2 de la presente sección.

Tras el conteo, las células disociadas se sembraron a la densidad requerida ($1,5 \times 10^6$ células/pocillo) en placas de 6 pocillos (Cultek, Madrid, España) previamente recubiertas con

poli-L-lisina (Sigma Sigma; St Louis, Missouri, EEUU) para mejorar la adherencia. Las placas se mantuvieron en un incubador a 37 °C en una atmósfera húmeda con 95% de O₂/5% de CO₂. Al día *in vitro* (DIV) 4, se cambió el medio por MC fresco pero sin suero fetal (FBS) y se añadió citosina-D-arabinósido (10 µM) (Sigma; St Louis, Missouri, EEUU) con el objetivo de inhibir el crecimiento de células gliales. Tres días más tarde (DIV 7) se sustituyó el medio por MC fresco que sin FBS ni citosina-D-arabinósido, realizando este cambio de medio 2 veces por semana. Los estudios se realizaron entre los días 11 y 12 *in vitro* (DIV 11-12).

1.2.3.1 POG de las RN

Para el estudio de la expresión proteica del FT Oct-2 en condiciones de isquemia experimental, fue necesario someter el cultivo de RN a condiciones de POG. Las RN fueron sometidas a POG letal y subletal, tal y como previamente fue descrito^{151,153}. En primer lugar, el MC (Anexo II.B) fue reemplazado por una solución de POG (Anexo II.C) burbujeada con N₂ 95%/CO₂ 5%. Las células del grupo POG se transfirieron a la cámara de hipoxia (*Modular Incubator Chamber*, Billups-Rothenberg Inc; Del Mar, California, EEUU) humidificada a 37 °C, con una mezcla de gas de N₂ 95%/5% CO₂ y mantenida a una presión constante de 0,15 bar. El tiempo de exposición a POG subletal y letal fue de 130 y 150 minutos, respectivamente. La POG se terminó reemplazando el medio de POG por medio de reperfusión y transfiriendo el cultivo a un incubador normóxico. Las células control fueron expuestas a una solución idéntica al grupo POG pero que contiene glucosa (33 mmol/L; solución de control) y se mantuvieron en el incubador normóxico durante el mismo periodo de tiempo que el grupo POG. Posteriormente, la solución de incubación se reemplazó por medio de reperfusión (Anexo II.C) y el cultivo fue transferido otra vez al incubador normóxico hasta el final del experimento. El medio de cultivo y las células se recogieron a las 0, 6 y 24 horas post-reperfusión para la determinación de la liberación de LDH (apartado 1.2.2.1.2.1 de esta sección) y para la extracción proteica (apartado 3.3 de esta sección).

2 Herramientas bioinformáticas

2.1 Identificación de genes candidatos implicados en angiogénesis e identificación de FTBS putativos

A continuación se describen las bases de datos y programas utilizados en la selección de genes candidatos implicados en angiogénesis y en el análisis bioinformático de sus regiones promotoras.

2.1.1 PubMed

PubMed es el portal de acceso libre y gratuito que proporciona la Biblioteca Nacional de Medicina de los Estados Unidos (NLM, del inglés *National Library of Medicine*), desde el que se accede a las citas y resúmenes de Medline y otras bases de datos de libre acceso al texto completo. Medline es la base de datos de medicina más conocida, existente desde 1950, que contiene citas y resúmenes de más de 15 millones de artículos de aproximadamente 5.000 publicaciones seleccionadas por la NLM desde 1966. Cada registro de Medline es la referencia bibliográfica de un artículo científico publicado en una revista médica, con los datos bibliográficos básicos de un artículo (Título, autores, nombre de la revista, año de publicación) que permiten la posterior recuperación de estas referencias en una biblioteca o a través de programas específicos de recuperación. *PubMed* proporciona búsquedas de consultas clínicas, enlaces a artículos relacionados, direcciones de investigadores (con la posibilidad de enviarles un correo-e), la posibilidad de exportar registros a gestores bibliográficos o a archivos en diferentes formatos, enlaces a PubChem, *NCBI sequence* y otras bases de datos bioquímicas. *PubMed* contiene información de artículos antes de que sean indexados en Medline, basta con que estén publicados electrónicamente. La búsqueda de artículos se puede realizar mediante diferentes tipos de índices: PMID (del inglés *PubMed Unique Identifier*, número único asignado a cada cita de un artículo de revista biomédica o de ciencia que recoge *PubMed*), MeSH (del inglés

medical subject heading), palabras clave, autores, texto libre, palabras en el título, en el abstract, etc. Además, *PubMed* proporciona acceso a los artículos indexados en papel desde 1951 a través de OldMedline. Esta base de datos se utilizó para la optimización del modelo de isquemia experimental en las RBMVEC y para la selección de genes candidatos implicados en angiogénesis (apartados 1.2.2.1 y 5.1 de esta sección). Se accedió al portal *PubMed* a través de

154

2.1.2 *GenBank*

GenBank es la base de datos de secuencias genéticas del *National Center for Biotechnology Information* (NIH), una colección de anotaciones de todas las secuencias de ADN disponibles públicamente ¹⁵⁵. *GenBank* forma parte de la *International Nucleotide Sequence Database Collaboration*, que comprende el *ADN DataBank of Japan* (DDBJ), el *European Molecular Biology Laboratory* (EMBL) y *GenBank* en NCBI. Estas tres organizaciones intercambian información diariamente. *GenBank* es una base de datos exhaustiva que contiene secuencias de nucleótidos de las casi 260000 especies formalmente descritas. Estas secuencias provienen de aportaciones de laboratorios individuales y de proyectos de secuenciación a gran escala, como el whole-genome shotgun (WGS) y proyectos ambientales de muestreo. La mayoría de datos e información se introduce en la base mediante las herramientas de la web Bankit o los programas independientes Sequin. Posteriormente el personal de *GenBank* asigna un número de acceso tras la recepción de los datos. El intercambio de datos con el *European Nucleotide Archive* (ENA) y el *ADN Bank of Japan* (DDBJ) garantiza la cobertura en todo el mundo. *GenBank* es accesible a través del sistema NCBI Entrez retrieval, que integra los datos de la mayor bases de datos de secuencias de ADN y de proteínas junto con la taxonomía, el genoma, el mapaje, la estructura proteica y la información del dominio, y la literatura de revistas biomédicas a través de *PubMed*. Actualizaciones diarias y publicaciones bimestrales de la base de datos *GenBank* están disponibles en FTP. Esta base de datos se utilizó para la obtención de la secuencia promotora de los genes candidatos involucrados en angiogénesis (ver apartado 5.2 de

la presente sección). Para tener acceso a *GenBank* y sus servicios de recuperación y análisis relacionados, se debe consultar la página principal de NCBI ¹⁵⁶.

2.1.3 Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)

BLAST es un programa informático de alineamiento de secuencia capaz de realizar búsquedas de similitud entre una secuencia problema y secuencias de GenBank y otras bases de datos. En la presente tesis hemos utilizado este programa para el estudio y caracterización de las isoformas de Oct-2 a nivel de ARNm y proteína (apartados 5.3.1.2.1 y 5.3.1.2.2 de la sección de resultados).

2.1.4 Reference Sequence (RefSeq)

La base de datos *Reference Sequence* (RefSeq) del NCBI, es una colección completa de secuencias anotadas, taxonómicamente diversas y no-redundantes que representan a moléculas de origen natural de ADN, ARN y proteína. Esta base incluye secuencias de plásmidos, organelas, virus, bacterias eucariotas. Cada secuencia de referencia se construye completamente a partir de datos de secuencias sometidas a la *International Nucleotide Sequence Database Collaboration* (INSDC). RefSeq representa la base de unión de datos de secuencia y de la información genética y funcional. Estas secuencias se generan para proporcionar estándares de referencia para múltiples propósitos, desde la anotación genómica hasta la de informar sobre la ubicación de variaciones de secuencia en los registros médicos. Las secuencias de esta base de datos forman la base para los estudios médicos, funcionales y de diversidad. Comprenden una referencia estable para la anotación genómica, la identificación génica, para la caracterización y análisis de mutaciones y polimorfismos, estudios de expresión y análisis comparativo. Esta colección está disponible sin restricciones y se puede acceder desde diferentes sitios: en los recursos que proporciona la NCBI (*PubMed*, *Nucleotide*, *Protein*, *Gene* y *Map Viewer*), buscando la secuencia con el programa BLAST y bajando la información desde el sitio RefSeq FTP ¹⁵⁷. En la

presente tesis, esta base de datos se ha utilizado para la obtención de la secuencia promotora de los genes candidatos involucrados en angiogénesis (apartado 5.2 de esta sección).

2.1.5 Protein Data Bank (PDB)

Protein Data Bank (PDB) es un depósito de datos estructurales 3D de moléculas biológicas grandes, tales como proteínas y ácidos nucleicos. Esta base de datos es útil para realizar búsquedas simples y avanzadas de anotaciones relacionadas con secuencias, estructuras y funciones, y para visualizar, obtener y analizar moléculas. Los datos, generalmente obtenidos experimentalmente por investigadores mediante cristalografía de rayos X o espectroscopia de resonancia magnética nuclear (RMN), son de libre acceso en Internet a través de los sitios web de los miembros organizadores: *PDB Europe* (PDBe), *PDB Japan* (PDBj) y *Research Collaboratory for Structural Bioinformatics* (RCSB). Además, PDB está supervisado por una organización llamada *Worldwide Protein Data Bank* (wwPDB). La misión de este banco de datos es mantenerlo como un archivo de datos de estructuras macromoleculares único, libre y a disposición pública de la comunidad mundial ¹⁵⁸. En la presente tesis, este programa se ha utilizado para la obtención de la secuencia promotora de los genes candidatos involucrados en angiogénesis (apartado 5.2 de la presente sección).

2.1.6 PROMO

PROMO es un laboratorio virtual para la identificación de potenciales sitios de unión de factores de transcripción (*transcription factor binding site*, TFBS) en secuencias de ADN de una especie o grupos de especie de interés. Los TFBS, definidos en la base de datos *TRANSFAC*, se utilizan para construir matrices de peso específicas de los sitios de unión, para la predicción de TFBS. Existen otros programas que utilizan matrices de peso para predecir TFBS, pero *PROMO* tiene algunas características únicas: la posibilidad de seleccionar sitios de una o un grupo de especies de interés, la construcción automática de matrices que corresponden al nivel taxonómico seleccionado, da información (en el archivo de salida "output") de otros genes que

pueden estar regulados de forma similar y da la posibilidad de analizar y comparar múltiples secuencias al mismo tiempo. Los resultados de la búsqueda se pueden inspeccionar a través de una interfaz gráfica y archivos de texto descargables^{159,160}. En nuestro estudio, este programa se ha utilizado para la identificación de los sitios de unión putativos para FTs implicados en la angiogénesis (apartado 5.2 de esta sección).

2.1.7 TRANSFAC

TRANSFAC es una base de datos única que contiene la colección más grande disponible de datos publicados sobre los factores de transcripción eucariotas, sus sitios de unión probados experimentalmente y los genes que regulan. Basándose en su amplia recopilación de sitios de unión, se generan matrices de peso posicionales (*Position Weight Matrix*, PWM). PWM es un motivo descriptivo que intenta capturar la variabilidad intrínseca característica de los patrones de una secuencia en una secuencia problema. Estas PWM usualmente derivan de un conjunto de secuencias alineadas relacionadas funcionalmente y muestra cuántas veces un nucleótido determinado ha sido observado en una posición dada. La matriz se normaliza para conseguir las frecuencias relativas dividiendo el valor en cada posición de la matriz entre el número de secuencias usado para construirla. Mediante la herramienta *Match*TM se pueden buscar secuencias de ADN para los sitios de unión de factores de transcripción previstos. El análisis de promotores de datos de alto rendimiento basado en PWM de *TRANSFAC*[®] se realiza gracias al sistema de análisis *ExPlain*TM. Mientras que *Genoma Trax*TM ofrece una plataforma para el mapeo de variaciones de secuencia de próxima generación en los sitios de unión de factores de transcripción caracterizados en *TRANSFAC*[®]. Concretamente en la presente tesis, hemos utilizado este programa con el objetivo de identificar los sitios de unión putativos para FTs implicados en la angiogénesis (apartado 5.2 de esta sección).

2.2 Identificación y caracterización de isoformas

Para la identificación de las isoformas de Oct-2 expresadas en corteza cerebral de rata se utilizaron diferentes programas bioinformáticos. A continuación los vamos a describir:

2.2.1 *Ensembl*

Para la predicción de las isoformas de Oct-2 en cerebro de rata (apartado 3.1.1.1 de la sección de resultados) se utilizó la base de datos *Ensembl* (versiones *release 69 - October 2012* y *release 70 - January 2013*). *Ensembl* es un proyecto científico conjunto entre el Instituto Europeo de Bioinformática y el *Wellcome Trust Sanger Institute*, que se inició en 1999 como respuesta a la finalización del Proyecto Genoma Humano. El genoma humano consta de tres mil millones de pares de bases, que codifican para aproximadamente 20.000-25.000 genes. Sin embargo, el genoma solo es de poca utilidad, a menos que se puedan localizar genes individuales. Una opción es la anotación manual, en la que se intentan localizar genes utilizando datos experimentales de revistas científicas y bases de datos públicas. Sin embargo, un alternativa a esta tarea lenta y laboriosa es la anotación automatizada, que consiste en utilizar la bioinformática para identificar segmentos de secuencia (normalmente ADN genómico) biológicamente funcionales (que codifican para proteínas). La base de datos *Ensembl* utiliza la anotación automática con el objetivo de proporcionar un recurso centralizado para los genetistas, biólogos moleculares y otros investigadores que estudian el genoma de especies de vertebrados y otros organismos. Es uno de los navegadores del genoma (*genome browser*) bien conocido para la recuperación de la información genómica. En bioinformática un navegador del genoma es una interfaz gráfica para la visualización de información de datos genómicos procedentes de una base de datos. Éstas permiten visualizar y navegar por el genoma con los datos anotados incluyendo la predicción de genes y la estructura de las proteínas, la expresión, la regulación, la variación, el análisis comparativo, etc. En el proyecto *Ensembl*, las secuencias se introducen en el sistema de anotación de genes que crea un conjunto de ubicaciones de genes

predichos y los guarda en un sistema de gestión de bases de datos (MySQL, del inglés *Structured Query Language*) para su posterior análisis y visualización. Todos los datos y el código producidos por el proyecto *Ensembl* son de libre acceso, están disponibles para la descarga, y hay también un servidor de base de datos accesible al público que permita el acceso remoto. Con el tiempo el proyecto se ha ampliado para incluir especies adicionales (incluyendo organismos modelo, como el ratón, el pez cebra y la mosca de la fruta), así como una gama más amplia de datos genómicos, incluyendo las variaciones genéticas. Desde abril de 2009, un proyecto hermano, *Ensembl Genomes*, ha ampliado el ámbito de *Ensembl* en invertebrados: metazoos, plantas, hongos, bacterias y protistas, mientras que el proyecto original sigue centrándose en los vertebrados. Se accedió a la información de Ensembl a través de <http://www.ensembl.org>^{161,162}.

2.2.2 *ClustalW2*

Este programa se utilizó para el alineamiento múltiple de las secuencias de las isoformas de Oct-2, con el fin de compararlas e identificar fragmentos de secuencia únicos para cada isoforma, paso esencial para el diseño de *primers* y ensayos Taq para la amplificación por PCR o qPCR (apartados 4.1 de esta sección y 3.1.1.2 de la sección de resultados).

ClustalW2 es un programa para el alineamiento de secuencias múltiples de ADN o proteínas. Produce alineamientos múltiples de diferentes secuencias de forma comprensible desde un punto de vista biológico. Calcula el mejor emparejamiento de las secuencias seleccionadas, y las alinea de forma que se aprecian los fragmentos idénticos, similares y diferentes. Las relaciones evolutivas se pueden ver mediante cladogramas o filogramas. Esta herramienta acepta diferentes formatos de la secuencia de entrada incluyendo NBRF/PIR, FASTA, EMBL/Swissprot, Clustal, GCC/MSF, GCG9 RSF y GDE. Para realizar el alineamiento múltiple, *ClustalW2* lleva a cabo una estrategia denominada “progresiva”, la cual consiste en tres pasos. En primer lugar realiza un alineamiento global pareado (mediante el

algoritmo Needleman-Wunsch)¹⁶³ de cada una de las secuencias, de tal manera que para un alineamiento de 5 secuencias, el número de alineamientos a realizar será de 10. Luego realiza el cálculo del árbol guía, mediante los métodos de reconstrucción basados en distancias *Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic means* (UPGMA, agrupamiento pareado no ponderado utilizando media aritmética) o *Neighbor-joining* (NJ), a partir del puntaje (o distancia genética) de los alineamientos pareados realizados en el primer paso. El árbol describe entonces la relación existente entre las secuencias que van a ser alineadas. No se debe considerar este como un árbol filogenético, sino como guía para ir añadiendo las secuencias al alineamiento múltiple. Finalmente realiza la creación del alineamiento múltiple, el cual se lleva a cabo en el orden determinado por el árbol guía. El algoritmo selecciona primero las dos secuencias más relacionadas y crea un alineamiento pareado de estas, y de manera progresiva va sumando una secuencia al resultado de dicho alineamiento. *ClustalW2* presenta los resultados en cuatro secciones: una tabla resumen de los resultados, la tabla de puntuación de los alineamientos (basados en la distancia genética entre cada secuencia y la raíz del árbol, teniendo en cuenta la puntuación por los cambios de aminoácidos ó nucleótidos), el alineamiento, y el árbol guía. Se accedió a *ClustalW2* a través de la web de *European Molecular Biology Laboratory-European Bioinformatics Institute* EMBL-EBI¹⁶⁴⁻¹⁶⁶.

2.2.3 Identificación de los dominios proteicos de las isoformas de Oct-2

Debido a la presencia de indicios de una actividad transcripcional diferencial entre las diferentes variantes transcripcionales de Oct-2, se realizó un estudio de sus dominios proteicos mediante la base de datos *PubMed* (ver apartado 2.1.1 de esta sección).

2.3 Diseño de oligonucleótidos: *Primer3*

Para el diseño de los oligonucleótidos, cebadores o *primers* necesarios para la amplificación e identificación de las diferentes isoformas de Oct-2 en cerebro de rata por PCR (apartado 4.1 de esta sección), utilizamos el programa *Primer3*.

Primer3 es una herramienta para el diseño de *primers* que también permite evaluar los oligonucleótidos diseñados. Este programa permite especificar un gran número de variables, es decir las características mínimas deseadas, y diseñar *primers* según las indicaciones solicitadas (acotando la búsqueda). Se puede indicar el tamaño y la temperatura de *melting* (T_m) deseados, las regiones de la secuencia que queremos incluir o excluir para la ubicación de los cebadores, el contenido en GCs (%), la máxima autocomplementariedad permitida en 3' y otros parámetros. Es una aplicación que se encuentra libre para su uso en diferentes servidores web. Los resultados obtenidos, se presentan en una tabla e incluyen un mapa de los mejores pares de oligonucleótidos, de acuerdo a las especificaciones dadas en el formulario. A esta herramienta se accedió a través de <http://primer3.ut.ee/>¹⁶⁷⁻¹⁶⁹.

2.4 Diseño de ensayos de expresión génica 'personalizados': *Custom TaqMan®*

Assay Design Tool

El diseño de ensayos de expresión génica específicos para el análisis de las isoformas de Oct-2 en corteza cerebral de rata (apartado 4.2 de esta sección y 3.1.2.1 de la sección de resultados) se realizó a través de *Custom TaqMan® Assay Design Tool*, disponible a través de la página web de Applied Biosystems (Applied Biosystems, Life Technologies; Grand Island, Nueva York, EEUU). Estos ensayos se diseñaron tomando como referencia las secuencias de las distintas isoformas de Oct-2 obtenidas a través del programa *Ensembl* (apartado 2.2.1 de esta sección). Los ensayos Taqman diseñados se recogen en la Tabla 10 (custom).

En primer lugar una vez se accedió en el programa se realizó la configuración de los ajustes bioinformáticos. Estos consistieron en la selección de la especie animal de trabajo (*Rattus norvegicus*) y de las secuencias de entrada (secuencias de interés o *input*) para el diseño de los ensayos. Si se escoge la opción de utilizar el análisis bioinformático (como en nuestro caso), esto implica que el programa trabaja del siguiente modo: (1) alinea la secuencia *input* con el genoma de la especie seleccionada y sus transcritos conocidos, (2) enmascara ('oculta', detecta y evita) los polimorfismos nucleotídicos simples (SNPs) y los fragmentos de baja complejidad de la secuencia *input* (3) y diseña los ensayos basándose en las opciones bioinformáticas escogidas realizando un control de calidad *in silico* para asegurar el mejor diseño posible. Después de confirmar el uso del análisis bioinformático, se seleccionó la especificidad del diseño del ensayo, es decir, se escogió la opción que limita el análisis bioinformático a incluir ensayos que sólo amplifican la secuencia *input* (y no otras variantes de la secuencia). A continuación se sometió la secuencia de interés (que obtuvimos del *Ensembl*, ver 4.2.2.1) en la dirección 5' a 3', se introdujo el nombre de la secuencia, y se seleccionó la opción *Manual* en el campo *Target Site Position & Name column*, para poder indicar (manualmente) el número de bases entre el sitio diana que deseamos amplificar y el extremo 5'. Posteriormente, estos datos se enviaron a la casa comercial (Applied Biosystems, Life Technologies; Grand Island, Nueva York, EEUU) que remitió un informe detallado del diseño de los ensayos: nombre del ensayo (*Assay Name*), número de identificación asignado por Applied Biosystems (*Assay ID*), el estado del diseño del ensayo (*Status*), el sitio en que la secuencia *input* alinea en el genoma (*Locus*), la posición cromosómica en la que la secuencia *input* se alinea (*Genome position*), el número de bases del fragmento que amplifica (amplicón) el ensayo diseñado (*Amplicon Size*). Finalmente tras revisar la información proporcionada por la casa comercial, se seleccionó el formato y la cantidad de los ensayos deseados para su síntesis.

2.5 Cuantificación relativa de la expresión génica por qPCR: 7000 System SDS

Software

Para el análisis de los resultados de cuantificación relativa de la expresión génica por qPCR (apartado 4.2.3 de la presente sección) se utilizó el programa bioinformático 7000 System SDS Software v1.2.3 (Applied Biosystems, Life Technologies; Grand Island, Nueva York, EEUU).

Para el análisis de datos, se abrió el fichero (obtenido del instrumento ABI PRISM 7000 *Sequence Detection System*) desde el programa y en el apartado *Amplification plot* se marcaron los pocillo de la gradilla (que representa la placa) correspondientes al gen de estudio, se seleccionó el nombre del gen (en la sección *Detector*), *Automatic CT* (en la sección *Analysis Settings*, para la determinación automática del umbral o *Threshold*) y se analizó con la opción *Analyze*. Después de este primer análisis, se descartaron (seleccionando el pocillo y marcando las teclas “*Ctrl*” y “*M*” simultáneamente) los pocillos *outliers*, es decir aquellos que representaban valores numéricamente distantes al resto de datos del grupo (cada muestra fue analizada por triplicado). Posteriormente, se seleccionaron los pocillos del gen de estudio en la gradilla y se volvieron a analizar los datos mediante la opción *Analyze*. Finalmente se guardó el documento y se exportó mediante *File/Export/Results*. Este proceso se repitió para cada gen de estudio y se realizó el análisis y normalización (con el programa Excel) mediante los métodos $\Delta\Delta C_T$ y ΔC_T (ver apartado 4.2.3 de la presente sección).

2.6 Análisis estadístico: IBM SPSS

El análisis estadístico se realizó con la versión 21.0 del programa SPSS Statistics (IBM; Armonk, Nova York, EEUU). SPSS es un programa informático estadístico muy usado en áreas de distintas disciplinas, siendo un referente utilizado por instituciones gubernamentales, empresas y centros de investigación de todo el mundo. Es uno de los programas estadísticos más

conocidos teniendo en cuenta su capacidad para trabajar con grandes bases de datos y un sencillo interface para la mayoría de los análisis. El programa consiste en un módulo base y módulos anexos que se han ido actualizando constantemente con nuevos procedimientos estadísticos. La interfaz que ofrece este programa permite introducir datos y realizar los más complejos análisis estadísticos, construir gráficos, tablas descriptivas o diagramas y otras operaciones con gran rapidez. En la presente tesis utilizamos este programa para el análisis estadístico de los resultados de los experimentos de expresión génica, de los experimentos de optimización de la POG en las RBMVEC y de los estudios funcionales de silenciamiento mediante la transfección de siRNA en las RN y las RBMVEC.

Todos los resultados fueron expresados como la media \pm la media del error standard (SEM). Para comparar la expresión génica en cada tiempo después de la isquemia cerebral respecto la media del grupo control, se utilizó el test del análisis de la varianza one-way (ANOVA) (o el test de Kruskal-Wallis cuando los datos no fueros distribuidos normalmente) seguido del análisis post-hoc Dunnett's. Para el estudio de optimización de la POG en las RBMVEC (comparación de la viabilidad y citotoxicidad entre los diferentes protocolos a lo largo de los diferentes tiempos de reperfusión) también se utilizó el test ANOVA. Para analizar las diferencias entre las muestras silenciadas con siRNA respecto al grupo control (todos los estudios funcionales *in vitro*), se utilizó la prueba t de Student (o el test de Mann-Whitney, cuando los datos no seguían una distribución normal). Se consideraron las diferencias significativas cuando se obtuvo un valor de p inferior a 0.05 (*p<0.05, **p<0.01, #p<0.001).

3 Procesamiento de las muestras de tejido cerebral de rata y de los cultivos celulares

3.1 Obtención de ARN

3.1.1 Precauciones al trabajar con ARN

A la hora de trabajar con ARN deben tomarse las máximas precauciones para evitar contaminaciones con ARNasas y la degradación del ARN. Por este motivo, independientemente de la técnica utilizada (extracción, cuantificación y retrotranscripción), en todo momento se trabajó en un ambiente libre de ARNasas, se utilizaron puntas de pipeta libres de ARNasas, se utilizó material plástico desechable (tubos, puntas de pipetas) estéril y certificado libre de ARNasas, el material de vidrio se incubó en un horno a 240 °C toda la noche. El material de plástico no desechable como cubetas de electroforesis, probetas, vasos de precipitados, se lavó con 0.1 M NaOH, 1mM EDTA durante 5 minutos, y se enjugó con agua MilliQ libre de ARNasa. Las soluciones acuosas se trataron con dietilpirocarbonato (DEPC), compuesto que inactiva las ARNasas por unión covalente. El DEPC es tóxico y posible carcinógeno, por lo que deben utilizarse guantes y realizar todo el proceso en una campana de extracción hasta su inactivación por autoclavado. Las superficies de trabajo se limpiaron con ARNasa Zap (Ambion, Life Technologies; Grand Island, Nueva York, EEUU). Se usaron guantes a lo largo de todo el proceso (las manos son la mayor fuente de ARNasas) y se trabajó lo más rápido posible, con el fin de evitar la degradación del ARN durante la manipulación. Asimismo, se mantuvo la muestra de ARN siempre en hielo o bloque frío, al menos que estuviera disuelta en un disolvente orgánico. Finalmente, con el fin de obtener los mejores rendimientos, se usaron muestras frescas como material de partida.

3.1.2 Extracción y cuantificación de ARN

La extracción de ARN se llevó a cabo a partir de tejido cerebral de rata obtenidos según el apartado 1.1.2 de esta sección y a partir de cultivo celular primario de RBMVEC y RN (apartados 1.2.2 y 1.2.3 de la misma sección).

3.1.2.1 Homogeneización de las muestras de tejido cerebral

Para el procesamiento de las muestras de tejido cerebral, se transfirió el reactivo de lisis Qiazol (Qiagen; Hilden, Alemania) a las muestras congeladas de corteza cerebral y se homogeneizó con un homogeneizador (Ultra-Turrax T25, Hielscher; Teltow, Alemania).

3.1.2.2 Homogeneización de las muestras de cultivos celulares

Para el procesamiento de las muestras de los cultivos celulares, también se transfirió el reactivo de lisis Qiazol (Qiagen; Hilden, Alemania) directamente en los pocillos de las placas de cultivos celulares correspondientes y se lisaron las células con la ayuda de un raspador o *scraper* (Cultek, Madrid, España).

En este punto, se puede proseguir con la extracción del ARN o bien se pueden congelar las muestras a -80 °C hasta el momento de la extracción.

3.1.2.3 Extracción de ARN

Para la extracción de ARN se utilizaron el *RNeasy® Lipid Tissue Mini Kit* (Qiagen; Hilden, Alemania) y el *miRNeasy Mini kit* (Qiagen; Hilden, Alemania), para las muestras de tejido cerebral y de cultivos celulares, respectivamente, siguiendo las instrucciones del fabricante. El *RNeasy® Lipid Tissue Mini Kit* se escogió porque permite el procesamiento óptimo de muestras cerebrales, que se caracterizan por un alto contenido en lípidos. Por otro lado, el *miRNeasy Mini kit* se escogió porque permite co-purificar eficientemente tanto ARNs largos (ARN mensajero y ARN ribosómico) como cortos (microARN, ARN pequeño nucleolar, ARN pequeño nuclear y ARN

asociado a Piwi) para su detección mediante PCR cuantitativa, a partir de muestras de cualquier tipo celular.

Se inició la extracción añadiendo cloroformo en las muestras homogeneizadas (de tejido cerebral o celulares) y mezclando con fuerza mediante un agitador. A continuación los homogeneizados se separaron en fase acuosa y orgánica por centrifugación y se transfirió la fase superior acuosa (contiene el ARN) en un nuevo tubo libre de ARNasas. El primer tubo, que contiene tanto la fase orgánica (proteínas) como la interfase (ADN), se desechó. Luego se añadió etanol en los tubos de las fases acuosas y se transfirió cada mezcla a las columnas proporcionadas por el kit (RNeasy *spin*). El etanol proporciona las condiciones óptimas para que el ARN total pueda unirse a la membrana interior de las columnas del kit. Posteriormente, se realizaron una serie de lavados con los tampones RWT y RPE (proporcionados por el kit) con el fin de eliminar eficientemente los restos de fenol y otros contaminantes de la muestra. Finalmente, el ARN total se eluyó de la columna mediante la adición de 30 μ l de agua libre de ARNasas directamente sobre la membrana de las columnas y centrifugación (Figura 9).

3.1.2.4 Cuantificación del ARN

La cuantificación se realizó mediante un espectrofotómetro (Spectra Max 340PC, BioNova científica; Barcelona, España), mediante la lectura de la absorbancia a 260 nm (A260). Se sabe que una unidad de A260 equivale a \sim 40 μ g/ml de ARN de cadena sencilla (*ssARN*, del inglés *single strand*) disuelto en agua. A partir de esta relación, el espectrofotómetro determina las concentraciones de las muestras de ARN extraídos. También se estimó su grado de pureza con la razón de las lecturas a A260 nm y A280 nm. Las muestras de ARN puras dan una razón A260/A280 de entre 1,8 y 2.

La integridad del ARN se verificó mediante visualización de las muestras sometidas a electroforesis en un gel de agarosa/TAE al 1-3% (apartado 1.2.2.1.2.3 de la presente sección).



Figura 9. Protocolo de extracción de ARN total a partir de tejido cerebral o de muestras procedentes de cultivo celular.

3.2 Obtención de ADN complementario (ADNc)

El ARN obtenido (apartado 3.1.2.3 de esta sección) a partir de las muestras de tejido cerebral y cultivo celular, se retrotranscribió a ADN complementario (ADNc) mediante el kit *Hight Capacity ADNc Reverse Transcription Kit* (Applied Biosystems, Life Technologies; Grand Island, Nueva York, EEUU), siguiendo las instrucciones del fabricante. Para todas las muestras se realizaron dos retrotranscripciones independientes. El ADNc obtenido se utilizó para la

cuantificación del ARNm por qPCR y para la identificación de las isoformas de Oct-2 mediante PCR (apartado 4.1 de la presente sección).

3.3 Obtención y cuantificación de proteína

Las muestras congeladas de corteza cerebral de rata se homogeneizaron añadiéndoles un tampón de homogeneización formado por un cóctel inhibidor de proteasas con 0,1% de Nonidet P40 (Roche Holding AG; Basilea, Suiza) y sonicándolas durante 10-12 segundos (JP Selecta; Barcelona España).

Las muestras procedentes del cultivo de neuronas y células endoteliales, se recogieron mediante el raspado del pocillo con una solución de PBS con 1% de FBS (suero bovino fetal) y un *scraper* (Cultek; Madrid, España). Posteriormente se centrifugaron las muestras durante 10 minutos a 3000 rpm a 4 °C, se descartó el sobrenadante y se reservó el botón celular *opellet*. Para la extracción de proteína en estas muestras celulares, se procesaron se homogeneizaron los *pellets* utilizando un tampón de lisis compuesto por *Cell Lysis Buffer* al 10% (Cell Signaling Technology; Danvers, Massachusetts, EEUU), fluoruro de fenilmetilsulfonilo al 1% (PMSF, Fluka; Milwaukee, Wisconsin, EEUU) y agua Milli Q (Millipore, Merck KGaA; Darmstadt, Alemania). Se agitaron las muestras mediante vórtex durante 10-15 segundos y se dejaron en reposo en hielo durante 5 minutos. Este paso se repitió 7 veces. Las muestras homogeneizadas se centrifugaron a 13000 g durante 10 minutos, a 4 °C y se recogieron los sobrenadantes que contienen la parte proteica en un tubo eppendorf limpio.

La cuantificación de la proteína total se realizó mediante el kit *Protein Assay* (Bio-Rad; Hercules, California, EEUU) basado en el método de Bradford¹⁷⁰ de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El método Bradford está basado en el cambio de color del colorante Coomassie brilliant blue G-250 en respuesta a diferentes concentraciones de

proteínas. Este compuesto interacciona con aminoácidos básicos (especialmente arginina) y aromáticos. Esta unión del colorante con las proteínas provoca un cambio en el máximo de absorción del colorante desde 465 a 595 nm. Por lo tanto, este método se basa en la propiedad del Azul Brillante de Coomassie G-250 de presentarse en dos formas con colores diferentes, rojo y azul. La forma roja se convierte en azul cuando el colorante se une a la proteína. Su principal ventaja es que resulta más rápido y fácil de emplear que otros métodos alternativos, y más sensible que la medida de absorbancia a 280 nm. Para determinar la concentración de proteína total presente en una muestra, este método requiere la preparación de una curva de calibrado utilizando una proteína patrón. Para este fin, en la presente tesis se empezó preparando una curva patrón de albúmina bovina en un rango de 0 - 400 µg/ml y se prepararon las diluciones de las muestras a cuantificar. A continuación se cargaron las muestras (de la curva patrón y las de estudio) en placas de fondo llano de 96 pocillos (Cultek; Madrid, España) y posteriormente se añadieron 200 µl del reactivo Bradford (proporcionado por el kit), previamente diluido 1/5 con agua. Después de 5 minutos de incubación a temperatura ambiente, se leyó la placa a 575 nm mediante un espectrofotómetro (Spectra Max 340PC, bioNova científica; Barcelona, España).

3.4 Obtención y cuantificación de extractos nucleares

El conjunto de proteínas y ácidos nucleicos presentes en el núcleo de las células se denomina extracto nuclear. La obtención de este tipo de muestras es útil para el estudio de las interacciones ADN-proteína y entre proteínas nucleares. En la presente tesis, utilizamos los extractos nucleares para el análisis de la actividad de unión de diferentes FTs y para el estudio de las interacciones entre FT-FT, debido a que los FTs son proteínas que actúan en el núcleo celular.

Los extractos nucleares se obtuvieron a partir de muestras de corteza cerebral de rata sometida a tMCAO congeladas (1.1.1), utilizando el *Nuclear extraction* kit (Marligen Biosciences;

Reutlingen, Alemania). Se siguió el procedimiento recomendado por el fabricante. Brevemente, se lisó el tejido con el buffer de lisis hipotónico del kit (que contiene inhibidor de proteasas, de fosfatasas, DTT y PMSF), la solución detergente del kit y un homogeneizador. Después de una serie de lavados y centrifugaciones se aisló el sobrenadante que contiene la parte citoplasmática. Finalmente después de incubar las muestras diluidas con los buffer de extracción completa 1 y 2, durante 30 minutos en hielo y vorteando cada 10 minutos se centrifugaron las muestras y se aisló el sobrenadante que contiene el extracto nuclear. Seguidamente, se cuantificaron las muestras mediante el kit *Protein Assay* (Bio-Rad; Hercules, California, EEUU) basado en el método de Bradford previamente explicado (apartado 3.3 de esta sección).

3.5 Obtención de cortes cerebrales de rata para inmunofluorescencia

Se obtuvieron cortes coronales de corteza cerebral de rata a partir del cerebro de las ratas sometidas a pMCAO (apartado 1.1.2 de la presente sección). Veinticuatro horas después de la pMCAO se anestesiaron (apartado 1.1 de la misma sección) las ratas del grupo control y del grupo pMCAO (n = 2 para cada grupo) y se fijaron con ρ -formaldehído al 4% en tampón fosfato tal y como se describió anteriormente¹⁷¹. Los cerebros fueron extraídos y fijados durante 4 horas en la misma solución de ρ -formaldehído a temperatura ambiente. A continuación se incubaron los cerebros en una solución crioprotectora de sucrosa al 30% durante 72 horas y se congelaron. Posteriormente se cortaron los cerebros congelados en secciones coronales seriadas de 40 μ m de espesor con un microtomo de deslizamiento (Leica SM200R, Leica Biosystems; Wetzlar, Alemania) y se guardaron en tubos con líquido anti-congelante (ver composición en Anexo V.I) a -20 °C, hasta su procesamineto para el análisis por inmunofluorescencia.

4 Análisis de la expresión génica a nivel de ARNm y proteína

4.1 Polymerase chain reaction (PCR)

A fin de caracterizar el FT Oct-2 en cerebro de rata en el contexto de la isquemia, se diseñaron diferentes pares de oligonucleótidos o *primers* (Tabla 9) con la finalidad de comprobar cuales de las diferentes isoformas del FT previamente predichas mediante *Ensembl* (apartado 2.2.1 de la presente sección) se expresaban. Se utilizaron las muestras de ADNc obtenidas de corteza cerebral de rata isquémica y control (apartado 3.2 de esta sección) para amplificar las distintas isoformas mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

La PCR es una técnica de biología molecular que permite la rápida replicación del ADN. Con la PCR, cantidades mínimas de material genético pueden ser amplificadas millones de veces en pocas horas permitiendo su rápida detección. La PCR permite la síntesis enzimática de secuencias de ADN definidas y se utiliza para amplificar un fragmento de ADN situado entre dos regiones de secuencia conocida (ADN molde). La reacción utiliza dos oligonucleótidos (*primers*) como cebadores, cuyas secuencias son complementarias a las cadenas opuestas del ADN molde y flanquean la región de ADN a amplificar. La PCR está diseñada según el principio natural de replicación del ADN. Consiste en un proceso de tres pasos, designado como un ciclo, que se repite un número específico de veces. Un ciclo de PCR consiste en los siguientes pasos: la desnaturalización (se produce la separación de la doble hebra de ADN en dos filamentos), la hibridación (unión de los oligonucleótidos a la secuencia diana complementaria) y la extensión (la Taq ADN polimerasa cataliza la extensión de los *primers* de modo complementario. Se incorporan los nucleótidos). Todo este proceso tiene lugar en un termociclador, el cual controla automáticamente y alterna las temperaturas durante periodos programados de tiempo para el número apropiado de ciclos de PCR. En cada ciclo se produce una acumulación exponencial de fragmentos específicos de ADN, en los que cada nueva cadena actúa como ADN molde en el

siguiente ciclo. Al final de proceso se obtiene un número de moléculas de ADN 2^n , siendo n el nº de ciclos.

Para la correcta amplificación de las muestras de partida, es necesario diseñar correctamente los pares de oligonucleótidos. Para este fin, se alinearon (mediante el programa *ClustalW2*, apartado 2.2.2 de esta sección) las secuencias de las isoformas de estudio (obtenidas del *Ensembl*) y se seleccionaron los fragmentos únicos para cada isoforma, los cuales se sometieron al programa bioinformático *Primer3* (apartado 4.2.2.3 de esta sección). Para el diseño óptimo de los cebadores se tuvieron en cuenta las siguientes consideraciones: que los *primers* tuvieran una longitud entre 17-28 pares de bases (pb) (la longitud del primer sigue la fórmula empírica $n=18$ más 1 base extra por cada 2% de bajada respecto al 50% G+C), que el contenido de G+C fuera alrededor del 40-60% (porcentajes elevados de A+T no hibridan correctamente), que las temperaturas de fusión (T_m , del inglés *melting temperatura*) de los cebadores fueran similares, se comprobaron posibles homologías internas o adyacentes a la región a amplificar, entre el ADN molde y los cebadores o posibles hibridaciones entre o intracebadores que pudieran llevar a la formación de dímeros o estructuras secundarias. Se comprobaron los 10 últimos nucleótidos de los *primers* (extremo 3') que es donde se inicia la hibridación. Esta zona debe tener una composición equilibrada en G+C.

En la presente tesis, las condiciones de la reacción de PCR consistieron en una primera fase de pre-desnaturalización a 95 °C durante 5 min, seguida de 35 ciclos de 30-60 segundos de desnaturalización a 95 °C, 30-60 segundos hibridación a la T_a de *annealing* de cada pareja de *primers* determinada empíricamente y 30-60 segundos de extensión a 72 °C. Finalmente se realiza una extensión final a 72 °C entre 5 y 30 minutos según la longitud del fragmento a amplificar. La reacción se preparó mezclando en un tubo eppendorf 150 ng de muestra de ADNc, 10 µl de Eppendorf 2.5X Master Mix (Promega Corporation; Madison, Wisconsin, EEUU) que corresponde a una concentración final en la reacción de 1.25 U Taq ADN Polymerase, 50 mM KCl, 30 mM Tris-HCl, 1.5 mM Mg^{2+} , y 200 µM de cada desoxirribonucleótido trifosfato (dNTP),

0,5 µl (10 µM) de cada primer y agua destilada hasta un volumen final de 25 µl. La reacción se colocó en el termociclador (Bio-rad; Hercules, California, EEUU) previamente programado con las condiciones de la reacción.

Posteriormente, 4 µl de los productos de amplificación se mezclaron con 5 µl de tampón de carga (Invitrogen, Life Technologies; Grand Island, Nueva York, EEUU) y analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1-2% (apartado 1.2.2.1.2.3 de esta sección). Los resultados se visualizaron mediante luz ultra violeta (UV) con un transiluminador (Gel-Doc, Bio-Rad; Hercules, California, EEUU).

Tabla 9. Oligonucleótidos sentido y anti-sentido (*forward* y *reverse*) utilizados para amplificar mediante PCR las diferentes variantes transcripcionales de Oct-2 en cerebro de rata control e isquémico. Los diferentes pares de cebadores fueron diseñados mediante el programa *Primer3*.

VARIANTE O ISOFORMA	PRIMER	SECUENCIA (5'-3')	FRAGMENTO AMPLIFICADO (pb)
F1LP95_RAT	OCT2_655F	GGGCGGAGACGCAAGAAGAGG	337
	OCT2_655R	CCTTGAGGGCTCGGGTTTGTG	
Pou2f2/Pou2f2-201	OCT2_002F	AACCCTGCCCTTACCAGCCTT	269
	OCT2_002R	AGGTCTGCGCTGCCACTTCACT	
F1LMF7_RAT	OCT2_651F	TATCCAAGGTGCGTGCTGCC	156
	OCT2_651R	TTCCCCGAAGACAGATGGTGATGAA	
F1LP97_RAT/Pou2f2-202	OCT2_649F	GGTTCATTCCAGCATGGGGGC	252
	OCT2_649R	ATCTGGGGAGGAGAGAGGCAGG	
F1LMZ3_RAT/Pou2f2-203	OCT2_678F2	AACCCCCAGAACAAAGCGTCCC	509
	OCT2_678R2	GCGTCGTTGAGCCACTTCTCCA	
F1M5D0_RAT	OCT2_776F	CCATTTCCCGTTCGAGGCC	107
	OCT2_776R	GGGCCTCCAGCCAGGCTCAC	

pb: pares de bases

4.2 Quantitative PCR (qPCR)

Para el estudio del perfil de expresión de diferentes genes de interés en las muestras de tejido cerebral de rata o en los cultivos celulares (RBMVEC y RN) se utilizó la técnica de PCR cuantitativa (qPCR). La qPCR, también conocida como PCR a tiempo real (RT-PCR o RT-qPCR) es

una variación de la PCR convencional que mide la amplificación mientras ocurre, pudiéndose determinar la concentración de partida. Mientras la PCR convencional se basa en la detección en el punto final de la reacción (cuando la reacción se ha completado), la qPCR se fija en la fase exponencial.

La qPCR contiene una molécula fluorescente (*reporter*) que permite monitorizar la acumulación de producto de PCR. A medida que la cantidad del amplicón diana aumenta, la cantidad de fluorescencia emitida por el fluoróforo también aumenta. Estos fluorocromos pueden ser no específicos (SYBR® Green) o bien sondas moleculares dependientes de secuencia. En la presente tesis hemos analizado la expresión a nivel de ARNm realizando la cuantificación relativa de los genes de interés mediante ensayos de expresión génica TaqMan® (TaqMan® Gene Expression Assay, Applied Biosystems, Life Technologies; Grand Island, Nueva York, EEUU). Estos ensayos están constituidos por un par de oligonucleótidos y una sonda molecular dependiente de secuencia (llamada sonda TaqMan). Las sondas TaqMan (Figura 10) se componen de un fluoróforo (en nuestro caso FAM™), denominado *reporter*, unido al extremo 5' de la sonda y en el extremo 3' un extintor o *quencher* no fluorescente y un ligando de unión al surco menor (del inglés *minor groove binder*, MGB) que aumenta la T_m de la sonda sin aumentar su longitud y estabiliza los híbridos sonda-diana. El *quencher* secuestra (apaga) la fluorescencia emitida por el fluoróforo mientras están próximos, es decir, unidos a la sonda.



Figura 10. Componentes de la sonda TaqMan utilizada para la qPCR. Las propiedades del *quencher* (Q) combinadas con la corta longitud del ligando de unión al surco menor (MGB) proporciona una menor señal de fondo que aumentan la sensibilidad y la precisión en los datos, comparado con otras sondas (non-MGF/NFQ). F: fluoróforo; Q ó NFQ: *non-fluorescent quencher*; MGB: ligando de unión al surco menor (del inglés *minor groove binder*). Adaptada de http://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/brochures/cms_085696.pdf.

Las secuencias de las sondas TaqMan están diseñadas para que sean complementarias a una zona del ADN diana contenida en la región amplificada por el par de cebadores específicos del ensayo. A medida que la Taq polimerasa extiende el iniciador y sintetiza la nueva hebra, la actividad exonucleasa 5' - 3' de la polimerasa promueve la degradación de la sonda Taqman (sólo las que están unidas a la secuencia de ADN complementaria) y la liberación del fluoróforo de la misma, permitiendo la emisión de fluorescencia al romper el efecto inhibitor del *quencher*, de forma que, a mayor cantidad de producto mayor fluorescencia se emitirá. La fluorescencia emitida se detecta por el sistema de detección del equipo (Figura 11).

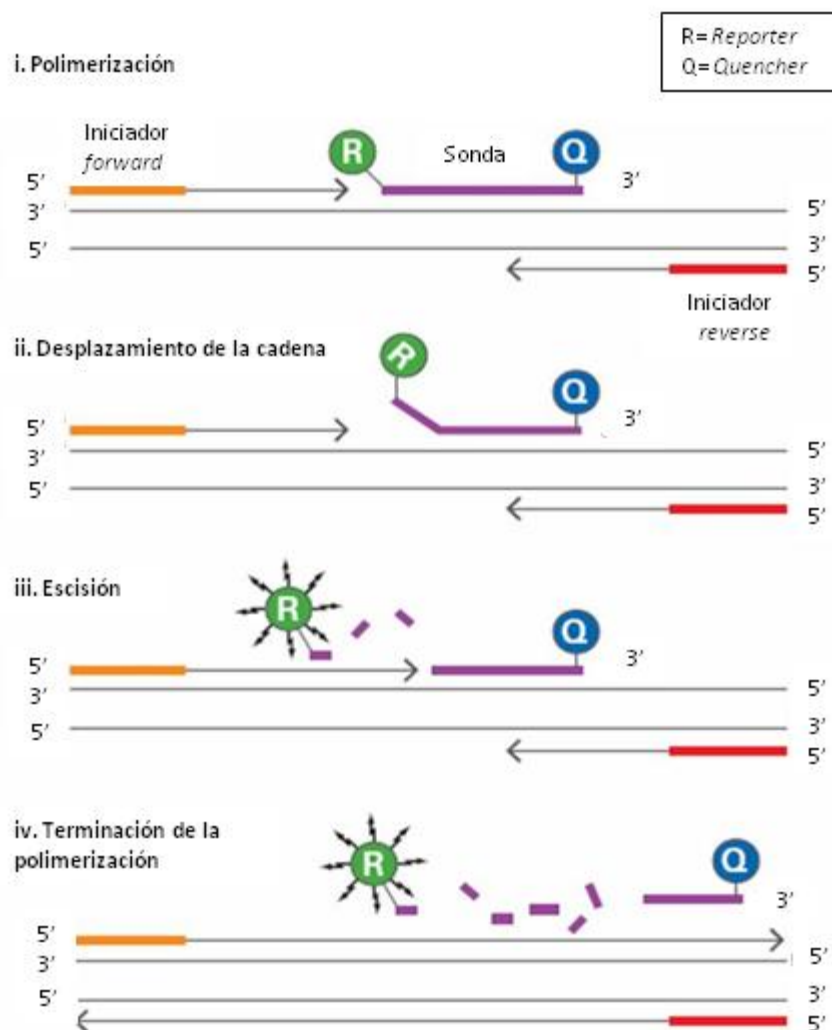


Figura 11. Esquema del comportamiento de los ensayos de expresión TaqMan® (constituidos por un par de cebadores y una sonda TaqMan) durante un ciclo de amplificación por qPCR. *Forward*: iniciador que avanza ‘adelante’ siguiendo la hebra sentido. *Reverse*: iniciador que avanza en sentido opuesto al *forward*. Figura adaptada de la web http://www.asuragenservices.com/Services/services/gene_expression/ab_taqman.aspx

En la qPCR, durante la fase exponencial el equipo calcula dos valores: 1) el umbral (o *Threshold*) que es el nivel de detección en el que la reacción alcanza una intensidad de fluorescencia por encima del *background* y 2) el C_T , que es el ciclo de PCR en el que la muestra alcanza el umbral de fluorescencia o *threshold*. Este valor de C_T se utiliza tanto en la cuantificación relativa como absoluta. Así pues, durante la amplificación se detecta la cantidad de fluorescencia producida en cada ciclo de PCR y se registra el número de ciclos necesarios para generar un umbral mínimo de fluorescencia (*Cycle Threshold, C_T*), el cual se establece en un punto de la fase de crecimiento exponencial de la curva de fluorescencia, antes de que se llegue a la fase *plateau* que corresponde a la saturación de la reacción de PCR. El valor C_T es proporcional a la cantidad inicial de moléculas de ARN en la muestra y permite la cuantificación, cuanto menor sea el valor C_T mayor cantidad del gen de interés hay en la muestra (Figura 12).

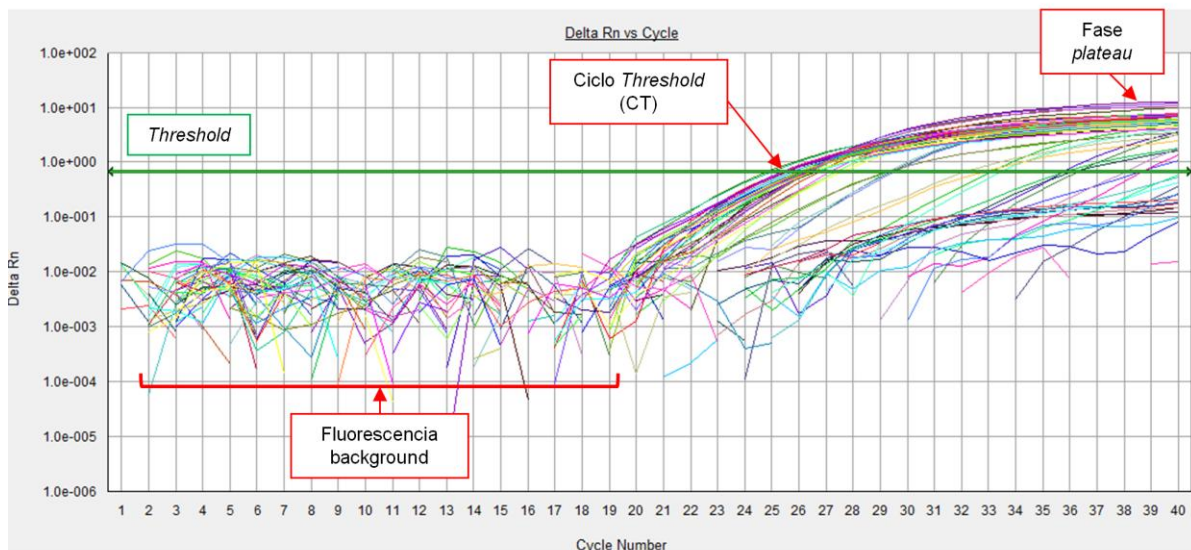


Figura 12. Ejemplo de gráfica de amplificación del ADNc obtenida por qPCR, dónde se indican diferentes parámetros necesarios para la cuantificación de la expresión. En cada ciclo de amplificación se cuantifica la fluorescencia y se registra el número de ciclos necesarios para generar una fluorescencia umbral o *Threshold*. El ciclo umbral o CT es el número del ciclo de la PCR en el que ΔRn corta el umbral en la gráfica de amplificación. La fluorescencia que se emite por debajo de este valor es la fluorescencia de fondo o *background*). El momento en que se produce la saturación de la reacción de PCR se denomina fase *plateau*. ΔRn : intensidad normalizada del fluorocromo *reporter* con línea basal corregida frente al ciclo.

Las reacciones se prepararon en un volumen final de 25 μ l que contenía 11,25 μ l de ADNc (apartado 3.2 de esta sección) diluido en agua destilada (10 pg-100 ng), 1,25 μ l del ensayo

específico TaqMan® Gene Expression Assay (Applied Biosystems, Life technologies; Grand Island, Nueva York, EEUU) (ver Tabla 7) y 12,5 µl de TaqMan® Gene Expression Master Mix (Applied Biosystems, Life technologies; Grand Island, Nueva York, EEUU) que contiene AmpliTaq Gold® ADN Polymerasa ultra pura, uracil-ADN glicosilasa (UDG), dNTPs con dUTP, ROX™ *Passive Reference* (control interno para normalizar la señal del *reporter* durante el análisis de los datos) y el buffer optimizado por la casa comercial.

Después de preparar y cargar las diferentes reacciones en la placa de qPCR (*MicroAmp optical 96-well reaction plate* de Applied Biosystems, Life technologies; Grand Island, Nueva York, EEUU), se mezcló vorteadando y tras realizar un pulso de centrifuga a la placa se introdujo en el equipo ABI PRISM® 7000 *Sequence Detection System* (Applied Biosystems, Life technologies; Grand Island, Nueva York, EEUU). Todo el proceso de preparación se realizó manteniendo las reacciones en hielo hasta el momento de introducirlas en el equipo. El ciclo de amplificación consistió en: 2 minutos a 50 °C (fase de activación de la uracil-ADN glicosilasa (UDG), la cual previene la reamplificación de los productos de PCR eliminando el uracilo de de los amplicones¹⁷², 10 minutos a 95 °C (fase de desnaturalización del molde) seguida por 40 ciclos a 95 °C durante 15 segundos y 60 °C durante 1 minuto.

4.2.1 Selección y diseño de ensayos de expresión TaqMan

En la presente tesis se han utilizado ensayos de expresión génica específicos para cada gen o isoforma de estudio. En la mayoría de los casos se obtuvieron comercialmente a través Applied Biosystems. Los ensayos se seleccionaron a través de la web introduciendo el nombre del gen de interés y obteniendo un mapa de alineamiento con todas las sondas disponibles y los transcritos analizados con cada una de ellas. En la Tabla 7, se recogen los ensayos TaqMan utilizados en esta tesis. El prefijo del nombre del ensayo indica la especie para la que se ha diseñado el ensayo: Hs (para *Homo sapiens*), Mm (para *Mus musculus*) y Rn (para *Rattus norvegicus*) y el sufijo indica la localización del ensayo en el gen diana, principalmente “_m” (la

sonda se hibrida sobre la zona de unión entre exones), y “_s” (la sonda y los cebadores están diseñados dentro de un solo exón por lo que pueden detectar ADN genómico). En la presente tesis, siempre que fue posible, se seleccionaron las sondas “_m”, ya que evitan la detección de ADN genómico, y por lo tanto aseguran la obtención de un producto de amplificación puro. Después de seleccionar el ensayo online, se comprobó la especificidad de éste mediante programa *ClustalW2* (apartado 2.2.2 de la presente sección).

En otros casos, sin embargo, debido a la ausencia de un ensayo específico disponible comercialmente, fue necesario diseñarlos. Para este fin se utilizó el servicio *Custom TaqMan® Assay Design Tool*, disponible a través de la página web de Applied Biosystems (Applied Biosystems, Life Technologies; Grand Island, Nueva York, EEUU) (ver apartado 2.3 de la presente sección).

4.2.2 Controles endógenos

En la presente tesis, para la cuantificación de la expresión génica a nivel de ARNm, realizamos una cuantificación relativa por qPCR. Se denomina cuantificación relativa si se compara la cantidad del ARNm de un gen específico respecto a la cantidad de ARNm de un gen constitutivo (llamado control endógeno) cuya expresión no varía en las condiciones del experimento. Es lo que se denomina normalización de la expresión del gen específico, ya que si la expresión del control endógeno varía es debido a cambios en la cantidad de ARN total empleada en la síntesis de ADNc, no a cambios en su expresión. La selección de los controles endógenos es crucial para la normalización de los resultados de cuantificación relativa de la expresión génica. Esta selección es aún más importante en aquellas situaciones en las que la expresión génica está severamente afectada, como ocurre después de la isquemia cerebral, y debe validarse en cada condición experimental analizada. En la presente tesis, para la normalización de la expresión génica a nivel de ARNm de muestras de tejido cerebral isquémico de rata y de muestras de cultivos celulares transfectados con siRNA, se utilizaron los endógenos

previamente establecidos por nuestro grupo ¹⁷³: *Tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, zeta polypeptide* (Ywazh), *Succinate dehydrogenase complex, subunit A, flavoprotein* (Sdha) y *Hypoxanthine phosphoribosyltransferase* (Hprt). Para el modelo de POG en RBMVEC optimizado en la presente tesis, fue necesario realizar un estudio de estabilidad para encontrar los genes endógenos óptimos.

4.2.2.1 Evaluación de la estabilidad de genes endógenos en el modelo de POG optimizado en las RBMVEC

Una vez optimizado el modelo de POG en las RBMVEC, se procedió a la valoración del mejor control endógeno (ver definición en 4.2.2 de esta sección), con el fin de seleccionar el/los genes endógeno/s con una expresión estable (sin diferencias significativas en la expresión génica en las muestras de estudio) en el modelo establecido en la presente tesis. Para este fin se utilizó la técnica de PCR cuantitativa (qPCR, apartado 4.2 de esta sección) utilizando los ensayos de expresión génica correspondientes contra los potenciales genes endógenos analizados: *Ribosomal Protein L13A* (Rpl13a), *18S rRNA* (18S), *β 2-microglobulin* (β 2m), *Hypoxanthine phosphoribosyltransferase* (Hprt), *Tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, zeta polypeptide* (Ywhaz), *Peptidyl-prolyl cis-trans isomerasa A* (Ppia), *Peptidyl-prolyl cis-trans isomerasa B* (Ppib), *Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase* (Gapdh), *Succinate dehydrogenase complex, subunit A, flavoprotein* (Sdha). Para este estudio las RBMVEC se sembraron en placas de 6 pocillos tratadas para el cultivo celular (Cultek, Madrid, España) previamente recubiertas con *Cell Attachment* (Cell Applications; San Diego, California, EEUU) a una densidad de 200000 células/pocillo. La evaluación de la estabilidad génica de potenciales genes endógenos es un paso esencial para seleccionar el gen de referencia o gen normalizador que se utilizará durante el análisis de la expresión génica relativa por qPCR en un modelo específico. Este estudio nos permitió establecer las bases para la correcta cuantificación de la expresión a nivel de ARNm de cualquier gen en el modelo de POG en RBMVEC.

Tabla 10. Ensayos de expresión TaqMan de Applied Biosystems específicas. Las sondas “*custom*”, hacen referencia a aquellas que han sido diseñadas en esta tesis para cuantificar la expresión génica de isoformas concretas. “Rn”: *Rattus norvegicus*; “_m1”: sonda localizada en la unión entre dos exones; “_s1”: *primers* y sonda localizados dentro de un exón.

ARNm DIANA	REFERENCIA DEL ENSAYO	ARNm DIANA	REFERENCIA DEL ENSAYO
HMG1Y	Rn00595021_m1	Ywhaz	Rn00755072_m1
OCT-2_Iso 002	OCT2_8002-02s1 (custom)	Hprt	Rn01527840_m1
OCT-2_Iso 649	OCT2_649-49s1 (custom)	Rpl13a	Rn00821946_g1
OCT-2_Iso 655	OCT2_651-51s1 (custom)	18S	Hs99999901_s1
OCT-2_Iso 678	OCT2_678-78s1 (custom)	B2m	Rn00560865_m1
ANGPT-1	Rn00585552_m1	Ppia	Rn00690933_m1
VEGFA	Rn01511601_m1	Ppib	Rn03302274_m1
Sdha	Rn00590475_m1	GAPDH	Rn01775763_g1

4.2.3 Método de cuantificación relativa de la expresión génica

Tal y como hemos comentado anteriormente, la fluorescencia emitida por las sondas de expresión Taqman es captada por el sistema de detección del equipo el cual realiza una gráfica de amplificación de PCR a tiempo real. A partir de ésta gráfica se fija el *Threshold* (umbral en el que se produce un cambio significativo en la fluorescencia) y se determina el C_T o ciclo umbral, que es el punto de corte entre el umbral y la curva de amplificación en la fase exponencial. Para una cuantificación óptima los valores de C_T deben de estar entre 10-35. Para la cuantificación de la expresión se utilizó el método del $2^{-\Delta\Delta CT}$ (descrito por K. Livak et al), en el que se comparan directamente los C_T s del gen testado y gen de referencia (ΔC_T) en cada muestra, y posteriormente se comparan los ΔC_T de las muestras experimentales con respecto a la muestra control (es decir el control no isquémico) ($\Delta\Delta CT = (C_{T, \text{gen estudio}} - C_{T, \text{gen referencia}})_{\text{tiempo x}} - (C_{T, \text{gen estudio}} - C_{T, \text{gen referencia}})_{\text{tiempo 0}}$; dónde el tiempo x es cualquier tiempo y el tiempo 0 representa la expresión 1x del gen de estudio normalizado con el gen de referencia^{173,174}). Para aplicar dicho método es necesario que las eficiencias de amplificación de ambos genes sean similares. Debido a que se utilizaron ensayos de expresión génica TaqMan (tanto para los genes de estudio como

los genes endógenos), los cuales han sido validados con una eficiencia de PCR cerca del 100%, este tipo de cuantificación fue posible. Todas las muestras se testaron por triplicado y se calcularon los valores medios.

4.2.4 Preamplificación del ADNc

En la cuantificación de la expresión de un gen mediante qPCR, cuando nos encontramos ante valores de C_T mayores a 35, o bien cuando disponemos de pequeñas cantidades de ADNc de partida (1-250 ng), es necesario preamplificar la muestra. La preamplificación permite aumentar la cantidad de ADNc del gen diana específico para el posterior análisis de la expresión génica Taqman. Después de aumentar el material de partida, el producto resultante de la preamplificación se utiliza para la qPCR.

Para el correcto análisis de la expresión de la isoforma ENSRNOT00000046678 (Pou2f2-203) en las muestras de corteza cerebral de rata, fue necesario preamplificar todas las muestras para este transcrito debido a que por el método convencional (sin preamplificar) se obtuvieron ciclos de amplificación (CT) mayores a 35. Para este fin se utilizó la TaqMan PreAmp Master Mix (Applied Biosystems, Life Technologies; Grand Island, Nueva York, EEUU) y se siguieron las instrucciones del fabricante. Brevemente, se inició el protocolo preparando una mezcla o 'pool' de los ensayos de expresión TaqMan® 20X: OCT-2_Iso 678 (OCT2_678-78s1 (custom)), Sdha (Rn00590475_m1), Ywhaz (Rn00755072_m1) y Hprt (Rn01527840_m1) (TaqMan® Gene Expression assays, Applied Biosystems, Life Technologies; Grand Island, Nueva York, EEUU) en un tubo de microcentrífuga. Se combinaron volúmenes iguales de cada ensayo de expresión y se diluyeron con tampón TE 1X (Ambion, Life Technologies; Grand Island, Nueva York, EEUU), de modo que la concentración final del ensayo de expresión fuese 0,2X. A continuación se preparó la reacción de preamplificación mezclando (por cada muestra) 25 µl de TaqMan *PreAmp Master Mix* 2X (suministrado por el kit), 12,5 µl del *pool* de ensayos de expresión 0,2X y 12,5 µl de 1-250 ng de ADNc (obtenidos del apartado 3.2 de esta sección), en una placa de qPCR (*MicroAmp*

optical 96-well reaction plate de Applied Biosystems, Life technologies; Grand Island, Nueva York, EEUU). Finalmente se cargaron las muestras en el termociclador (Bio-Rad; Hercules, California, EEUU) previamente programado: 10 minutos a 95 °C para la activación enzimática y 14 ciclos de preamplificación que consistieron en 15 segundos a 95 °C (desnaturalización) y 4 minutos a 60 °C (hibridación y extensión).

Una vez preamplificadas las muestras, estas fueron directamente analizadas por qPCR para el estudio de la expresión de los genes de interés. Cuando las muestras proceden de ADNc preamplificado, la mezcla de reacción de qPCR es ligeramente diferente comparado con el utilizado con el resto de muestras de ADNc (no pre-amplificadas). En este caso, en cada reacción se utilizaron 6,25 µl de ADNc preamplificado (previamente diluido 1:20 con tampón TE 1X), 1,25 µl de TaqMan *Gene Expression Assay* (Applied Biosystems, Life technologies; Grand Island, Nueva York, EEUU), 12,5 µl de TaqMan *Gene Expression Master Mix* (Applied Biosystems, Life technologies; Grand Island, Nueva York, EEUU) y 5 µl de agua libre de nucleasas. Finalmente, una vez cargadas las muestras en la placa de qPCR (*MicroAmp optical 96-well reaction plate* de Applied Biosystems, Life technologies; Grand Island, Nueva York, EEUU) ésta se transfirió al equipo ABI PRISM® 7000 *Sequence Detection System* (Applied Biosystems, Life technologies; Grand Island, Nueva York, EEUU) siguiendo el programa de qPCR previamente comentado (ver apartado 4.2 de esta sección).

4.2.5 TaqMan® Gene Expression Cells-to-CT™ Kit

Una de las limitaciones en el análisis de la expresión génica cuando trabajamos con muestras pequeñas, es la pérdida de ARN durante su proceso de extracción. En estos casos es útil utilizar el ensayo TaqMan® *Gene Expression Cells-to-CT™* (Applied Biosystems, Life Technologies; Grand Island, Nueva York, EEUU), el cual permite analizar la expresión génica a partir de una baja densidad celular, siguiendo un esquema de trabajo similar que en la qPCR. Concretamente, este test permite realizar la retrotranscripción a partir de lisados de cultivos

celulares (de $10\text{-}10^5$ células) sin la necesidad de realizar la purificación de ARN y posteriormente se puede analizar la expresión génica llevando a cabo la qPCR directamente sobre la placa. De este modo se acelera y simplifica el análisis de la expresión génica en las células cultivadas en placas de 96 pocillos.

En primer lugar se realizó la lisis celular. Partimos del cultivo de RBMVEC control y sometidas a POG (apartado 1.2.2.1 de esta sección) en placas de 96 pocillos (Cultek, Madrid, España). Después de un lavado del cultivo con PBS frío, se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente el cultivo celular con 50 μl de *Lysis Solution* (incluida en el kit) que contenía ADNsa diluida a 1:100. Para parar la reacción se incubaron las muestras con 5 μl de *Stop Solution* (incluida en el kit) durante 2 minutos a temperatura ambiente. A continuación, por cada muestra se mezclaron 10 μl de lisado celular con 40 μl de RT Master Mix (25 μl *RT Buffer 2X*, 2,5 μl *RT Enzyme Mix 20X*, 12,5 μl agua libre de nucleasas), se distribuyeron las muestras en los tubos de reacción y se cargaron en el termociclador (Bio-Rad; Hercules, California, EEUU) previamente programado (60 minutos a 37 °C para iniciar la reacción de retrotranscripción, 5 minutos a 95 °C para inactivar la reacción e indefinidamente a 4 °C para conservar la reacción) para la obtención de ADNc a partir del lisado celular. Posteriormente se preparó el cóctel de PCR que contenía por cada muestra: 10 μl de TaqMan® *Gene Expression Master Mix 2X*, 1 μl de TaqMan® *Gene Expression Assay 20X* y 5 μl de agua libre de nucleasas, se distribuyeron 16 μl de cóctel en los pocillos de una placa de qPCR (*MicroAmp optical 96-well reaction plate* de Applied Biosystems, Life technologies; Grand Island, Nueva York, EEUU) y se añadieron 4 μl de ADNc de cada muestra retrotranscrita. Finalmente, se mezcló y tras un pulso de centrifuga se cargó la placa en el equipo de qPCR (*ABI PRISM® 7000 Sequence Detection System*, Applied Biosystems, Life technologies; Grand Island, Nueva York, EEUU) previamente programado. La reacción de qPCR consistió en 2 minutos a 50 °C para la incubación de la uracil ADN glycosylase (UDG), seguido de 10 minutos a 95 °C para la activación de la enzima Taq ADN polimerasa, 40 ciclos de 15 segundos a 95 °C para la amplificación por PCR y 1 minuto a 60 °C para la finalización.

4.3 Análisis de proteínas por inmunotransferencia: Western blot (WB)

Para la determinación de la expresión génica a nivel proteico, se analizaron las muestras por Western blot. Ésta técnica utiliza la electroforesis en gel para separar proteínas según un determinado criterio (peso molecular, estructura, hidrofobicidad, etc), que posteriormente son transferidas a una membrana absorbente para la detección por actividad enzimática de la proteína de interés mediante la unión específica de anticuerpos. En la presente tesis se utilizó la electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE: *polyacrylamide gel electrophoresis*) en presencia del detergente aniónico dodecilsulfato sódico (SDS). En ésta técnica (SDS-PAGE) las proteínas sufren un tratamiento por agentes reductores que provocan la pérdida de las estructuras secundaria y terciaria y mantiene los polipéptidos en este estado desnaturalizado. De este modo, la estructura tridimensional de las proteínas no influye en la electroforesis, y pueden separarse únicamente en función del tamaño.

Por este motivo se inició la técnica preparando un gel de poliacrilamida constituido por un gel acumulador o *stacking* (en el cual las muestras correrán libremente y se apilarán) y un gel separador (en el cual las muestras empezarán a separarse según su tamaño proteico) (ver composición en Anexo IV). Una vez polimerizado, el gel de poliacrilamida forma una matriz tridimensional, con un tamaño de poro determinado dependiendo del porcentaje de acrilamida del gel. Dependiendo del peso molecular de la proteína de estudio utilizaremos un porcentaje u otro del gel de poliacrilamida. En la presente tesis los geles separadores se prepararon al 10%.

Mientras los geles polimerizaban, se prepararon las muestras obtenidas del apartado 3.3 de la presente sección. Se mezclaron los lisados de tejido cerebral de rata (60 µg) o lisados celulares (5-10 µg) con cóctel de homogeneización y Laemmli (Anexo IV.B) y después de centrifugar las mezclas con un pulso de centrífuga, se hirvieron durante 5 minutos a 95 °C en un termo-bloc (JP Selecta; Barcelona España). A continuación se cargaron las muestras en el gel de poliacrilamida previamente montado en el tanque del Mini Trans Blot (Bio-Rad; Hercules,

California, EEUU) con el tampón de electroforesis 1X (Anexo IV.C) y se procedió a la separación por tamaño de las muestras proteicas por electroforesis (100-150V durante 45 minutos-1 hora)^{144,152}. Como marcador de peso molecular de proteínas se utilizó *Precision Plus Protein™ Kaleidoscope™ Standards* (Bio-Rad; Hercules, California, EEUU).

Tras la electroforesis, se realizó la transferencia de las proteínas del gel de poliacrilamida a una membrana de fluoruro de polivilideno (PVDF) (GE Healthcare; Little Chalfont, Gran Bretaña). En primer lugar se equilibró el gel en tampón de transferencia 1X (Anexo IV.D) durante 10 min y se montó el 'sandwich' en el soporte de transferencia del equipo (*cassette*), colocando los distintos elementos apilados en el siguiente orden (del ánodo al cátodo) y evitando la formación de burbujas de aire: esponja empapada en tampón de transferencia, papel absorbente Whatman empapado de tampón de transferencia 1X, el gel de poliacrilamida corrido en la electroforesis (sin el gel apilador), la membrana de PVDF (previamente hidratada con agua y activada con metanol), otro papel Whatman y otra esponja empapada de tampón de transferencia. A continuación se cerró el cassette y colocó el *sandwich* en la cubeta del Mini Trans Blot (Bio-Rad; Hercules, California, EEUU) con el tampón de transferencia frío y en agitación. La cubeta se colocó en hielo y se conectó a la fuente de electroforesis para iniciar el proceso (1 hora a 400 mA).

Tras completar la transferencia se incubó la membrana con los anticuerpos. Para ello se saturó la membrana incubándola con leche en polvo diluida en PBS durante 1 hora a 4 °C (bloqueo). Seguidamente, se incubó la membrana a 4 °C durante toda la noche con el anticuerpo primario específico (Tabla 11). Posteriormente, se lavó la membrana con PBS al 0,1% de Tween (Bio-Rad; Hercules, California, EEUU) y se incubó 1 hora con el anticuerpo secundario correspondiente. Según la especie origen del anticuerpo primario se utilizó el anticuerpo contra IgG de conejo de origen cabra unido al enzima horseradish peroxidasa (HRP) (1/5000; sc-2004; Sta Cruz Biotechnology; Santa Cruz, California, EEUU) o el anticuerpo contra IgG de ratón de origen cabra conjugado a HRP (1/10000; 401215; Calbiochem, Merck KGaA; Darmstadt,

Alemania). Durante el la inmunodetección, el anticuerpo primario reconoce los puntos antigénicos presentes en la membrana, y el secundario reconoce la cadena pesada del primario. Este segundo anticuerpo va conjugado al enzima HRP que permite la localización de los puntos de la membrana donde se ha unido el primero.

Finalmente, para la detección proteica, las membranas se revelaron con el sustrato quimioluminiscente *SuperSignal West Pico* (Thermo Fisher Scientific; Waltham, Massachusetts, EEUU) o *Immobilon™ Western* (Millipore, Merck KGaA; Darmstadt, Alemania) que reaccionó con la enzima peroxidasa del anticuerpo secundario. En función de la concentración de la proteína en la muestra de estudio, se utilizó un kit u otro, siguiendo las instrucciones del fabricante. Como control de carga de muestra se utilizó la β -actina (Santa Cruz Biotechnology; Santa Cruz, California, EEUU).

Tabla 11. Anticuerpos primarios utilizados para la detección de proteínas mediante Western blot (WB) y/o inmunofluorescencia (IF).

Proteína	Dilución	Origen	Fabricante
HMG1Y	1:1000 (WB) 1:250 (IF)	Conejo	Abcam; Cambridge, Reino Unido
ANGPT-1	1:200 (WB)	Conejo	Santa Cruz Biotechnology; Santa Cruz, California, EEUU
VEGF	1:200(WB)	Conejo	Santa Cruz Biotechnology; Santa Cruz, California, EEUU
OCT-2	1:200 (WB) 1:50 (IF)	Conejo	Santa Cruz Biotechnology; Santa Cruz, California, EEUU
RECA-1	1:20 (IF)	Ratón	Santa Cruz Biotechnology; Santa Cruz, California, EEUU
NEUN	1:100 (IF)	Ratón	Millipore, Merck KGaA; Darmstadt, Alemania
GFAP	1:500 (IF)	Ratón	Millipore, Merck KGaA; Darmstadt, Alemania

4.4 Inmunofluorescencia de tejido cerebral

4.4.1 Procesamiento de cortes cerebrales para inmunofluorescencia

Para el análisis de la localización subcelular de los FTs objeto de estudio en cerebro de rata, se utilizó la técnica de la inmunofluorescencia. A partir de los cortes de corteza cerebral de rata obtenidos en el apartado 4.3.5, se seleccionaron secciones homólogas de cada grupo (control y pMCAO) y se procesaron para inmunofluorescencia. Para este fin, después de lavar las muestras con el tampón 1 (ver Anexo V.B) se realizó el desmascaramiento (rotura de las uniones inter/intra proteicas inducidas por el agente fijador y que dificultan la correcta unión del antígeno con el anticuerpo), colocando cada sección en un frasco de cristal con tampón citrato (Anexo V.A) a 92 °C durante 10-15 minutos. A continuación se realizó la permeabilización y bloqueo de las muestras, incubando los cortes con la solución de bloqueo (Anexo V.C) durante 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente se incubaron los cortes durante toda la noche a 4 °C con los anticuerpos primarios contra la proteína de estudio y contra el marcador de tipo celular correspondiente. Para las proteínas de estudio se utilizaron anticuerpos de origen conejo, en cambio para las proteínas de tipo celular, anticuerpos de origen ratón. Como marcadores de tipo celular se utilizaron el anticuerpo contra el antígeno nuclear neuronal (NeuN, del inglés *neuronal nuclear antigen*), el anticuerpo contra el antígeno de célula endotelial de rata-1 (RECA-1, del inglés *rat endotelial cell antigen-1*) y el anticuerpo contra la proteína acídica fibrilar glial (GFAP, del inglés *Glial fibrillary acidic protein*) (ver Tabla 11) para la identificación de las células neuronales, las células endoteliales y los astrocitos, respectivamente. Posteriormente, después de lavar las muestras con el tampón 2 (ver Anexo V.B), se incubaron los cortes durante 2 horas a temperatura ambiente y en la oscuridad, con los anticuerpos secundarios correspondientes (anticuerpo de origen cabra contra IgG de conejo unido al fluoróforo Alexa Fluor 488, para la detección de la proteína de interés y anticuerpo de origen cabra contra IgG de ratón unido al fluoróforo Alexa Fluor 594, para la detección del tipo

celular) (Anexo V.D). Finalmente se procedió a la tinción con 4',6-Diamidino-2-Phenylindole, Dihydrochloride (DAPI) (incubando los cortes con el fluoróforo durante 1-3 minutos) para la identificación de los núcleos celulares, y al montaje de los cortes en el portaobjetos (Thermo Fisher Scientific; Waltham, Massachusetts, EEUU) con glicerol (Sigma; St Louis, Missouri, EEUU).

4.4.2 Obtención e interpretación de las imágenes

Para la obtención de las imágenes de inmunofluorescencia se utilizó el Sistema 855 Pathway BD (BD Biosciences; Franklin Lakes, Nova Jersey, EEUU). Este sistema permite obtener imágenes de células vivas y fijadas a partir de una óptica de precisión (objetivos contenidos en un disco giratorio deslizante) con mando de controles y un programa para la adquisición de imágenes y su análisis exhaustivo (BD Attovision™, BD Biosciences; Franklin Lakes, Nova Jersey, EEUU). Dispone de una lámpara de mercurio de larga vida y una iluminación libre de alineación que permiten proyectar imágenes en toda la gama de 340 nm a 750 nm. Además es posible seleccionar entre los 16 filtros de excitación diferentes, útiles para diferentes aplicaciones. Dispone de un ocular binocular a través del cual se pueden visualizar directamente las células en los dos modos de luz de fluorescencia y transmitida. Asimismo, el instrumento permite utilizar el modo confocal (z-stack) y el enfoque automático basado en láser, cuando se requiere un mayor control sobre la adquisición de las imágenes. El modo confocal permite reconstruir tridimensionalmente muestras a partir de la captura de planos ópticos de ésta mediante la excitación con láser. El uso del modo confocal evita el cruce de canales, proporcionando imágenes de alta resolución sin la fluorescencia de fondo y permite determinar la colocalización perfectamente.

En la presente tesis, las imágenes fueron capturadas a través de los diferentes canales para Alexa Fluor 488 (pseudo-color verde), Alexa Fluor 594 (pseudo-color rojo) y DAPI (pseudo-color azul) del Sistema 855 Pathway BD con el objetivo 20x (NA 075 Olympus). Mediante el programa BD Attovision™ y su aplicación confocal *z-stack* se obtuvieron las imágenes de zonas

cerebrales homólogas de los grupos de estudio (control y pMCAO), que permitieron comparar la localización y expresión de los FTs de estudio en los diferentes tipos celulares entre ambos grupos.

5 Selección y análisis de factores de transcripción implicados en isquemia cerebral y cerebroreparación

5.1 Selección de genes candidatos implicados en angiogénesis

Con el objetivo de identificar factores de transcripción implicados en los mecanismos de cerebroreparación en el ictus y concretamente en la regulación del proceso de angiogénesis, se inició el estudio buscando genes con acción pro- o anti angiogénica en el contexto de la isquemia cerebral, como posibles genes diana de los FTs objeto de estudio. Para este fin, se utilizó la base de datos bibliográfica PubMed (apartado 2.1.1 de esta sección) para la selección de genes:

- sobre-expresados en la zona subventricular con función angiogénica después del ictus
- reguladores de la estimulación, apoptosis y supervivencia de las células endoteliales
- implicados en la adhesión y supervivencia de las células endoteliales, y codificadores para proteínas de matriz extracelular.
- inhibidores de la angiogénesis.
- codificadores para factores de transcripción involucrados en angiogénesis.
- codificadores para genes tempranos reguladores de procesos de angiogénesis.

Los genes seleccionados en esta búsqueda bibliográfica, pasaron a denominarse genes candidatos.

5.2 Análisis bioinformático de las regiones promotoras de los genes candidatos

Después de la selección de los genes candidatos involucrados en angiogénesis, se procedió al análisis bioinformático de las regiones promotoras de dichos genes para encontrar FTs reguladores de estos. Para este fin se utilizaron las bases de datos *GenBank*, *Reference Sequence* (RefSeq) y *Protein Data Bank* (PDB) (apartados 2.1.2, 2.1.3 y 2.1.4 de esta sección) para la obtención de la secuencia promotora de los genes candidatos. Posteriormente, mediante el programa *PROMO* que utiliza la base de datos *TRANSFAC* (apartados 2.1.5 y 2.1.6 de la presente sección)^{160,175,176}, se identificaron los sitios de unión putativos para FTs (TFBS, del inglés *transcription factor binding site*) en las secuencias promotoras de los genes candidatos. Además, también se utilizó el programa *MpromoDB* para encontrar TFBS comunes entre diferentes genes candidatos, es decir, para identificar señales de regulación transcriptional comunes entre genes candidatos co-expresados.

5.3 Cuantificación de la actividad de unión de los factores de transcripción

Para la selección de FTs involucrados en isquemia cerebral se realizó un cribaje analizando el perfil de activación de diferentes FTs simultáneamente en muestras de corteza cerebral de rata. Para ello, se analizó la actividad de unión de 50 FTs diferentes (Tabla 12) mediante el ensayo *Multiplex Transcription Factor Profiling* (Marligen Biosciences; Rockville, Maryland, EEUU), el equipo *Luminex® 200™* y el programa *StarStation™* (*Luminex Corporation*; Austin, Texas, EEUU) para la adquisición de datos. El ensayo multiplex nos permite analizar múltiples FTs simultáneamente en la misma muestra. Este ensayo utiliza la tecnología *xMAP®* para detectar y cuantificar la unión específica de factores de transcripción a secuencias de ADN asociadas a microesferas de polistireno teñidas marcadas internamente con fluoróforos denominadas *beads*. Las secuencias de ADN se extraen de la base de datos *TRANSFAC* que contiene secuencias

de unión para proteínas (<http://www.gene-regulation.com/pub/databases.html>). En el analizador del instrumento, los láseres excitan los fluoróforos internos que identifican a cada microesfera (específica para cada factor de transcripción de estudio) y al mismo tiempo capturan la señal del fluoróforo *reporter* que cuantifica las secuencias de unión a ADN de los factores de transcripción. Este ensayo es más sensible que un ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA, acrónimo del inglés *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*) o que un ensayo de retraso de la movilidad electroforética (EMSA, acrónimo del inglés *electroforetic mobility shift assay*)^{177,178}.

Tabla 12. Factores de transcripción analizados en el ensayo de la actividad de unión. Cincuenta factores de transcripción se analizaron simultáneamente con el kit *Multiplex Transcription Factor Profiling Assay*, para determinar su actividad de unión en muestras de cerebro de rata control y muestras de cerebro de rata sometida a isquemia (tMCAO).

FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN				
AP-1	E2F1-5	HNF-3	NFKB	STAT
AP-2	E2F6	HNF-4	NF61	SCREBP
AML-1	EGR	HFF-1	OCTAMER	SMAD 1/5
AP4	ER	ISRE	P53	SMAD 2/3
AR	ETS	MEF-2	PAX6	SP1
CRE-ATF	GATA	MTF1	PBX	SRE
C/EBP α	HFH2/3	C-MYB	PLZF	TGIF
C/EBP β	HIC-1	MYC-MAX	PPAR	TAL1
C/EBP γ	HIF	NFAT	SAF-1	TCF/LEF
CREB	HNF-1	NF-1	SOX9	YY1

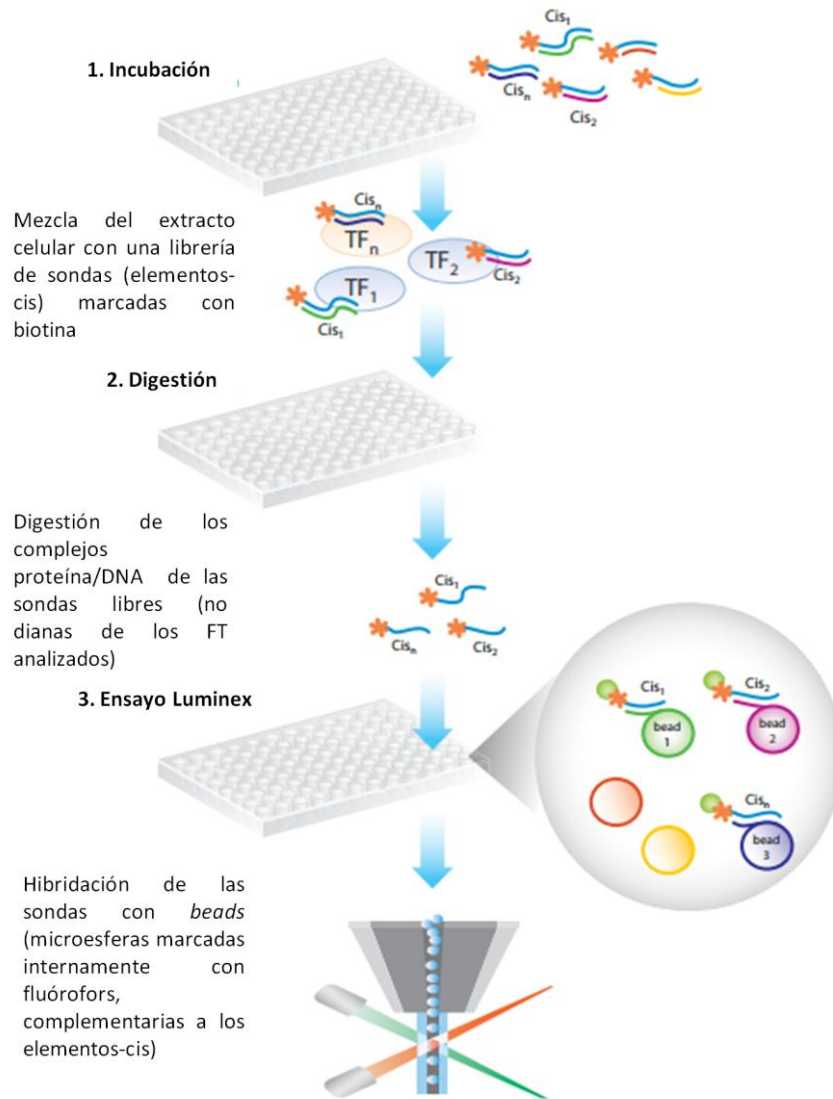


Figura 13. Esquema del protocolo del ensayo *Multiplex Transcription Factor Profiling*, que se utilizó para el análisis del perfil de activación de diferentes FTs en corteza cerebral de rata, con el fin de seleccionar FTs involucrados en isquemia cerebral. Figura adaptada de http://www.panomics.com/downloads/LUMINEX_V1.pdf.

5.3.1 Preparación de las muestras y puesta a punto del equipo Luminex

Este ensayo se llevó a cabo en extractos nucleares obtenidos de cerebros de ratas control y sometidas a tMCAO (apartado 1.1.1), ya que los FTs se unen a las zonas promotoras de los genes diana en el núcleo de las células.

Una vez descongelados los reactivos del ensayo a temperatura ambiente o en el baño a 37 °C (según corresponda), se encendió el equipo Luminex y se realizaron los ajustes correspondientes para su puesta a punto (un lavado con alcohol 70% y tres con agua

bidestilada) y su calibración (Calibrador CAL1, Calibrador CAL2, Control 1 y Control 2, Luminex Corporation; Austin, Texas, EEUU). Se diluyeron los extractos nucleares (10 µg) con el reactivo *Sample Diluent* (suministrado por el kit) para normalizar las muestras a la misma concentración (1,67 µg/µl) (manteniendo las muestras en hielo en todo momento). A continuación se realizaron las fases de unión 1 y 2, en las cuales se indujo la unión de los FTs a su secuencia de ADN diana de los extractos nucleares. En la fase de digestión se eliminaron las secuencias que no eran dianas de los FTs analizados (zonas 'desprotegidas' debido a la ausencia de la unión de FT-diana). Posteriormente se realizó la hibridación de la mezcla de microesferas (*Bead Mix*) y el extracto nuclear digerido mediante el *Hybridization Accelerator*. A continuación se transfirieron las muestras de la placa de reacción a una placa de filtro pre-hidratada (suministrada por el kit) mediante una bomba del vacío (Millipore, Merck KGaA; Darmstadt, Alemania) y se lavaron los pocillos añadiendo tampón de lavado y filtrando mediante la bomba. Finalmente, se añadió la solución de detección *Detection Mix* y después de lavar (filtrando mediante la bomba) se realizó la lectura y análisis de la actividad de unión con el equipo Luminex. Se utilizaron extractos nucleares de células HL-60 no tratadas y tratadas (24 h) con PMA/Ionomicina como controles de extracto nuclear. Como control positivo de la reacción del ensayo se utilizó un pocillo con *Sample Diluent* y *Digestion Buffer* que ofreció la máxima señal para cada sitio de unión, y como control negativo de la reacción, un pocillo con *Complete Digestion Buffer* que proporciona la señal de fondo o *background* para cada sitio de unión.

5.3.2 Análisis de la actividad de unión

La actividad de unión de los extractos nucleares de cerebro de rata se midió en intensidad de fluorescencia media (IFM). Para calcular la magnitud de la diferencia se utilizó un algoritmo basado en la mediana de los cuadrados mínimos (LMS, acrónimo del inglés *Least Median Squares*), que permite estimar la pendiente y la intersección de la línea que mejor se adapte a los puntos co-lineales. La significancia del cambio se representó con Dev F, que es la ratio de la diferencia entre el valor de IFM de las muestras tratadas (isquémicas) y el valor esperado

respecto a la suma de las desviaciones estándares de las muestras tratadas (isquémicas) y no tratadas (control). Un valor Dev F de dos o más se consideró significativo. Los valores de IFM en muestras control e isquémicas a distintos tiempos después de la reperusión se compararon en una gráfica de dispersión, donde cada punto representó un único FT o una familia de FTs. Los puntos situados de forma co-lineal o casi lineal, en la gráfica de dispersión, representaron TFs cuya actividad de unión permanece sin cambios respecto al control. Los puntos de datos que están más alejados de los puntos co-lineales, representan FTs que han cambiado su actividad de unión debido al tratamiento, en este caso, la isquemia cerebral (tMCAO).

5.4 Identificación de interacciones entre factores de transcripción FT-FT

Para identificar las interacciones de los FTs HMG1Y y OCT-2 con otros FTs y así determinar las vías de señalización y los procesos celulares en los que están implicados, se utilizó el kit *TranSignal Array™ TF-TF* versión I (Panomics; Redwood City, California, EEUU), según las instrucciones del fabricante (ver esquema del protocolo en la Figura 14). Este kit consiste en un método CHIP-array, basado en la combinación de la inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) y una técnica de alto rendimiento (el array). Estas dos técnicas acopladas permiten identificar y analizar de modo efectivo interacciones entre el FT objeto de estudio y 54 FTs diferentes (presentes en el array) mediante el uso de secuencias de ADN consenso (sondas de oligonucleótidos) que corresponden a secuencias diana conocidas de diferentes FTs (TFBS)¹⁷⁹. Este ensayo, generalmente consiste en cuatro fases distintas:

5.4.1 Preparación de complejos TF-ADN

Las muestras utilizadas en este ensayo fueron extractos nucleares (ver apartado 2.2.1) de tejido cerebral de rata control y sometida a tMCAO (n=3). Inicialmente, se mezclaron 30 µg de extractos nucleares con 10 µl de *TranSignal TF-TF Probe Mix* (cóctel de sondas de

oligonucleótidos de ADN de doble cadena marcados con biotina), 10 µl de Poly d(I-C), 15 µl de *Binding Buffer*, y 30µl de agua libre de ARNasas y se incubó la mezcla a 15 °C durante 30 minutos. Posteriormente se incubó 30 minutos más en hielo (4 °C). Durante esta incubación se permitió la unión de complejos FT del extracto nuclear-ADN de las sondas marcadas con biotina.

5.4.2 Pre-hibridación de la membrana

Antes de proceder con la inmunoprecipitación (IP), se realizó (por recomendación del fabricante) una pre-hibridación de la membrana del array. Para este fin, se colocó la membrana en un tubo de plástico cónico de 50 ml (tubo de hibridación), se humedeció con agua destilada y se dejó incubar en un horno de hibridación rotatorio (J&B Lab SAC; Perú) a 42 °C durante 2 horas, con 5 ml de *Hybridization Buffer* previamente calentado.

5.4.3 Inmunoprecipitación del FT y elución de las sondas

Las fases de inmunoprecipitación y elución consistieron en el aislamiento del FT de estudio juntamente con sus secuencias diana (sondas ADN marcadas) mediante el uso de un anticuerpo específico y la posterior elución de las secuencias diana.

Para iniciar la IP, se añadieron 2 µg del anticuerpo contra la proteína de estudio (anti-HMIGY: Abcam, Cambridge, Reino Unido y anti-Oct-2: Santa Cruz Biotechnology; Santa Cruz, California, EEUU) y 200 µl de *IP Dilution Buffer*, a los complejos ADN-FT obtenidos del apartado 4.4.5.1 y se incubó en agitación durante 90 minutos a 4 °C. En la muestra control negativo se añadió el anticuerpo normal IgG (Santa Cruz Biotechnology; Santa Cruz, California, EEUU), en lugar del anticuerpo contra la proteína de estudio. Este anticuerpo se caracteriza por no tener ningún antígeno como diana, por este motivo se utilizó como control negativo del ensayo. Para la inmunoprecipitación se utilizaron Protein A-Dynabeads, microesferas magnéticas unidas a Proteína A, la cual se une a la región constante (Fc) de los anticuerpos IgG de una gran variedad de especies. Posteriormente, se transfirió la mezcla del complejo ADN/FT/anticuerpo en el tubo

de *Dynabeads* (previamente lavados con *IP Dilution Buffer 1X*) y se incubó durante 1 hora a 4 °C en agitación. A continuación, se centrifugó la mezcla a 2000 rpm durante 2 segundos y se colocó en un soporte magnético (Promega Corporation; Madison, Wisconsin, EEUU) para descartar la parte fluida y coleccionar los *Dynabeads*. La colocación de la mezcla en el soporte magnético permite separar la mezcla homogénea en dos fases claramente diferenciadas, gracias a las propiedades magnéticas de los *Dynabeads*: la fase acuosa (que se descartó) y la fase sólida (Protein A-Dynabeads + anticuerpo contra el FT de estudio + sondas ADN diana del FT biotinizadas). Posteriormente se realizaron lavados de la mezcla repitiendo los pasos de dilución con *IP Wash Buffer 1X* (ver Anexo V.A), centrifugación (2000 rpm durante 2 segundos) y colocación en el soporte magnético, tres veces.

Para la elución de las sondas de ADN, se añadió *IP Elution Buffer 1X* (previamente calentado) a la mezcla anterior y se incubó a 100 °C durante 5 minutos. Inmediatamente después, se colocó la mezcla en hielo (2 minutos) y se centrifugó a 2000 rpm durante 3 segundos. Finalmente se colocó la mezcla en el soporte magnético (en hielo) y se transfirió la parte fluida (que contenía las sondas eluidas) en un tubo nuevo.

5.4.4 Hibridación de las membranas del array

En esta fase, se hibridaron las sondas eluidas en las membranas del array (TranSignal™), las cuales están marcadas con 54 secuencias diferentes de ADN consenso (complementarias a las sondas de ADN eluidas). El símbolo y nombre completo de los FTs analizados que se unen a las secuencias de ADN consenso de las membranas se muestran en la Tabla 13.

Para este fin se añadieron las sondas eluidas (obtenidas del apartado anterior) en los tubos de hibridación que contenían las membranas del array pre-hibridadas (del apartado 4.4.5.2) y se dejaron incubar a 42 °C durante toda la noche. A continuación se decantó la mezcla de hibridación y se lavaron las membranas incubándolas con 50 ml de *Hybridization Wash I*

durante 20 minutos a 48 °C en el horno de hibridación. Se repitió el lavado de las membranas con el *Hybridization Wash II* (ver Anexo VI.B).

5.4.5 Detección y análisis de resultados

En la fase de detección y revelado es importante que la membrana no se seque. En primer lugar, se quitaron las membranas de los frascos de hibridación mediante unas pinzas, se colocaron en un reservorio con 20 ml de *Blocking Buffer 1X* (ver Anexo V.C) y se incubaron a temperatura ambiente durante 30 minutos en agitación. Posteriormente se cogió 1 ml de la solución de *Blocking Buffer 1X* (del reservorio) y se mezcló con 20 µl de estreptavidina conjugada con HRP (*Streptavidin-HRP Conjugate*) 1000X en un tubo nuevo. Se transfirió de nuevo la mezcla al reservorio y se incubó a temperatura ambiente durante 20 minutos. Posteriormente se lavaron las membranas tres veces con *Wash Buffer 1X* (ver Anexo V.C) durante 5 minutos y se incubaron con 20 ml de *Detection Buffer 1X* (ver Anexo V.C) durante 5 minutos más a temperatura ambiente. A continuación se colocaron las membranas en una película de transparencia de plástico, se añadió solución sustrato sobre las membranas (mezcla de 1ml *Substrate Solution I*, 1ml *Substrate Solution II* y 1 ml *Substrate Solution III*) y se colocó otra hoja de transparencia para asegurar una distribución uniforme del sustrato. Después de 5 minutos de incubación a temperatura ambiente, se quitó el exceso de sustrato ejerciendo presión sobre la transparencia y se revelaron mediante quimioluminiscencia (Immobilon™ Western, Millipore, Merck KGaA; Darmstadt, Alemania). Para el ajuste del tiempo de exposición se utilizaron los puntos control de biotina situados a lo largo de los márgenes inferior y lateral, los cuales deben tener la misma intensidad de señal.

Para el análisis de los resultados, se utilizó la plantilla de puntos del kit y se compararon las imágenes obtenidas del control negativo y las muestras experimentales. Este estudio es un ensayo cualitativo en el que los puntos indican la presencia o ausencia de la interacción con el FT. Por lo tanto, la intensidad de la señal de los puntos de la matriz no es proporcional a la

cantidad de interacción, sino que es proporcional a la calidad de las interacciones (fuerte o débil).

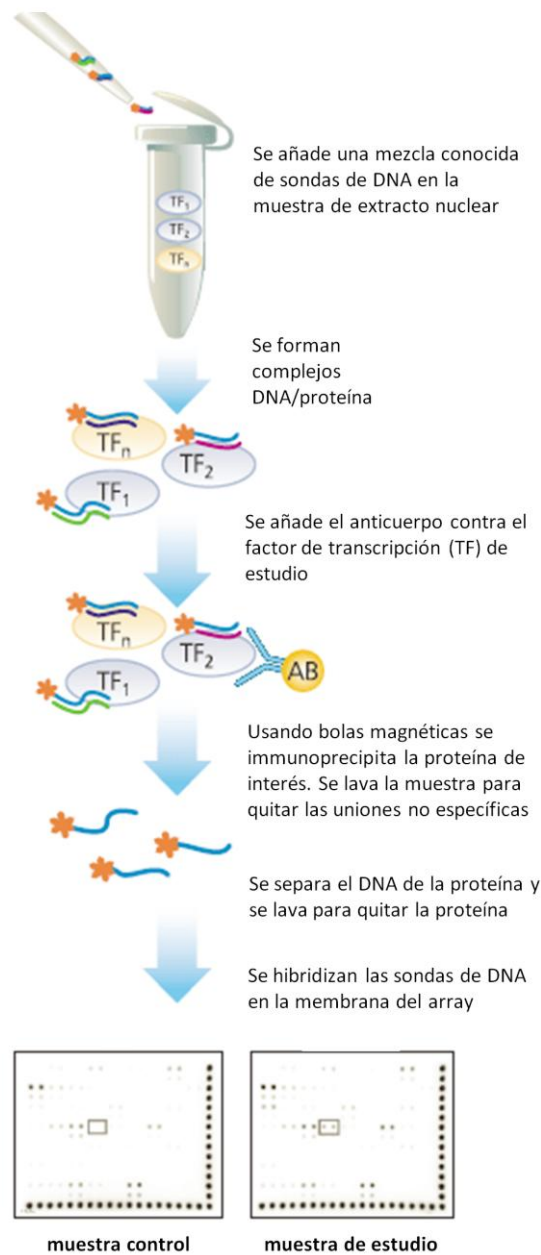


Figura 14. Esquema del protocolo del kit *TranSignal Array™ TF-TF* versión I, que se utilizó para determinar las interacciones de HMG1Y y Oct-2 con otros FTs en muestras de cerebro de rata sometida a isquemia. Figura adaptada de affymetrix.com.

Tabla 13. El símbolo y el nombre completo de las secuencias de ADN consenso (secuencias diana conocidas de FT) analizadas en el array de interacciones FT-FT.

SÍMBOLO FT	NOMBRE FT	SÍMBOLO FT	NOMBRE FT	SÍMBOLO FT	NOMBRE FT
AP-1, -2	Activator protein 1, 2	GRE	Growth response element	RAR(DR5)	Retinoid A receptor
ARE	AU-rich element	HMF-4	Hepatocyte nuclear factor 4	RXR(DR1)	Retinoid X receptor
Brn-3	Brain 3	IRF-1	Interferon regulatory factor 1	SIE	Sis-inducible element
C/EBP	CCAAT/enhancer binding protein	MEF-1,-2	Mads box transcription enhancer factor-1, -2	Smad3, 4	Smad transcription factor 3,4
CBF	Core binding factor	Myc-Max	Oncogene MYC and MYC-associated factor X	Smad SBE	Smad-binding element
CDP	CCAAT-displacement protein	NF-1	Neurofibromin	Sp1	Transcription factor Sp1
c-Myb	Avian myeloblastosis viral oncogene homolog	NFATC	Nuclear factor of activated T cells, cytoplasmic, calcineurin-dependent 1	SRE	Serum response element
CREB	cAMP response element-binding protein 1	NF-E1, -E2	Nuclear factor erythroid 1, 2	Stat1,3,4,5,6	Signal transducer and activator of transcription 1, 3, 4, 5, 6
E2F1	E2F transcription factor 1	NFKB	Nuclear factor kappa-B	TFIID	Transcription factor II D
EGR	Early growth response 1	Oct-1	Octamer 1	TR	Tomoregulin
ERE	Oestrogen responsive element	p53	Tumor protein p53	TR(DR4)	Tomoregulin (death receptor 4)
Ets	V-Ets avian erythroblastosis virus E26 oncogene homolog 1	Pax5	Paired box gene 5	USF-1	Upstream stimulatory factor 1
Ets/PEA3	Polyomavirus enhancer activator-3 (subfamily of Ets)	Pbx1	Pre-B-cell leukaemia transcription factor	VDR(DR3)	Vitamin D receptor
FAST-1	Troponin c	Pit1	Pituitary-specific transcription factor 1	HSE	3-alpha-hydroxysteroid epimerase
GAS/ISRE	Gastrin/interferon-stimulated response element	PPAR	Peroxisome proliferator-activated receptor	MRE	Metal-responsive promoter elements
GATA	GATA-binding protein	PRE	Progesterone response element		

6. Estudios funcionales *in vitro*

6.1 Silenciamiento génico mediante interferencia del ARN (RNAi)

El ARN de interferencia (ARNi) es un mecanismo biológico conservado que inhibe específicamente la expresión de genes a nivel post-transcripcional, en respuesta a la presencia de ARN de doble hebra (dsARN) que proviene de la propia célula (microRNA o miRNA) o del exterior de la misma (ARN de interferencia pequeños o del inglés *small interfering RNA*, siRNA). Concretamente, es un sistema que permite el silenciamiento secuencia-específica de un gen a través de la degradación de su ARNm marcado mediante dsRNA complementario. Identificado por primera vez como un mecanismo anti-viral conservado evolutivamente, el ARNi surge como un proceso natural de regulación de la expresión de genes en eucariotas y como una potente herramienta para el “silenciamiento” artificial de genes en investigación. En los últimos 10 años, el ARNi se ha convertido en una valiosa y estandarizada herramienta de experimentación para la caracterización funcional de genes en muchos laboratorios y en prácticamente toda área de la investigación científica.

El sistema ARNi ha sido utilizado para el estudio de la función de varios genes en procesos neurobiológicos fundamentales como el desarrollo embrionario, el ciclo celular, la plasticidad neuronal, etc., así como para investigar las funciones de genes en el sistema nervioso central de invertebrados como *C. elegans* y *Drosophila*. Del mismo modo, las técnicas de ARNi también están siendo aplicadas con éxito en estudios de neurociencias llevados a cabo en células de mamífero *in vitro* y en mamíferos *in vivo*. Se ha logrado el silenciamiento génico efectivo en líneas celulares de neuronas^{180,181}, astrocitos¹⁸², células de Schwann¹⁸³, así como en cerebro de ratón *in vivo*, mediante la aplicación de la técnica de ARNi^{181,184-186}.

El proceso de interferencia mediante siRNA exógeno es un proceso complejo altamente coordinado en el cual participan numerosas proteínas pertenecientes a distintas familias. Una vez las moléculas de ARN de doble cadena (introducidas directamente: dsRNA; o incluidas en un plásmido: shRNA, del inglés *Plasmid-expressed short hairpin RNA*) penetran en la célula, son procesados por el complejo enzimático DICER (de la familia de nucleasas específicas de ARN de doble cadena) que genera moléculas de ARN de doble hebra pequeñas (siRNA) de 21-23 nucleótidos. Éstas son reconocidas por el complejo enzimático RISC (*RNAi silencing complex*) el cual separa las hebras del siRNA y cataliza la unión e interacción específica con el ARNm endógeno y la rotura específica del mismo. El ARNm resultante es reconocido en la célula como aberrante y es destruido por otras ribonucleasas. La transfección de éstos siRNA o de un vector capaz de expresarlos en el interior de la célula permite la inhibición total o parcial de la expresión del gen diana (Figura 15).

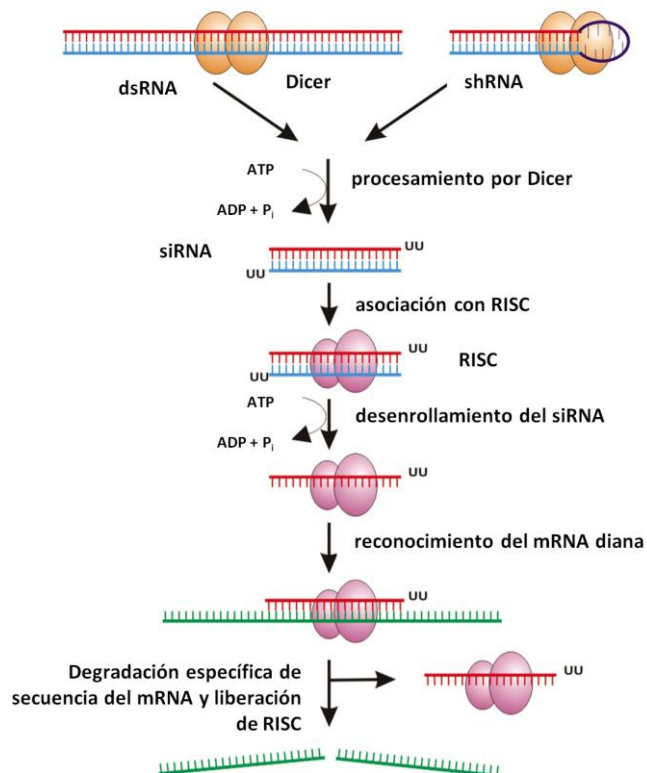


Figura 15. Esquema del proceso de silenciamiento post transcripcional del ARN mensajero mediante la técnica de ARN interferencia (ARNi). Figura adaptada de arthritis-research.com.

6.1.1 Selección de la mejor estrategia ARNi para nuestro sistema

La inhibición artificial de la expresión de genes mediante ARNi es conocido como silenciamiento o *knocking down* debido a que la inhibición no es total, a diferencia del *knocking out* donde el gen es eliminado completamente del genoma. Para el silenciamiento de genes en mamíferos se han desarrollado diferentes métodos, entre los cuales destacan:

Los siRNA sintéticos: son moléculas de 21 nucleótidos transfectedos directamente a la célula. La transfección es el proceso de introducir material genético en células eucariotas mediante diferentes herramientas. Los siRNA son fácilmente sintetizados y fáciles de usar. Una desventaja es el corto tiempo de duración del silenciamiento (de tres a siete días, transitoria) y que no resulta fácil introducirlos en células difíciles de transfectar.

Los shRNA: son moléculas de ARN pequeñas con estructura de horquilla (del inglés *short hairpin RNA*) expresados en vectores-plásmidos, introducidos a la células mediante transfección. Los vectores de expresión son derivados plasmídicos o de virus que son introducidos a las células de manera estable y son transmitidos a través de varias generaciones. Los shRNA también pueden expresarse en vectores de expresión virales, introducidos a la célula mediante infección con pseudo-partículas virales. La ventaja del uso de shRNA es que permite una expresión estable del siRNA con mayor tiempo de duración del silenciamiento (al ser integrados en el genoma de la célula). Sin embargo, son difíciles de usar en células difíciles de transfectar y en algunos casos (vectores lentivirales o retrovirales) la técnica requiere de medidas de bioseguridad específicas (nivel II).

El método a escoger depende principalmente de dos factores: la duración del efecto del silenciamiento que se requiera y el tipo de células que se desea trabajar. En la presente tesis el objetivo de los estudios funcionales fue inhibir la expresión de los FT HMG1Y (en RBMVEC) y Oct-2 (en RN) para identificar sus posibles genes diana, su implicación en determinados procesos celulares (citotoxicidad, viabilidad, migración e invasión celular) y estudiar su función en

cerebro. Por este motivo escogimos el uso del silenciamiento transitorio mediante siRNA sintéticos debido a que es un método relativamente sencillo y adecuado para la realización de los ensayos a realizar (menos de siete días).

Los siRNAs utilizados en esta tesis fueron diseñados y sintetizados por Dharmacon (Thermo Fisher Scientific; Waltham, Massachusetts, EEUU). Entre los distintos tipos de siRNAs comercializados por Dharmacon se seleccionaron los *SMART pool siRNAs ON-TARGETplus*, que consisten en una combinación de 3-4 siRNAs sintéticos distintos dirigidos contra un mismo gen en un solo reactivo, lo cual hace que presenten una mayor probabilidad de dirigir un silenciamiento génico potente y específico. Estos siRNAs permiten un silenciamiento altamente específico (gracias al conjunto de secuencias del 'pool' y a la baja tasa de silenciamiento inespecífico/*off-target* asociada). Además pertenecen al grupo de siRNAs *ON-TARGETplus siRNA*, los cuales representan la primera opción ya que contiene modificaciones en su estructura que evitan el silenciamiento "fuera de diana" (*siRNA off-target*, o silenciamiento inespecífico). Concretamente, la hebra sentido se encuentra modificada para evitar la interacción con RISC y favorecer la captación de la hebra antisentido, (la cual es complementaria al ARNm diana). Por otro lado, la hebra antisentido (denominada región de siembra) también está modificada para desestabilizar las actividades inespecíficas y mejorar la especificidad de la hebra diana. Estas modificaciones permiten reducir un 90% el silenciamiento inespecífico del siRNA. Dentro de este tipo de siRNA están los SMARTpool ON-TARGETplus siRNA.

6.1.2 Silenciamiento del gen HMG1Y en RBMVEC

6.1.2.1 Optimización de la transfección de siRNA en RBMVEC

Antes de tratar las RBMVEC con el siRNA específico para poder estudiar la función proteica en este sistema celular, fue necesaria la optimización de la transfección, es decir, estudiar cuáles son las condiciones necesarias para que el siRNA sea capaz de dirigir una degradación específica de secuencia de un ARNm homólogo, una vez dentro de la célula. El

estudio de optimización de la transfección consistió principalmente en la determinación de la cantidad y tipo de reactivo de transfección, la determinación de la dosis óptima de siRNA diana a transfectar y finalmente la comprobación de las condiciones seleccionadas mediante un control positivo. Para este fin, las RBMVEC se sembraron en placas de 96 pocillos tratadas para el cultivo celular (Cultek, Madrid, España) previamente recubiertas con *Cell Attachment* (Cell Applications; San Diego, California, EEUU) a una densidad de 10000 células/pocillo.

- Selección del reactivo de transfección

Se testaron los 4 reactivos de transfección disponibles de la casa comercial Dharmacon: DharmaFECT 1, 2, 3 y 4 (Dharmacon, Thermo Fisher Scientific; Waltham, Massachusetts, EEUU). Los reactivos DharmaFECT son lípidos catiónicos que utilizan la lipofección como método de transfección. Ésta consiste en la formación de complejos entre los lípidos catiónicos y el ARN (lipoplejos), los cuales son incorporados en el citosol celular gracias a la afinidad del complejo (cargado positivamente) con la membrana celular (cargada negativamente, debido a los fosfolípidos). Los reactivos DharmaFECT están optimizados para la introducción de bajas concentraciones de ARN pequeños (siRNA o microRNA), promueven una baja citotoxicidad (mantienen la viabilidad con lípidos especialmente formulados para el transporte de siRNA) y permiten transfectar eficientemente, logrando la captación óptima del siRNA y el silenciamiento fiable de genes. Aunque DharmaFECT 1 es el reactivo de transfección de uso general (demostrando una eficiencia de transfección del 80% y una baja citotoxicidad en una gran variedad de tipos celulares), Dharmacon también ha creado diferentes formulaciones (DharmaFECT 1, 2, 3 y 4) que permiten una optimización más completa de la transfección en otros tipos de células en los que el reactivo común no funciona. Para determinar el reactivo de transfección óptimo, se sembraron las células (10000 células/pocillo) en placas de 96 pocillos, previamente recubiertas con *Cell Attachment* y entre 24 y 48h después (cuando la confluencia del cultivo era del 80%) se transfectaron con 100 nM de *TOX transfection control* (Dharmacon,

Thermo Fisher Scientific; Waltham, Massachusetts, EEUU) (siRNA TOX), un siRNA que una vez transfectado promueve la muerte celular. Para ello se testaron diferentes concentraciones (0,15%, 0,45% y 0,75%) de cada uno de los reactivos de transfección DharmaFECT 1, 2, 3 y 4 (grupos TOX+DF1/2/3/4) (DharmaFECT, DF). Un segundo grupo de células se trató sólo con el reactivo de transfección (grupos Mock 1/2/3/4) y un tercer grupo, no recibió tratamiento (grupo control). Entre 24-48 horas después de la transfección se evaluó la eficiencia de transfección y la toxicidad del reactivo de transfección mediante el test MTT (apartado 1.2.2.1.2.1).

Para el análisis de la eficiencia de transfección se comparó la viabilidad celular de los grupos TOX+DF1/2/3/4 (a los que se les restó el valor de la toxicidad del DF correspondiente). En este estudio la viabilidad celular de cada condición testada (diferentes cantidades de cada reactivo de transfección) es inversamente proporcional a la eficiencia de transfección. Es decir, cuanto menor viabilidad celular (mayor muerte) promueva un reactivo concreto, más eficiente es, ya que permite la “entrada” del siRNA tóxico de manera óptima.

Para el análisis de la toxicidad del reactivo se comparó la viabilidad celular de los grupos Mock (tratados sólo con el reactivo de transfección). En este caso, cuanto mayor es la viabilidad celular en los diferentes grupos a comparar, menor es la toxicidad celular que lleva asociada el reactivo correspondiente. Por lo tanto, el objetivo del estudio de optimización del reactivo de transfección, es la selección de las condiciones que lleven asociadas una mayor eficiencia de transfección (alta muerte celular en el grupo TOX+DF) y a la vez una menor toxicidad celular (alta viabilidad celular del grupo Mock).

- **Optimización de la cantidad de DharmaFECT 4 y concentración de siRNA**

Una vez determinado el tipo de reactivo de transfección óptimo se procedió a la selección de la dosis de reactivo de transfección y siRNA. Para este fin se sembraron las RBMVEC en placas para imagen de 96 pocillos (*96-well Microplate, black/clear Imaging Plate*) (BD Biosciences; Franklin Lakes, Nova Jersey, EEUU) a 10000 células/pocillo y se transfectaron (apartado 5.1.2.2)

con diferentes dosis (20, 35 ó 50 nM) de un indicador de la transfección verde, *siGLO green transfection indicator* (Dharmacon, Thermo Fisher Scientific; Waltham, Massachusetts, EEUU) diluido con distintas concentraciones (0,15%, 0,45% y 0,75%) de DharmaFECT 4. El reactivo siGLO está constituido por oligonucleótidos de doble cadena de ARN sintetizados químicamente, etiquetados con un fluoróforo y químicamente modificado para prevenir la catalización por parte de RISC y asegurar una óptima localización intracelular (nuclear). Este reactivo no da información sobre la función del siRNA, la localización o duración del silenciamiento, sin embargo permite determinar las condiciones óptimas de transfección del siRNA, rastreando las células en cultivo transfectadas de manera individual y monitorizar la eficiencia relativa de captación en caso que se co-transfecte con otro siRNA. A las 24 horas post-transfección se fijaron las células con ρ -formaldehído al 3,7% y se realizó una tinción de los núcleos con DAPI (apartado 4.4.1). Las células se analizaron con el equipo Sistema Bioimager 855 (BD Biosciences; Franklin Lakes, Nova Jersey, EEUU) utilizando los diferentes canales de FITC (del inglés *fluorescein isothiocyanate*) (pseudo-color verde) y DAPI (pseudo-color azul). Las imágenes se obtuvieron mediante el programa BD Attovision™ (apartado 4.4.2). Mediante este estudio complementario de imagen, se determinaron las condiciones que permiten una óptima incorporación de siRNA en las células endoteliales, es decir, aquellas condiciones que permitan una co-localización de las células siGLO positivas (verde) y las DAPI positivas (azul).

- **Comprobación de las condiciones optimizadas**

Finalmente, una vez determinadas las mejores condiciones de transfección, se utilizaron éstas para transfectar un siRNA control positivo (es decir, un siRNA contra un gen de expresión endógena) y se evaluó la viabilidad celular. Aunque anteriormente ya se analizaron distintas dosis de siRNA, en este ensayo se volvieron a evaluar. Para este estudio, se sembraron las RBMVEC en placas de 96 pocillos a 10000 células/pocillo y se transfectaron con diferentes concentraciones (10, 20, 35 y 50 nM) del control positivo (de la expresión) *ON-TARGETplus*

Cyclophilin B Pool (Dharmacon, Thermo Fisher Scientific; Waltham, Massachusetts, EEUU), un siRNA contra el gen endógeno Ciclofilina B. Como control positivo de la transfección, un grupo de células se transfectaron con 100nM de siRNA TOX diluido con el tipo y la concentración de reactivo de transfección optimizado en el apartado anterior (0,15% de DharmaFECT 4). Un tercer grupo celular se trató sólo con el reactivo de transfección (grupo Mock). Entre 24 y 48 horas después de la transfección se evaluó la viabilidad celular de los diferentes grupos de tratamiento mediante el ensayo MTT (apartado 1.2.2.1.2.1). Complementariamente, se comprobó el silenciamiento del control positivo con el análisis de la expresión génica mediante el kit Cell-to-CT (Applied Biosystems, Life Technologies; Grand Island, Nueva York, EEUU) (apartado 4.2.5) y qPCR (apartado 4.2).

6.1.2.2 Silenciamiento del gen HMGIY mediante transfección de siRNA

Una vez puesto a punto el protocolo de silenciamiento mediante siRNA en las RBMVEC, se transfectaron las células con los siRNAs contra HMGIY.

Las RBMVEC se sembraron (200000-250000 células/pocillo) en placas de 6 pocillos (Cultek; Madrid, España) previamente recubiertas con *Cell Attachment* (Cell Applications; San Diego, California, EEUU) y se mantuvieron en medio libre de antibiótico durante 24 horas (medio de crecimiento basal RBMVEC suplementado con 5% FBS). Al día siguiente se realizó la transfección del siRNA. Para ello se empezó preparando las soluciones *stock* diluyendo el siRNA control y siRNA diana con el siRNA Buffer 1X para conseguir una concentración de cada siRNA de 50 nM. Como control negativo se utilizó el siRNA sin diana *ON-TARGETplus Non-Targeting Pool* (Dharmacon, Thermo Fisher Scientific; Waltham, Massachusetts, EEUU) y como siRNA del gen diana el *ON-TARGETplus SMARTpool HMGIY siRNA* (una mezcla de cuatro siRNA contra el gen HMGIY). A continuación se prepararon las mezclas de siRNA y reactivo de transfección en dos tubos separados. Para cada grupo de siRNA (control negativo y diana) se preparó una dilución 1/2 con medio basal de las RBMVEC (sin suero ni antibiótico). Por otro lado se diluyeron 3

μl/pocillo del reactivo de transfección DF4 (para obtener una concentración final del 0,15% de DharmaFECT 4) con 297 μl/pocillo de medio basal (sin suero ni antibiótico). Se dejaron incubar las soluciones de siRNA y DF4 en los tubos separados durante 5 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se añadieron las mezclas anteriores de siRNA (control y diana) a cada tubo de DF4 diluido y se dejó incubar durante 20 minutos más a temperatura ambiente. A continuación se añadió medio basal de RBMVEC con FBS (5%) (sin antibiótico) a cada mezcla siRNA/DF4 para conseguir un volumen final de 2 ml/pocillo a transfectar. Finalmente se aspiró el medio de incubación de las células a transfectar y se añadieron 2 ml/pocillo de cada mezcla, transfectando 50 nM de *ON-TARGETplus Non-Targeting Pool* en cada pocillo del grupo control negativo y 50 nM de *ON-TARGETplus SMARTpool HMG1Y siRNA* en cada pocillo del grupo siRNA diana.

Veinticuatro horas después de la transfección se sustituyó el medio por medio de crecimiento completo (con suplemento de RBMVEC y 2% de penicilina/estreptomicina). Las células se mantuvieron en cultivo hasta los días 4 y 5 post-transfección, momento en el que se recogieron las células y se congelaron a -80 °C hasta la extracción del ARN y proteína (apartados 3.1 y 3.3).

6.1.3 Silenciamiento del gen Oct-2 en neuronas corticales de rata (RN)

Para estudiar el rol de Oct-2 en las neuronas corticales de rata se transfectaron las células con siRNA contra Oct-2. Las neuronas se sembraron a una densidad de 1.5×10^6 células/pocillo en placas de 6 pocillos previamente recubiertas con poli-lisina (Sigma; St Louis, Missouri, EEUU). Las células fueron transfectadas con una mezcla de medio basal (EMEM, ver Anexo II.B), 16,7 μl/pocillo de *HiPerFect transfection reagent* (Qiagen; Hilden, Alemania) y 50 nM/pocillo de *ON-TARGETplus Non-Targeting Pool* (siRNA sin diana; control negativo) (Dharmacon, Thermo Fisher Scientific; Waltham, Massachusetts, EEUU) o 50 nM/pocillo de *ON-TARGETplus SMARTpool Oct-2 siRNA* (una mezcla de cuatro siRNA contra el gen Oct-2) (Dharmacon, Thermo Fisher Scientific;

Waltham, Massachusetts, EEUU). La transfección se realizó entre los días 10-12 *in vitro* (DIV), según las recomendaciones de la casa comercial. 24 horas después de la transfección, se reemplazó la solución por medio de crecimiento convencional de RN (Anexo II.B).

6.2 Análisis del daño celular

Con el fin de estudiar el potencial rol de Oct-2 en el daño celular, realizamos el Ensayo de Citotoxicidad No-radioactivo CytoTOX 96 (Promega Corporation; Madison, Wisconsin, EEUU) previamente descrito en el apartado 1.2.2.1.2.2 de esta sección. Para este fin, se recogió medio celular del cultivo de las RN tratadas con siRNA (obtenidas del apartado 6.1.3) a los 4, 5 y 6 días post-transfección y se determinó la liberación de LDH con el ensayo previamente citado. Los resultados se normalizaron con el valor máximo de LDH, correspondiente al grupo de células tratadas con 0,1% de Tritón X-100, el cual promueve prácticamente la completa muerte celular neuronal (100%). Los resultados se expresaron en función del porcentaje del valor máximo de LDH y se representaron en comparación con el grupo control negativo¹⁸⁷⁻¹⁸⁹. A los 4 y 5 días (DIV 16-17) post-transfección, las células se recogieron para el análisis proteico (apartado 3.3).

6.3 Análisis de la actividad angiogénica

Con el fin de estudiar el rol potencial del FT HMG1Y en alguna de las etapas del complejo proceso de la angiogénesis, realizamos ensayos de viabilidad celular, migración celular e invasión celular en RBMVEC en las que previamente se había silenciado el gen HMG1Y.

6.3.1 Ensayo de viabilidad celular

Con el fin de evaluar la viabilidad celular del grupo control (RBMVEC tratados con siRNA sin diana) y de las células transfectadas con siRNA, se realizó el ensayo de MTT, según el apartado 1.2.2.1. Brevemente, cinco y seis días después de la transfección del *pool* de siRNAs contra HMG1Y se aspiró el medio del cultivo y se añadieron 100 μ l de medio de cultivo fresco y 10 μ l de MTT (5mg/ml) (Sigma; St Louis, Missouri, EEUU) a cada pocillo de las placas de 96 pocillos. Después de incubar las placas a 37 °C durante 2,5 horas, se aspiró cuidadosamente el medio y los cristales de formazan se lisaron en 100 μ l de DMSO, agitando suavemente la placa. Se leyó la absorbancia a 570 nm con un lector de placas (Spectra Max 340PC, bioNova científica; Barcelona, España). La viabilidad celular se expresó como un porcentaje del valor obtenido en los cultivos del grupo control (transfectado con siRNA sin diana).

6.3.2 Ensayo de migración celular (*wound scratch assay*)

El ensayo *wound scratch*, es un test simple y reproducible muy comúnmente utilizado para medir y estudiar la migración celular ¹⁹⁰. Por este motivo, se utilizó este ensayo para comparar la capacidad migratoria de los dos grupos de estudio. Cuatro días después del tratamiento con siRNA, las células estaban formando una capa confluyente, se lavaron las RBMVEC con PBS y se realizó una privación sérica manteniendo las células con medio de cultivo y un porcentaje bajo de suero (0,1% BSA) durante toda la noche (con el objetivo de sincronizar el ciclo celular de las células del cultivo). En el día del ensayo (5 días después de la transfección), se aspiró el medio y se trazó una línea roja en la parte inferior del pocillo (por debajo de la placa) con un marcador. Con una punta estéril de pipeta de 200 μ l, se trazaron tres “heridas” separadas a través de las células, perpendiculares a la línea dibujada. Se lavó el cultivo con PBS para quitar los detritos celulares desprendidos y se sustituyó por medio que contenía FBS al 5% (con el fin de promover la migración celular). Posteriormente, mediante el equipo Canon (Power Shot G6, Canon; Barcelona, España) se tomaron doce imágenes diferentes (correspondientes a

diferentes zonas de 2 pocillos) de cada grupo de estudio a las 0, 24 y 72 horas después de iniciar el ensayo, con el fin de medir el ancho de la herida en cada tiempo. La disminución de la anchura de la herida a lo largo del tiempo se extrapoló al fenómeno de migración. La migración celular se expresó como un porcentaje del valor de migración respecto al grupo control negativo (transfectado con un siRNA sin diana) ^{191,192}.

6.3.3 Ensayo de invasión de células endoteliales

La capacidad invasiva de las células endoteliales se define como la habilidad de migrar (moverse en respuesta a la concentración de ciertas sustancias químicas o quimioatrayentes) y degradar la matriz extracelular de alrededor. Este proceso es clave para la formación de nuevos vasos. Para estudiar la posible implicación de HMGIY en el proceso de invasión, se utilizó el sistema de angiogénesis: *BD BioCoat™ Angiogenesis System: Endothelial Cell Invasion* (BD Biosciences; Franklin Lakes, Nova Jersey, EEUU). Éste consiste en un sistema de cultivo celular integrado en un inserto, diseñado para realizar ensayos de invasión mediante fluorescencia a tiempo real y métodos de detección no destructivos. A diferencia de otros ensayos *in vitro* tradicionales, este permite una rápida recogida de datos sin la necesidad de realizar lavados o conteo manual. Este sistema versátil contiene una membrana porosa de 3.0 µm (BD FluoroBlok™ PET membrane) que bloquea de manera efectiva la transmisión de luz de 490-770nm. Además, está uniformemente recubierta por una matriz de Matrigel que constituye y simula la membrana basal de los vasos sanguíneos *in vitro*. Esta capa proporciona una estructura proteica que se convierte en una buena barrera para las células no-invasivas, pero a la vez permite penetrar y pasar a través de ella a las células con capacidad invasiva. Así pues, la membrana BD FluoroBlok bloquea efectivamente la fluorescencia de las células (previamente marcadas) que no tienen capacidad invasiva y no han atravesado la membrana. Sólo aquellas que han conseguido atravesarla y por tanto aparecen en la parte inferior de la membrana BD

Fluoroblock, serán visibles por el sistema de análisis. En la Figura 16 se muestra un esquema del diagrama de trabajo del ensayo de invasión celular.

Cinco días después de la transfección, se realizó una privación sérica (disminución de la concentración de suero en el medio) de las RBMVEC durante 4-5 horas, mediante la incubación con medio basal y 0,1% de albúmina sérica bovina (BSA), para la sincronización del ciclo celular de las células. Posteriormente, se desadherieron las células de las placas de cultivo mediante Accutase (BD Biosciences; Franklin Lakes, Nova Jersey, EEUU) (una solución libre de enzimas que permite levantar y pasar las células sin afectar y degradar los receptores de membrana de las células, normalmente promovidos por la tripsina) y se obtuvo una suspensión celular. A continuación se sembraron 250 μ l de cada suspensión celular (40000 células / pocillo) procedente de cada grupo de tratamiento (control y siRNA), en las cámaras superiores de la placa con inserto de 24 pocillos BD Falcon™ FluoroBlok. Se añadieron 750 μ l de medio de cultivo que contenía FBS al 5% (que actúa como quimioatrayente y promueve la invasión) a cada uno de los pocillos inferiores. Las placas se colocaron en el incubador durante 22-23 horas a 37 ° C y 5% de CO₂. La tinción celular se realizó después de la invasión celular mediante la incubación con Hoechst (Sigma; St Louis, Missouri, EEUU) y posteriormente con el fluoróforo Calceína AM (4 μ g/ml) (BD Biosciences; Franklin Lakes, Nova Jersey, EEUU) (durante 10 y 90 minutos respectivamente, en la oscuridad). Los resultados se analizaron cuantificando el número de células invasoras de acuerdo con las instrucciones del fabricante y el especialista en aplicaciones de BD Biosciences. Las imágenes se capturaron con el objetivo 4x (NA 075 Olympus), el programa BD Attovision™ y el equipo Sistema Bioimager 855 (BD Biosciences; Franklin Lakes, Nova Jersey, EEUU). Como control positivo del ensayo de invasión se utilizaron células endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC), que se trataron del mismo modo que el resto de grupos de estudio. La invasión celular se expresó como el porcentaje del valor de invasión respecto al grupo control negativo (transfectado con un siRNA sin diana).

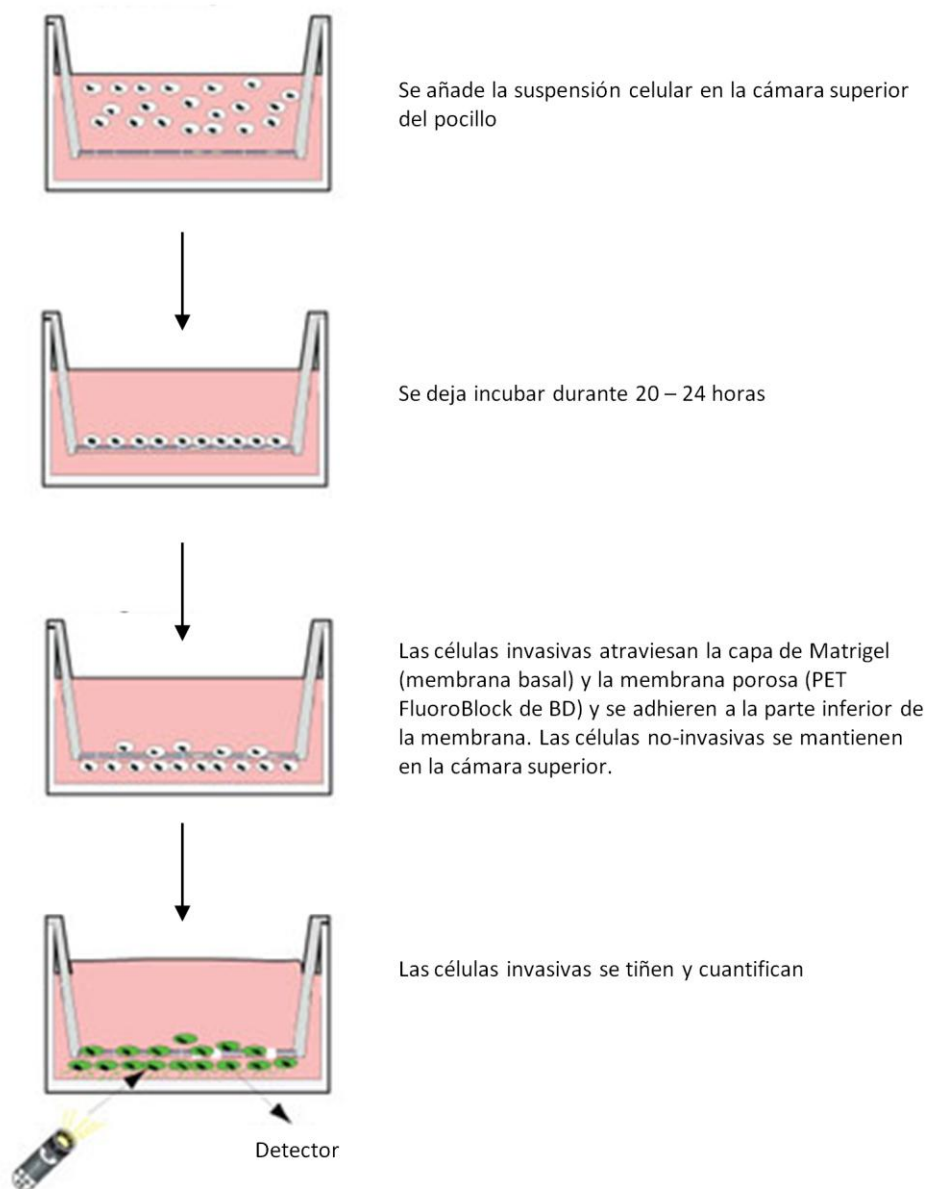


Figura 16. Diagrama de trabajo del ensayo de invasión utilizado para analizar la capacidad invasiva de las células endoteliales transfectadas con el siRNA contra HMG1Y, respecto el grupo control.

V RESULTADOS

V. RESULTADOS

Parte de los resultados obtenidos en esta tesis se han recogido en tres publicaciones diferentes y se han adjuntado en la presente sección.

1 Modelos experimentales de isquemia cerebral: Optimización del protocolo de privación de oxígeno y glucosa (POG) en las RBMVEC

1.1 Resultados de la revisión bibliográfica

La revisión bibliográfica ha puesto de manifiesto que se ha utilizado la hipoxia, así como modelos isquémicos, en los trabajos publicados con el objetivo de imitar las condiciones del ictus isquémico. En los experimentos *in vitro*, la POG es la aproximación más cercana a las condiciones que ocurren durante la isquemia cerebral ya que en experimentos de hipoxia sólo se lleva a cabo la privación de oxígeno. Por esta razón, nos hemos centrado en revisar los distintos modelos de isquemia de los trabajos previamente publicados que han utilizado células endoteliales vasculares cerebrales como modelo celular isquémico *in vitro*.

Este estudio ha revelado que no hay un consenso general estandarizado de las condiciones experimentales (medio de isquemia, tiempo de POG y tiempo de reperusión), ni del modelo celular en los experimentos de POG descritos en células endoteliales cerebrovasculares. No obstante, el modelo celular más ampliamente utilizado en los últimos trece años ha sido las células endoteliales cerebrales de ratón, principalmente las bEnd.3. En este caso, hemos visto que hay una mayor correlación con el tipo de medio de isquemia utilizado que en los tiempos de exposición a POG. Concretamente, el medio más utilizado en los experimentos de POG con estas células son el HBSS sin glucosa y también el DMEM sin glucosa. En cambio el tiempo de POG varía ampliamente entre los diferentes estudios, a pesar de que esté más estandarizado cuando se utiliza el medio HBSS.

Contrariamente a lo que ocurre en los estudios de isquemia con células de ratón, en los que las condiciones de POG utilizadas son generalmente homogéneas, en los estudios realizados en células endoteliales cerebrales de rata o humanas, se utiliza gran variedad de medios de isquemia distintos (solución de Krebs libre de glucosa, HBSS libre de glucosa, EBSS libre de glucosa, DMEM libre de glucosa, medio convencional libre de glucosa) y tiempos de exposición a POG diferentes. Por lo tanto, a pesar de que haya un consenso en el protocolo de determinadas especies de células endoteliales en los estudios revisados, es extremadamente importante tener en cuenta los objetivos del estudio para el diseño del protocolo y la selección de las condiciones experimentales de POG (medio de isquemia y especialmente tiempo del tratamiento de POG).

Estos resultados se recogieron en la publicación: *Experimental models for assaying microvascular endothelial cell pathophysiology in stroke*. *Molecules*. 2010 Dec 10; 15(12):9104-34 (doi:10.3390/molecules15129104).

1.2 Optimización del protocolo de POG

Para la optimización del protocolo de POG en las RBMVEC, se evaluaron seis protocolos distintos (ver Tabla 8, apartado 1.2.2.1.2 sección IV) mediante experimentos de viabilidad celular (MTT), citotoxicidad (LDH) y análisis de la integridad del ARN (electroforesis en geles de agarosa/TBE/BrEt) (apartados 1.2 a, b c y d).

a) Viabilidad celular, integridad del ARN y tiempo de POG

Los resultados obtenidos tras someter a las RBMVEC a los distintos protocolos mostraron que después de 150 minutos de POG, la viabilidad de las RBMVEC es significativamente menor que a 90 minutos de POG ($p < 0,001$), independientemente del medio utilizado (Figura 17 A) (muestras analizadas a 0h de reperusión). Por otro lado, cuando analizamos y comparamos la integridad del ARN de las RBMVEC sometidas a 150 minutos de POG se observó que ninguno de

los protocolos (1, 2 y 3) consiguió mantener el ARN de las células endoteliales íntegro. (Figura 17 B), por lo que descartamos el tiempo de POG de 150 min.

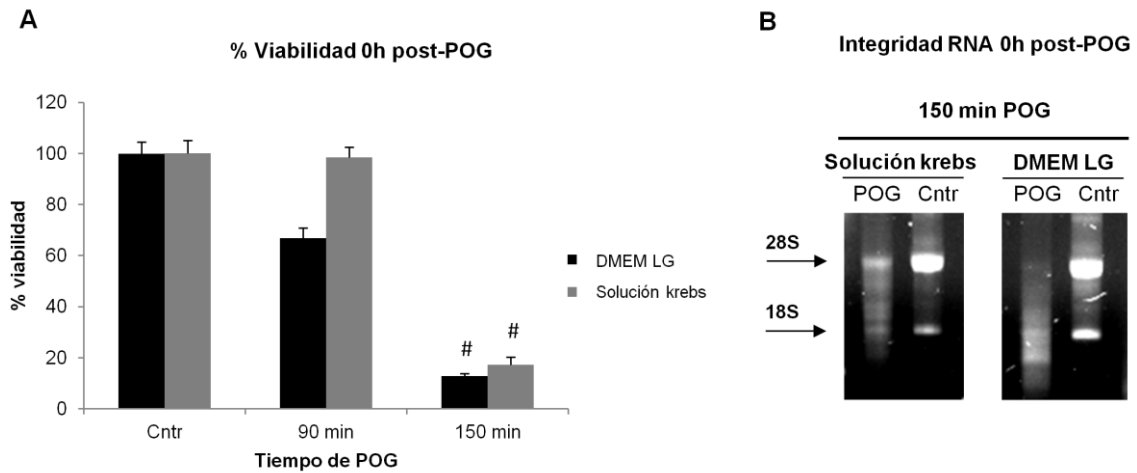


Figura 17. Análisis y comparación de la viabilidad celular (A) y la integridad del ARN (B) de las RBMVEC después de 90 y 150 minutos de POG (0h de reperfusión) y utilizando dos medios de POG diferentes: DMEM libre de glucosa (DMEM LG) y solución de Krebs. La viabilidad celular se analizó mediante el ensayo MTT y la integridad del ARN mediante electroforesis en geles de agarosa/TBE/BrEt). Las flechas indican las bandas correspondientes a la subunidad 28 y 18S del ARN ribosomal (28S y 18S, respectivamente). Cntr: muestra control; POG: privación de oxígeno y glucosa. *= $p < 0.05$; **= $p < 0.01$; #= $p < 0.001$.

b) Viabilidad celular y tiempo de reperfusión

A partir de estos resultados, decidimos centrarnos en el tiempo de POG de 90 minutos, ya que observamos que permite obtener una viabilidad aceptable de las RBMVEC después de la POG. A continuación procedimos a analizar y comparar la viabilidad celular a lo largo de diferentes tiempos de reperfusión (2, 24 y 72 horas) utilizando los tres protocolos de POG de estudio (ver apartado 1.2.2.1.2 sección IV). Los resultados de este experimento (Figura 18), mostraron que la viabilidad de las células endoteliales expuestas a POG utilizando el protocolo 1, disminuyó a lo largo de los distintos tiempos de reperfusión analizados, siendo significativo a las 24h ($p < 0,001$) y 72h ($p < 0,001$) de reperfusión. Utilizando el protocolo 2, también se observó una disminución de la viabilidad de las RBMVEC, siendo significativa ($p < 0,001$) en todos los tiempos analizados. Finalmente, la viabilidad de las RBMVEC expuestas a POG utilizando el protocolo 3,

RESULTADOS

disminuyó significativamente ($p < 0,001$) de las 2 a las 24h de reperfusión, mientras que a las 72h se observó una recuperación de ésta ($p < 0,001$).

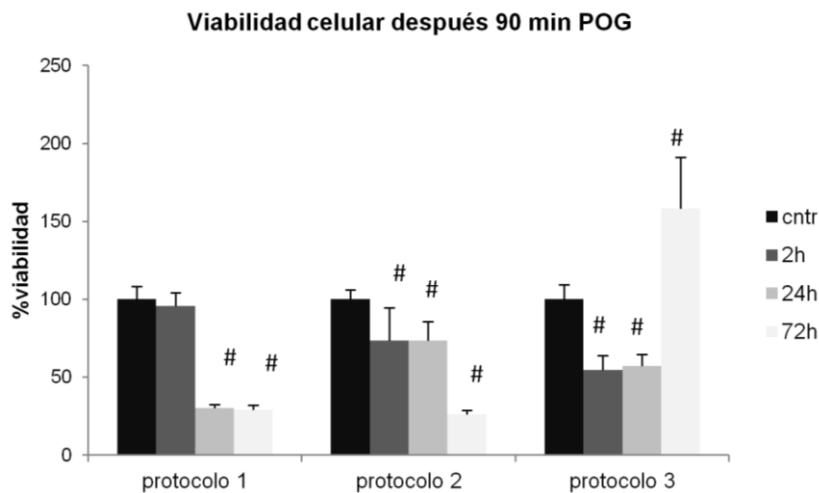


Figura 18. Comparación de la viabilidad de las RBMVEC a diferentes tiempos de reperfusión (2h, 24h, 72h) después de 90 minutos de POG, utilizando diferentes protocolos de POG (ver tabla 7 apartado 1.2.2.1.2 sección IV. Metodología). *= $p < 0,05$; **= $p < 0,01$; #= $p < 0,001$. Cntr: control.

c) Citotoxicidad y tiempo de reperfusión

Posteriormente procedimos al análisis de la citotoxicidad (mediante *LDH Cytotoxicity Assay*, apartado 1.2.2.1.2.2 sección IV. Metodología) de las RBMVEC a los diferentes tiempos de reperfusión, después del tratamiento de 90 minutos de POG utilizando los distintos protocolos de estudio. Los resultados de este estudio mostraron que los tres protocolos analizados promueven diferencias en la toxicidad de las RBMVEC después del tratamiento de POG (Figura 19). Con el protocolo 1 se observó un aumento significativo ($p < 0,001$) de la toxicidad celular a las 2 horas de reperfusión, disminuyendo posteriormente a niveles similares a los del control. Con el protocolo 2, se observó un aumento progresivo de la citotoxicidad de las 2 horas hasta las 72 horas de reperfusión, siendo significativo a este último tiempo ($p < 0,001$). Finalmente entre las 2 y las 24 horas de reperfusión observamos unos niveles de citotoxicidad similares a los del control y una disminución significativa ($p < 0,05$) de ésta a las 72 horas de reperfusión, cuando sometimos las RBMVEC a POG con el protocolo 3. Es decir, según los resultados de este estudio,

tanto el protocolo 1 como el protocolo 2 promueven un aumento de citotoxicidad en las RBMVEC en alguno de los tiempos analizados durante la reperusión después 90 minutos de POG. En cambio por otro lado, el protocolo 3 es el único que no promueve el aumento de la citotoxicidad y además permite mantener ésta a niveles similares a los del control (Figura 19).

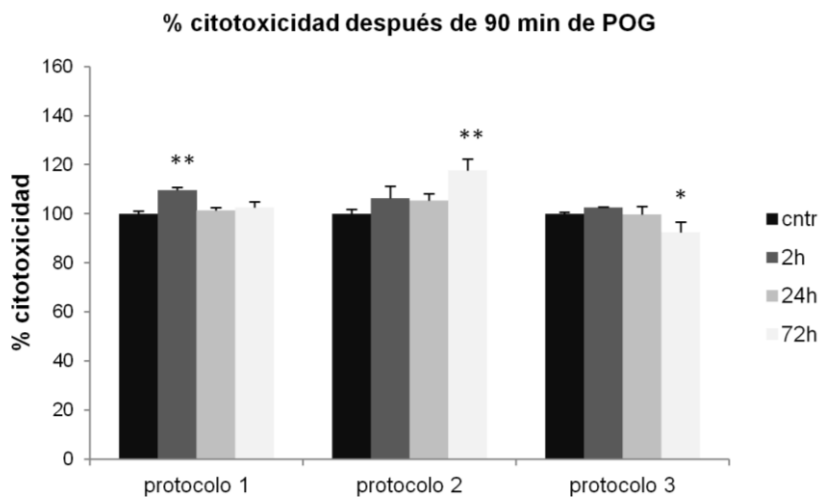


Figura 19. Análisis y comparación de la citotoxicidad de RBMVEC a diferentes tiempos de reperusión (2, 24 y 72 horas) después de someter a las células a 90 minutos de POG, utilizando diferentes protocolos de POG (apartado 1.2.2.1.2 de la sección IV. Metodología). *= $p < 0.05$; **= $p < 0.01$; #= $p < 0.001$. Cntr: control.

d) Integridad del ARN y tiempo de reperusión

Finalmente, otro estudio que se realizó para la optimización del protocolo de POG en las RBMVEC, fue el análisis de la integridad del ARN de las RBMVEC sometidas a POG mediante los protocolos de estudio, en geles de agarosa/TBE/BrEt. Los resultados obtenidos de este análisis mostraron que los diferentes protocolos analizados inducen diferencias en la integridad del ARN de las RBMVEC a lo largo de los diferentes tiempos de reperusión. Concretamente, las RBMVEC tratadas con el protocolo 1, mantuvieron la integridad del ARN hasta las 2 horas de reperusión. Con el protocolo 2, mantuvieron la integridad del ARN de las 2 hasta las 24 horas de reperusión. Y finalmente cuando se sometieron las RBMVEC a POG mediante el protocolo 3, la integridad de su ARN se mantuvo en todos los tiempos de reperusión analizados (de las 2 horas hasta los 5 días de reperusión) (Figura 20).

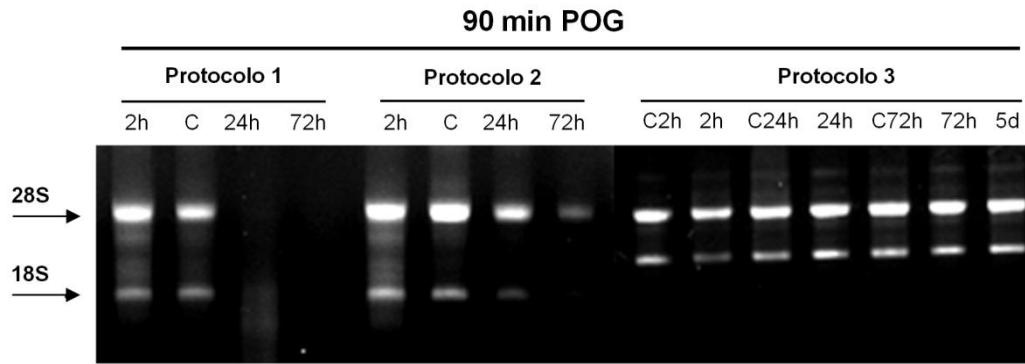


Figura 20. Análisis de la integridad del ARN de las RBMVEC a diferentes tiempos de reperfusión (2h, 24h, 72h y 5 días) después de someter a las células a 90 minutos de POG utilizando los diferentes protocolos de estudio (apartado 1.2.2.1.2 de la sección IV. Metodología). 28S: subunidad 28 del ARN ribosomal; 18S: subunidad 18S del ARN ribosomal.

Así pues, teniendo en cuenta los resultados obtenidos en el presente estudio, las condiciones de POG seleccionadas para las RBMVEC fueron las correspondientes al protocolo 3: la incubación con medio DMEM libre de glucosa (como medio de POG) durante 90 minutos (tiempo de POG) y el posterior cambio a medio de crecimiento convencional para RBMVEC (como medio de reperfusión).

1.3 Evaluación de la estabilidad de genes endógenos en el modelo de POG optimizado

Una vez definidas las condiciones de POG óptimas para las RBMVEC se analizó mediante qPCR y ensayos TaqMan específicos la expresión de potenciales genes como controles endógenos a los diferentes tiempos de reperfusión, para determinar su estabilidad génica en estas condiciones y por lo tanto definir el gen endógeno apropiado para la normalización de los resultados de expresión génica. Los genes analizados como potenciales controles endógenos fueron: *Ribosomal Protein L13A (Rpl13a)*, *18S rRNA (18S)*, *β2-microglobulin (β2m)*, *Hypoxanthine phosphoribosyltransferase (Hprt)*, *Tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, zeta polypeptide (Ywhaz)*, *Peptidyl-prolyl cis-trans isomerasa A (Ppia)*,

Peptidyl-prolyl cis-trans isomerasa B (Ppib), *Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (Gapdh)*, *Succinate dehydrogenase complex, subunit A, flavoprotein (Sdha)*. Los resultados obtenidos mostraron que de los genes analizados el único que preservó la estabilidad génica a lo largo de los distintos tiempos de reperfusión analizados fue el gen *Sdha* (Figura 21 I). Concretamente, los genes *Rpl13a*, *18S*, *β2m*, presentaron un aumento de la expresión a lo largo del tiempo de reperfusión (Figura 21 A-C). Por otro lado, los genes *Hprt*, *Ywhaz*, *PpiB*, *Gapdh* y *Ppia*, presentaron una tendencia a disminuir su expresión a lo largo de la reperfusión (Figura 21 D-H).

RESULTADOS

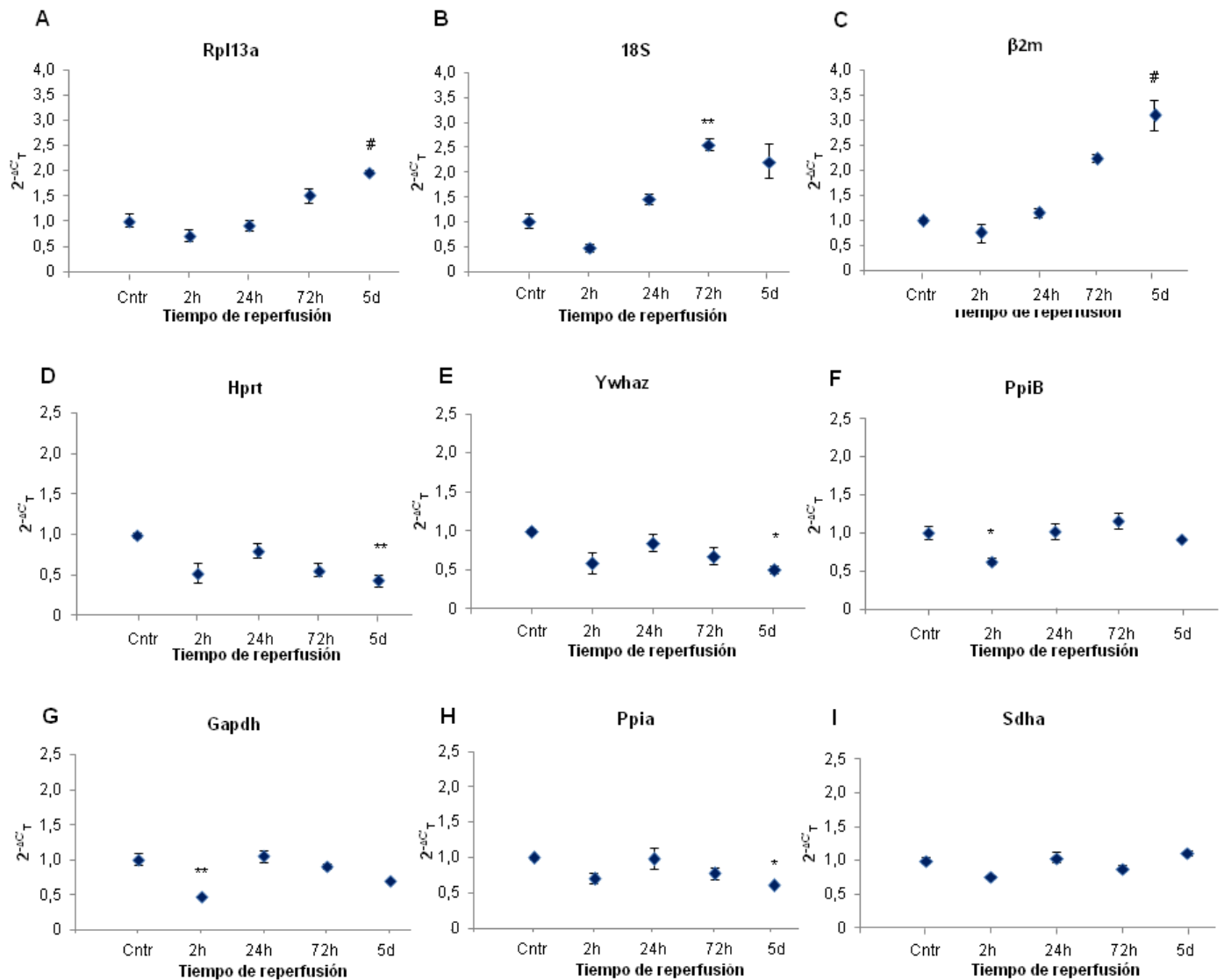


Figura 21. Análisis de la estabilidad génica de diferentes genes como potenciales controles endógenos a diferentes tiempos de reperusión tras someter las RBMEC a las condiciones de POG previamente optimizadas. *= $p < 0.05$; **= $p < 0.01$; #= $p < 0.001$. La estabilidad de expresión génica se determinó mediante qPCR y el método $2^{-\Delta CT}$.

1.3.1 Análisis de la expresión de marcadores de inflamación y angiogénesis en el modelo de POG optimizado

Con el fin de comprobar que se mantenían las características del endotelio vascular cerebral ante el estímulo de las condiciones de ischemia experimental, se analizó el patrón de expresión a nivel de ARNm de COX-2 y VEGF (dos marcadores de inflamación y angiogénesis, respectivamente) en las RBMVEC sometidas al modelo experimental de POG optimizado. Para

este fin se utilizó la técnica de qPCR y los resultados se normalizaron con el gen endógeno previamente optimizado para las condiciones de estudio (*Sdha*). Los resultados de este estudio indicaron que la expresión de COX-2 aumenta significativamente desde las 2 horas ($p < 0,001$) hasta los 5 días ($p < 0,001$) de reperfusión, manifestando un aumento brusco e intenso (entre 15-20 veces la expresión del control) a las 2 horas de reperfusión (Figura 22 A). Respecto a la expresión del gen VEGF, observamos un aumento significativo a las 2 horas ($p < 0,05$), 72 horas ($p < 0,001$) y a los 5 días de reperfusión ($p < 0,001$) después de someter a las RBMVEC a POG utilizando el protocolo 3 (Figura 22 B).

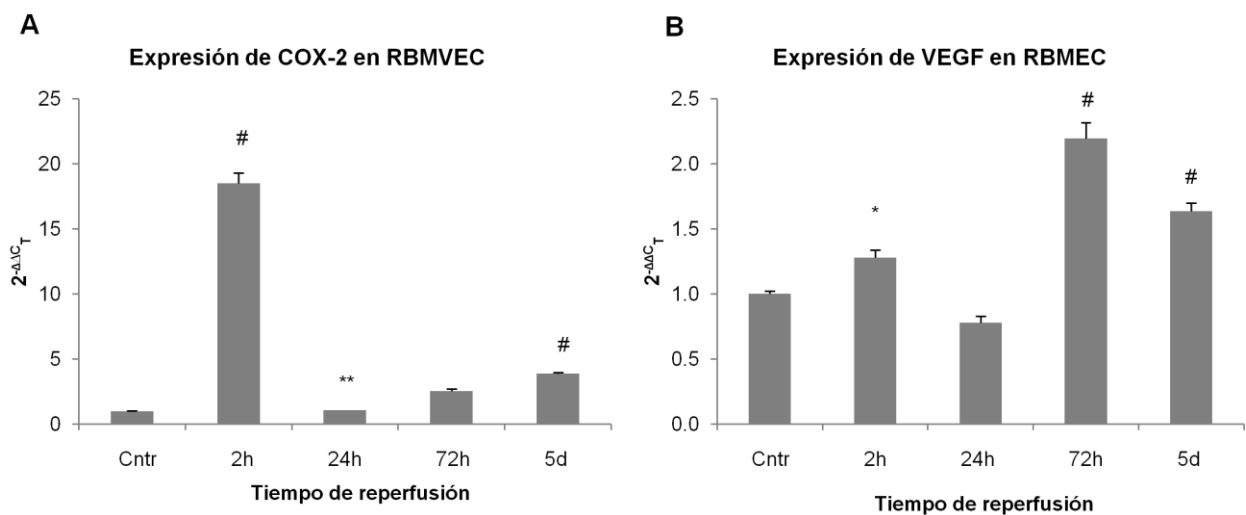


Figura 22. Análisis de la expresión mediante qPCR de COX-2 (A) y VEGF (B) en las RBMVEC a diferentes tiempos de reperfusión (2h, 24h, 72h y 5 días), tras someter las células a POG utilizando el protocolo optimizado. El gen endógeno *Sdha* se utilizó para la normalización de los resultados. *= $p < 0,05$; **= $p < 0,01$; #= $p < 0,001$. Cntrl: control.

Review

Experimental Models for Assaying Microvascular Endothelial Cell Pathophysiology in Stroke

Susanna Camós and Judith Mallolas *

Department of Neurology, Girona Biomedical Research Institute (IdIBGi), Dr. Josep Trueta University Hospital, Av de França s/n, 17007 Girona, Spain; E-Mail: scamos.girona.ics@gencat.cat (S.C.)

* Author to whom correspondence should be addressed; E-Mail: jmallolas.girona.ics@gencat.cat; Tel.: +34-972-94-02-62; Fax: +34-972-22-82-96.

Received: 29 October 2010; in revised form: 29 November 2010 / Accepted: 8 December 2010/

Published: 10 December 2010

Abstract: It is important to understand the molecular mechanisms underlying neuron death following stroke in order to develop effective neuroprotective strategies. Since studies on human stroke are extremely limited due to the difficulty in collecting post-mortem tissue at different time points after the onset of stroke, brain ischaemia research focuses on information derived from *in-vitro* models of neuronal death through ischaemic injury¹³⁷. This review aims to provide an update on the different *in-vitro* stroke models with brain microvascular endothelial cells that are currently being used. These models provide a physiologically relevant tool to screen potential neuroprotective drugs in stroke and to study the molecular mechanisms involved in brain ischaemia.

Keywords: neuroprotection; blood brain barrier; brain endothelial cells; cerebral ischaemia; angiogenesis

1. Introduction

1.1. Neuroprotection in Cerebral Ischaemia

Neurodegenerative disorders and chronic disability due to stroke affect a large sector of the population. The identification of multiple molecular mechanisms and mediators of ischaemic brain injury constituting potential targets of neuroprotection and the development of neuroprotective drugs and therapies are two of the main challenges in stroke research [2,3]. Although neuroprotection for ischaemic stroke has been a subject of intense research for more than half a century, no therapeutic

applications have yet been found [4]. Furthermore, many clinical trials of potential agents have been unsuccessful as the pre-clinical case was not sufficiently well established. To improve this situation, optimal *in-vitro* ischaemic models are needed to study the molecular mechanisms and to test potential neuroprotective drugs prior to considering whether clinical trials are appropriate. To this end, rigorously conducted *in-vitro* studies consisting of oxygen and glucose deprivation assays in cell culture (in an attempt to mimic pathophysiological stroke conditions) are extremely important to provide a reliable, technically straightforward and physiologically relevant model, useful for the study and screening of potential therapeutic targets of neuroprotection against stroke [5]. This review summarizes current knowledge of *in-vitro* ischaemic models with brain microvascular endothelial cells (BMEC) used to study the molecular mechanisms involved in brain ischaemia as well as to assay potential therapeutic strategies with neuroprotective drugs.

1.2. Angiogenesis and Neuroprotection

Angiogenesis, the physiological process involving the growth of new blood vessels from pre-existing vessels, is essential in physiological processes and pathological conditions such as diabetic retinopathy, psoriasis, tumour growth and metastases, and stroke [5]. Folkman was a pioneer in emphasizing the importance of understanding the mechanism of the angiogenic process at the biochemical and molecular levels given the potential diagnostic and therapeutic benefits in a wide range of diseases [6], particularly in tumour angiogenesis [7,8]. The angiogenic process is characterized by a combination of the sprouting of new vessels from the sides and ends of pre-existing ones or by longitudinal division of existing vessels with periendothelial cells (intussusceptions), either of which may then split and branch into precapillary arterioles and capillaries. In order for the process of angiogenesis to proceed properly during physiological and pathological conditions, it is essential that a complex array of angiogenic and anti-angiogenic factors, interacting with multiple cells and tissues, be tightly regulated. Moreover, although endothelial cells are the main cell type in the vascular unit, they cannot complete the angiogenic process alone as they need periendothelial cells and matrix components, which provide molecular and functional support.

Angiogenesis involves a variety of coordinated events, including degradation of the extracellular matrix surrounding the parent vessel, migration and proliferation of the endothelial and mural cells to assemble the new vessel, lumen formation, and construction of the mural cell layer of the vessel wall with associated pericytes and/or smooth muscle cells [9]. In Table 1 we summarize the process that occurs in each step of angiogenesis together with the participating molecules.

A challenge for current research into neuroprotection in stroke is to focus on the angiogenic process [10]. Cerebral endothelial cells perform essential functions including maintenance of the blood brain barrier (BBB) and regulation of vascular tone by release of vasoactive factors. In addition, the endothelium plays a key role in injury responses such as inflammation, angiogenesis, and the release of trophic factors [11,12]. Therefore, the proper function and activity of the brain microvasculature network, specifically of the endothelial cells before and during the cerebral ischaemia is extremely important as it may provide a better response to ischaemic brain injury due to blood flow alterations, performing functions such as biochemical support and maintenance of extracellular ion balance. For

this reason, many studies that aim to study the effect of different neuroprotective agents on neuronal survival in cerebral ischaemia use (BMEC) cultures to perform their experiments.

Table 1. The events occurring in different phases of angiogenesis and the participating molecules.

Phase	Events	Participating molecules
1	Existing vessels dilate, vascular permeability increases and extracellular matrix is degraded.	NO, VEGF, PECAM-1, VE-cadherin, Ang1 and MMPs.
2	Endothelial cells proliferate and migrate as physical barriers are dissolved.	VEGF, angiopoietins, FGFs, integrins, PECAM, Eph/ephrin receptor-ligand pairs, VE-cadherin and members of the connexin family
3	Endothelial cells assemble, form cords and acquire lumens.	VEGF, angiopoietins, integrins.
4	Long-term survival of vascular endothelium: once new vessels have assembled, the endothelial cells become resistant to exogenous factors (quiescent).	p53, p21, p16, p27, Bax and p42/44 mitogen activated protein kinase.
5	Vascular endothelium is differentiated to meet local needs.	BBB Interaction between GFAP, pericytes and angiotensin.
		Tight junctional complex Cadherins, occludins, guanylate kinase homologous proteins

Nitric oxide (NO), vascular endothelial growth factor (VEGF), platelet/endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1), vascular endothelial cadherin (VE-cadherin), angiopoietin-1 (Ang1), matrix metalloproteinases (MMPs), fibroblast growth factors (FGFs), GFAP (glial fibrillary acidic protein).

Protection of the structural and functional integrity of brain microvasculature may, therefore, improve the cerebral ischaemia outcome. Some authors have focused on ischaemic preconditioning (PC) effects in cerebral endothelial cells [13-15]. Ischaemic PC was first described in the heart [16]. In heart tissue, repeated short periods of ischaemia have been found to protect against subsequent longer periods of ischaemia with reperfusion [14]. Subsequent studies have shown that the brain can also be preconditioned to reduce ischaemic brain damage. Brain ischaemia tolerance has been demonstrated both in *in-vivo* [17] and *in-vitro* neuronal cells culture in many studies [13,18-21]. It has been demonstrated that *in-vivo* ischemic PC reduces BBB disruption and brain oedema formation following focal cerebral ischaemia in rat. Moreover, it has also been associated with less induction of heat shock protein 70, a stress marker, in the cerebrovasculature [22,23].

In order to exploit angiogenesis therapeutically in stroke, it is essential that we understand the precise molecular mechanisms involved [10]. This is especially important as some growth factors in post-ischaemic angiogenesis may increase vascular permeability resulting in haemorrhagic transformation [22,24,25]. The aim, therefore, must be to accelerate cerebral angiogenesis without exacerbating brain oedema in stroke [26].

1.2.1. *In-vitro* angiogenesis assays

Different *in-vitro* methods are used to study the effects of a particular treatment or test substance on the angiogenic process. The principal *in-vitro* assays include those for matrix degradation (matrix invasion assays), proliferation (MTT; Thymidine incorporation; BrdU incorporation, cell cycle analysis), apoptosis (TUNEL assay; Annexin V assay), migration (Transwell/Boyden chamber assay; phagokinetic track; wound healing; under agarose assay), and differentiation or tubule formation (matrix assays: Matrigel, collagen/Matrigel, collagen sandwich; 3D gel; co-culture) of endothelial cells, and stem cell organ culture assays (embryoid body; aortic ring assay: rat aortic ring, chick aortic arch, porcine carotid artery; placental vein disk; fetal bone explants: mouse metatarsal assay). Full descriptions of the different specific assays as well as an account of their advantages and limitations can be found in the following reviews [5,27,28].

The assays used for the study of endothelial cell function have the advantages of providing a high level of reproducibility, precision, and sensitivity. Different parameters, such as the spatial and temporal concentration of angiogenic mediators, can be controlled and individual steps in the angiogenic process can be studied separately. These assays have the further advantage of being relatively inexpensive. The most important limitations are that they are technically difficult to set up and comparison between different studies is difficult due to the diversity of reagents employed (endothelial cell origin and passage number, content of Matrigel substrate, growth medium).

Whole or partial organ culture assays are considered to be those which come closest to mimicking the *in-vivo* situation given that they include the surrounding non-endothelial cells (smooth muscle cells and pericytes) as well as a supporting matrix. These explants assays are more representative of the situation found *in vivo* where angiogenesis is triggered and quiescent endothelial cells respond by becoming proliferative, migrating out from the existing vessels, and differentiating into tubules. However, there are still important limitations. Amongst these are the fact that non-human tissues are used and that these models use large vessels whereas angiogenesis is a microvascular event. Moreover, the assays using explant tissues from growing embryos are not truly representative of the stimulation of non-proliferative endothelial cells since endothelial cells undergo proliferation before explantation. In Table 2, we summarize the advantages and limitations of the most important *in-vitro* angiogenesis assays used with endothelial cells and organ culture.

To fully understand the effects of a particular test substance on the process of angiogenesis, more than one *in-vitro* assay must be used to investigate the different steps in the pathway using endothelial cells from different sources. These should be followed with more than one *in-vivo* assay to ensure that *in-vitro* and *in-vivo* results correlate.

Table 2. Advantages and limitations of the most important *in-vitro* angiogenesis assays used with endothelial cells and organ culture.

	Type of assay	Specific assay	Advantages	Main limitations
Endothelial cells	Matrix degradation	Matrix invasion assay	<ul style="list-style-type: none"> -High sensitivity -High reproducibility -Allow precise quantifications -Control of the different parameters involved in the angiogenesis -Ability to study individual steps of angiogenesis 	<ul style="list-style-type: none"> -Technical difficulty of setting up the assays -Difficulty of comparing different studies due to the diversity of reagents used
	Proliferation	MTT assay Thimidine incorporation BrdU incorporation Cell cycle analysis		
	Apoptosis	TUNEL assay Annexin V assay		
	Migration	Boyden chamber assay phagokinetic track wound healing under agarose assay		
	Differentiation and morphogenesis	Matrix assay on Matrigel Matrix assay on collagen/Matrigel collagen sandwich 3D gel co-culture		
Organculture assay	Aortic and carotid ring assays	Rat aortic ring Mouse aortic ring Chick aortic arch Porcine carotid artery	<ul style="list-style-type: none"> -Closest mimicking of the <i>in-vivo</i> situation as the surrounding non-endothelial cells and supporting matrix are included -Endothelial cells are quiescent in explant tissue, as <i>in-vivo</i> angiogenesis 	<ul style="list-style-type: none"> -Non-human tissues -Large vessels assays are far from being ideal <i>in-vivo</i> angiogenic conditions -Explant tissue from growing embryo does not preserve the endothelial cells in a quiescent state
	Tissue from growing embryos	Placental vein disk Fetal bone explants: Mouse metatarsal assay		
	Embryoid body assay			

2. *In-Vitro* Cerebral Ischaemic Models with Microvascular Endothelial Cells

Oxygen-glucose deprivation (OGD) experiments aim to study a variety of pathologies involving ischaemic processes. They consist of an *in-vitro* system that mimics several important aspects of ischaemia, including low oxygen pressure, low nutrient levels (glucose), and the accumulation of cellular products thought to contribute to damage during ischaemia [29]. Given this, these experiments are used to mimic the physiopathological conditions in stroke, in order to study the response of BMECs to ischaemia and to evaluate how changes in their function might affect neuronal survival and recovery after ischaemia. The OGD experimental model consists of replacing the conventional culture

medium by a buffer solution or another medium without glucose (sometimes deoxygenated by bubbling with N₂) and transferring the cells (cerebral endothelial cells, in this case) to a temperature controlled hypoxia chamber (37 °C ± 1) connected to a constant N₂ flux maintained in a humidified atmosphere. A reperfusion protocol is then performed which consists of replacing the OGD medium with a glucose-containing medium (conventional medium or OGD medium supplemented with glucose) and then transferring the cells to a normoxic incubator to mimic the establishment of the brain blood flow and post-stroke reoxygenation.

This *in-vitro* system was initially used in 1988 by Hlatky *et al.*, in their oncological studies to mimic necrosis conditions [30]. In 1998 Berger *et al.*, used cortex slices and submitted them to OGD conditions in order to perform ischaemic studies [31]. Over the last ten years OGD has been widely used as an *in-vitro* stroke model with a variety of cellular types (in a single or co-culture system) from different species in numerous ischaemia-related studies.

2.1. Cellular Model

The endothelium presents phenotypic heterogeneity and differential features depending on the context of the individual vascular beds or organs. Endothelial cells in arteries are long and narrow and are aligned in the direction of undisturbed flow. The arterial endothelium is continuous with many tight junctions and is characterized by the expression of specific markers including Ephrin B2, DII4 (delta-like 4), ALK1 (activin-receptor-like kinase), EPAS-1 (endothelial PAS domain protein 1), Hey1/2, Depp (decidual protein induced by progesterone), and NRP1 (neuropilin 1). The vein endothelium is also continuous but the cells are shorter and wider and are not aligned in the direction of the blood flow and they possess valves. Specific markers include EphB4, NRP2, and COUP-TFII. The post-capillary venule endothelium is characterized by having thin areas of caveolae and thick portions of VVOs (vesiculo-vacuolar organelles) as well as disorganized tight junctions, reflecting the role of this blood vessel type in mediating inflammation-induced extravasation of leukocytes and plasma constituents. Finally, the capillary endothelial cells are highly adapted to underlying tissues, have well developed tight junctions that are tighter than arteries and collecting veins, have more caveolae than arteries and veins, except those found within the blood-brain barrier, and have many phenotypic differences between different vascular beds. ADN microarray studies of endothelial cells cultured from different sites of the human vasculature have revealed differences in the transcriptional profiles between arterial and venous endothelial cells as well as between macrovascular and microvascular endothelial cells. Moreover, differences in growth factor receptor expression have been reported between arterial and venous endothelial cells [27,32-34].

In addition to the previously mentioned differences, brain endothelial cells possess unique morphological and functional characteristics [32, 33]. The cerebral endothelium is continuous and is characterized by both a lack of fenestration and by the presence of complex tight junctions between endothelial cells which confer much greater resistance than peripheral endothelial cells. Furthermore, brain endothelial cells possess an increased number of mitochondria and a low number of pinocytotic vesicles that limit endocytosis and transcytosis. Endothelial cells in the brain are exposed to numerous astroglial-derived paracrine factors that are essential for the maintenance of the blood brain barrier. These anatomical features allow brain endothelial cells to deliver oxygen, glucose and other nutrients

rapidly in order to meet the high metabolic demands of the brain and to participate to the formation of the BBB [35].

Different cellular models from rat, human, mouse, bovine and porcine brain endothelial cells have been used in reports of OGD experiments with the same objective of mimicking as closely as possible the pathological conditions of the vascular system in the ischaemic brain. Most of the studies in which experiments are performed with human brain endothelial cells have used primary culture of human cerebrovascular endothelial cells (HCEC) [36-45] or immortalized human brain capillary endothelial cells (hCMEC/D3) [46-49]. A recent study by Vukic *et al.*, also used primary HBEC cultures and the hCMEC/D3 cell line, but in this case they did not perform OGD experiments. These culture models are used to analyze the molecular signalling pathway responsible of neuroinflammation in Alzheimer's disease [50]. HCEC are usually characterized by their cobblestone appearance of confluent monolayer, typical of microvascular endothelium in culture, the incorporation of fluorescently labelled acetylated-low density lipoprotein DiI Ac-LDL and high levels of expression of the cerebral endothelium specific enzymes, γ -glutamyl-transpeptidase (γ -GTP) and alkaline phosphatase (ALP). The purity of HCEC cultures is assessed by immunocytochemical staining for factor VIII-related antigen and lack of staining for smooth muscle α -actin. The hCMEC/D3 cell line shows a similar morphology to primary cultures of brain endothelial cells, with confluent monolayers of tightly packed elongated cells that exhibit contact inhibition. This cell line maintains a non-transformed phenotype and the capacity to form a branched network of capillary-like cords on reconstituted extracellular matrix. It constitutively expresses many endothelial and/or BBB markers including the junctional proteins PECAM-1, VE-cadherin, β - and γ -catenins, zona occludens 1 (ZO-1), junctional adhesion molecule-A (JAM-A), and claudin-5. It has been reported that the hCMEC/D3 cell line recapitulates most of the unique properties of brain endothelium and may thus constitute a well established *in-vitro* model of the human BBB [51]. In the case of Poller *et al.*, this line was used to undertake drug transport studies in this model [52]. In 1997, Muruganandam *et al.*, developed an immortalized human cerebral microvascular endothelial cell line (SV-HCEC) as an *in-vitro* model of the BBB [53] although to date they have used this principally to study the properties of the human BBB rather than to conduct OGD experiments.

Unfortunately, human samples, which are best able to mimic *in-vivo* conditions of patients, are often difficult to obtain. For this reason, some authors use other cellular models such as primary rat brain microvascular endothelial cells (rBMEC) from adult and young rats [13,54-58]. The primary rat endothelial cells cultures are identified with factor VIII related antigen, occludins and von Willebrand factor. There also exist different well characterized immortalized rat brain endothelial cell lines, including TR-BBBs, rBCEC4 (conditionally immortalized) and RBE4, GP8/3.9, GPNT, RBEC1. Different studies have used these immortalized cell lines as an *in-vitro* model to perform OGD experiments [48,59-64]. These models have made a significant contribution to our current knowledge of the BBB transport function despite the important limitation of having high paracellular permeability to small molecules unlike the BBB.

Other studies report the use of primary mouse brain microvascular endothelial cells (mBMEC) [14,65-69] as well as mouse immortalized brain endothelial cell lines such as bEnd.3 [12,14,68,70-76] and MBEC4 [77-79]. Other immortalized mouse brain endothelial cell lines include TM-BBB1-5, S5C1-11, bEnd5 although most have been used to perform BBB transport and toxicokinetic studies. mBMEC

purity is usually examined based on the expression of factor VIII, vimentin and exhibiting bradykinin receptor function. bEnd.3 line, on the other hand, is obtained from polyoma middle T antigen transformed 6-week mice (BALB/c) brain cerebral cortex. The endothelial nature of the cells is confirmed by the expression of von Willebrand factor and the uptake of fluorescently labelled LDL. Intracellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) and vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1) are constitutively expressed on the cells. The expression of Peyer's Patch high endothelial receptor for lymphocytes, the mucosal vascular addressin (MAdCAM-1) and E-selectin can be induced on bEnd.3 cells by cytokines and lipopolysaccharide (LPS).

Some studies have used primary bovine brain capillary endothelial cell (BCEC) culture to perform OGD experiments [80-86]. Immortalized bovine brain endothelial cell lines such as SV-BEC and t-BBEC117 have also been used in some studies, but in this case, in order to characterize and analyze their BBB properties. BCEC purity is usually evaluated based on the positive expression of factor VIII and vimentin and exhibits the characteristic bradykinin receptors. Primary porcine brain endothelial cells (PBEC) have also been used in different studies that aim to analyse the effect of ischaemia and hypoxia on these brain endothelia cells [48,87-90].

Finally, isolated brain microvessels, usually from rat [91-97], mouse [98, 99] and gerbil [100, 101] submitted to experimental cerebral ischaemia, have been used by different authors. In Tables 3A and 3B, the most important studies performed with primary and immortalized brain endothelial cells submitted to experimental ischaemia are summarized.

Table 3A. Studies performed with primary brain endothelial cells submitted to experimental ischaemia.

Origin	Specific line	Characteristics and purity assessment	Authors
Human	HCEC	-Cobblestone appearance -DiI Ac-LDL uptake - γ -GTP, ALP high expression -Staining for factor VIII related antigen, no α -actin	Stanimirovic <i>et al.</i> , 1997 [42] Howard <i>et al.</i> , 1998 [40] Zhang <i>et al.</i> , 1999 [43] Zhang <i>et al.</i> , 2000 [44] Griffin <i>et al.</i> 2004 [37] Slevin <i>et al.</i> , 2009 [41] Allen C <i>et al.</i> , 2010 [36] Guo S <i>et al.</i> , 2010 [38] Haarmann <i>et al.</i> , 2010 [39] Zhu <i>et al.</i> , 2010 [45]
Rat	rBMEC	-Factor VIII related antigen, occludins and von Willebrand factor expression	Hiu T <i>et al.</i> , 2008 [56] Domoki <i>et al.</i> , 2008 [54] Liu <i>et al.</i> , 2008 [58] An <i>et al.</i> , 2009 [13] Li <i>et al.</i> , 2009 [57] Du <i>et al.</i> , 2010 [55]

Table 3A. *Cont.*

Mouse	mBMEC	-Expression of factor VIII, vimentin -Exhibition of bradykinin receptor function	Andjelkovic <i>et al.</i> , 2003 [14] Yin <i>et al.</i> , 2002, 2010 [69,99] Hu <i>et al.</i> , 2006 [65] Yang <i>et al.</i> , 2007 [68] Milner <i>et al.</i> , 2008 [66] Narasimhan <i>et al.</i> , 2009 [67]
Bovine	BCEC	-Positive expression of factor VIII and vimentin -Exhibits the characteristic bradykinin receptors	Xu <i>et al.</i> , 2000 [86] Brillault <i>et al.</i> , 2002 [82] Dehouck <i>et al.</i> , 2002 [84] Abbruscato <i>et al.</i> , 2004 [80] Benchenane <i>et al.</i> , 2005 [81] Paulson <i>et al.</i> , 2006 [85] Culot <i>et al.</i> , 2009 [83]
Porcine	PBMEC	-Factor VIII related antigen, vimentin, laminin, ACE expression -Negative expression for α -actin	Beetsch <i>et al.</i> , 1998 [87] Fischer <i>et al.</i> , 1996 [89] Fischer <i>et al.</i> , 2002 [48] Fischer <i>et al.</i> , 2004 [90] Elfeber <i>et al.</i> , 2004 [88]

Table 3B. Studies performed with immortalized brain endothelial cells submitted to experimental ischaemia.

Origin	Specific line	Characteristics and purity assessment	Authors
Human	hCMEC/D3	-Maintains a non-transformed and a contact-inhibition phenotype -Branched network on extracellular matrix -BBB markers: PECAM-1, VE-cadherin, β - and γ -catenins, ZO-1, JAM-A, claudin-5	Cowan <i>et al.</i> , 2010 [46] Cucullo <i>et al.</i> , 2008 [47]
Rat	RBE4	-Contact-inhibited monolayer, spindle-fibre shape -Factor VIII, E-cadherin, ICAM-1, Endothelin-1 expression	Rabbin <i>et al.</i> , 1996 [62] Chow <i>et al.</i> , 2001 [60] Fischer <i>et al.</i> , 2002 [48] Yu <i>et al.</i> , 2007 [64]
	GPNT	-Spindle-fibre shape -Factor VIII, α , β and γ -catenin, ICAM-1, VCAM-1 expression -AcLDL uptake	Robertson <i>et al.</i> , 2009 [63]
	rBCEC4	-Contact-inhibited monolayer, endothelial cell shape -Factor VIII, ACE expression	Davis <i>et al.</i> , 2010 [61]

Table 3B. Cont.

Mouse	bEnd.3	-Positive expression of von Willebrand factor, ICAM, VCAM -Uptake of fluorescent labelled LDL -Peyer's Patch high endothelial receptor, MadCAM-1, E-selectin induction by cytokines and LPS	Andjelkovic <i>et al.</i> , 2003 [14] Li <i>et al.</i> , 2006 [72] Yang <i>et al.</i> , 2007 [68] Roitbak <i>et al.</i> , 2008 [74] Tixier <i>et al.</i> , 2008 [75] Yan <i>et al.</i> , 2008 [76] Lee <i>et al.</i> , 2009 [71] Plane <i>et al.</i> , 2010 [73] Guo <i>et al.</i> , 2010 [12] Jung <i>et al.</i> , 2010 [70]
	MBEC4	-Uptake of fluorescent labelled LDL -ALP and γ -GTP activity	Yamaji <i>et al.</i> , 2003 [79] Dohgu <i>et al.</i> , 2007 [77] Nishioku <i>et al.</i> , 2007 [78]

Angiotensin-converting enzyme (ACE), acetylated low density lipoprotein (AcLDL), intercellular adhesion molecule (ICAM), vascular cell adhesion molecule (VCAM), mucosal addressin cell adhesion molecule (MadCAM-1), alkaline phosphatase (ALP), γ -glutamyl transpeptidase activity (γ -GTP), lipopolysaccharide (LPS).

Using primary or immortalized endothelial cell lines has both advantages and limitations. The primary brain capillary endothelial cells have the closest similarity to the BBB *in-vivo* phenotype and exhibit excellent characteristics of the BBB at early passages. However, they are extremely time consuming and costly to generate, are easily contaminated by other neurovascular unit cells (losing their BBB characteristics over passages), rapidly undergo senescence after a limited number of divisions and require a high level of technical skill to perform their extraction from brain tissue. On the other hand, immortalized lines allow the BBB characteristics to be maintained over many passages, permit the formation of functional barriers, are amenable to numerous molecular interventions, are easy to grow, maintain the functionality of some cell transporters, facilitate the transfer of the model between different laboratories, and have a low cost [102]. However, the introduction of immortalizing genes (such as SV40 large T-antigen) may affect a wide variety of cellular functions as they may interact with numerous proteins, altering the physiological cell cycle [103].

2.2. Co-Culture

In recent years, the study of the central nervous system has grown to encompass studies of more than a single cell type, recognizing that positive or negative signal transmission exists in different types of brain cells. Signal transmission and coupling among these cells constitute the basis of normal brain function whereas disorderly signal transmission and coupling provides the pathological basis of brain dysfunction and disease [104]. Therefore, in order to better simulate the *in-vivo* pathological conditions of stroke, OGD exposure can be performed on co-cultures consisting of BMECs with other brain glial or neuronal cells. These models represent an excellent tool with which to study the consequences of ischaemic stroke on brain capillaries, neuronal survival and glial function.

2.2.1. Brain endothelial cells and astrocytes

The BBB is a dynamic interface between the blood and the central nervous system that controls the rate of influx and efflux of biological substances needed for the brain metabolic processes and neuronal function. BBB dysfunction and permeability changes (tight junction alterations) are observed in most neurological diseases including stroke [105]. The use of cultured vascular endothelial cells has significant drawbacks. Apart from being time consuming, there is a loss of endothelial cell specific markers following prolonged *in-vitro* culturing, reproducibility of the high electrical resistance found in the BBB *in situ* is poor, non-endothelial cell contamination is difficult to avoid, and the culture is relatively expensive [106,107]. These disadvantages have led to the development of more reliable *in-vitro* models. Although some investigators have attempted to imitate the *in-vivo* brain environment using glia/endothelial co-cultures (conventional co-cultures or static BBB models) [108,109], others have alternatively attempted to mimic the physiological environment of microvascular endothelial cells by exposing the cells to flow in order to develop a dynamic *in-vitro* BBB model (DIV-BBB). The most commonly used static BBB model consists of a porous membrane support submerged in feeding medium called a Transwell apparatus. The bi-dimensional Transwell system is characterized by a side-by-side diffusion system. Several authors have used this system with different cellular models. Lauer *et al.*, for example, used the permanent microvascular endothelial cell line PBMEC/C1-2 from porcine brains co-cultured with rat C6 glioma cells to perform permeability studies [110]. Malina *et al.*, used primary cultures of porcine brain endothelial cells (PBEC) co-cultured in contact and non-contact with rat brain glial cells [111]. Garberg *et al.*, compared two primary cell systems: BBEC/astrocytes (bovine brain endothelial cells co-cultured with rat astrocytes) and HPBEC/astrocytes (human primary brain endothelial cells co-cultured with human primary astrocytes) with two transformed cell lines: SV-ARBEC/astrocytes (rat endothelial cells co-cultured with rat astrocytes) and MBEC4 (immortalized mouse brain microvascular endothelial cells) [112]. Li *et al.*, compared four *in-vitro* BBB models: bEnd3 monoculture, bEnd3 co-cultured with astrocytes, co-cultured with two basal membrane substitutes: collagen type I and IV mixture, and Matrigel in its permeability studies [102]. These studies, which were performed to study the permeability properties of the different *in-vitro* models in control conditions, assess BBB function with permeability assays that can be performed with fluorescence, isotope labelled tracers such as mannitol glucose and inulin, with TER (transendothelial electrical resistance) measurement, and electric cell-substrate impedance sensing (ECIS) [102].

Other authors have adapted the *in-vitro* BBB cell model to ischaemic conditions by submitting the culture to OGD. Brillault *et al.*, for example, used an *in-vitro* model of the BBB generated by growing bovine brain capillary endothelial cells (BBEC) above rat glial cells to perform permeability studies [82]. When endothelial cells (ECs) were incubated with glial cells, it was found that a shorter OGD time was required to increase EC permeability than for ECs alone. Conditioned medium experiments were also performed in this study, showing that glial cells secreted soluble permeability factors during OGD and so, in response, the ECs become more sensitive to the process. Braillault *et al.*, highlighted the importance of the duration of the co-culture (they used 12 days) and the species of glial cells used in the model of co-culture (3-week-old culture containing 60% GFAP-positive cells and 40% non-astrocyte cells) in order to allow a complete differentiation and stabilization of the glial cells. After performing the co-culturing experiments, they separately submitted EC and astrocytes to OGD

conditions. Finally, they performed permeability studies on EC incubated with glial conditioned medium. Benchenane *et al.*, also used an *in-vitro* BBB model based on BBMEC and rat glial cells to study tPA transport across the BBB in OGD conditions [81]. Similarly, some authors have used BBMEC cultured with astrocyte conditioned medium (from C6 cells) as an *in-vitro* BBB model [80,85]. Other recent studies by Allen *et al.*, have aimed to explore in a co-culture consisting of human brain endothelial cells with human astrocytes whether small GTPase RhoA and its effector protein Rho kinase are involved in permeability changes mediated by OGD [36]. Mysiorek *et al.*, used rat brain capillary endothelial cells with rat glial cells to study whether peroxisome proliferator-activated receptor α (PPAR- α) activation acts on BBB permeability in ischaemic conditions [113]. Finally, Cowan and Easton used the immortalized human brain endothelial cell line hCMEC/D3 to study the effect of neutrophils on the increase in BBB permeability associated with ischaemia. This study proved that OGD induces reversible increases in the cell line permeability and showed that neutrophils mitigate increases in permeability [46].

On the other hand, the DIV-BBB originated from a modification of a cell culture system that was used for hybridoma cell expansion. This three-dimensional system provides quasi-physiological experimental conditions for culturing endothelial cells and astrocytes in a capillary-like structure consisting of hollow fibre tubes (mimicking capillary vessels) inside a sealed chamber (representing the extraluminal space) that enables co-culturing of endothelial cells with extraluminally seeded glia, where endothelial cells develop a morphology that closely resembles the endothelial BBB-specific phenotype (low permeability, negligible extravasation of proteins, expression of glucose transporter, expression of BBB-specific ion channels) *in situ* as they are exposed to shear stress [107,114]. The entire apparatus resides in a water-jacketed incubator with 5% CO₂ and can be sterilely sampled by moving it inside a laminar flow hood. Different studies have used bovine aortic endothelial cells (BAEC) co-cultured with C6 rat glioma cells in a dynamic BBB model [107,114-118]. Cucullo *et al.*, compared four different human endothelial cell types: AVM-ECs (arteriovenous malformations surgically removed from patients), HUVEC and HBMEC (primary) and HCMEC/D3 (immortalized), co-cultured with human astrocytes. They concluded that the HCMEC/D3 cell line maintains the *in-vitro* physiological permeability barrier properties of the BBB, even in the absence of abluminal astrocytes [47]. In a recent study, Cucullo *et al.*, have presented an improved DIV-BBB model composed of normal adult human brain microvascular endothelial cells and human adult astrocytes to study how haemodynamic changes and systemic inflammation affect the integrity of the brain microvasculature. This new model has the novelty of having transcapillary microholes to enable transendothelial cell trafficking between the vascular and the parenchymal compartment [119].

The advantages and limitations of each type of BBB model together with some of the most significant authors that have used the corresponding models are set out in Table 4.

Table 4. Advantages and limitations of the different *in-vitro* BBB models and some representative studies.

	Authors	Advantages	Limitations
BBBstaticmodel(Transwellssystem)	- Brillault <i>et al.</i> , 2002 [82]		-Lack of physiologic shear stress due to absence of intraluminal flow (endothelial cell differentiation and loss of BBB phenotype) -The tightness measured by TEER and permeability is much less stringent than <i>in vivo</i> -The endothelial cells pile up in a multilayer fashion due to lack of antimitotic influences by laminin and flow
	-Abbruscato <i>et al.</i> , 2004 [80]		
	-Benchenane <i>et al.</i> , 2005 [81]	-Low cost	
	-Paulson <i>et al.</i> , 2006 [85]	-Repeatability	
	-Mysiorech <i>et al.</i> , 2009 [113]	-Feasibility of performing high-throughput screening	
	-Allen <i>et al.</i> , 2010 [36]		
	-Cowan <i>et al.</i> , 2010 [46]		
BBBdynamicmodel	-Stannes <i>et al.</i> , 1996 [116]	-Endothelial cells grow with flow as in <i>in-vivo</i> conditions	- The system does not allow the study of the effects of turbulent or otherwise altered flow - The model does not include all the elements of the brain environment (neurons, microglia, <i>etc.</i>) -The hollow fibre wall (basal membrane) has greater thickness than vessels in the brain
	-Stannes <i>et al.</i> , 1997 [117]	-Enables real-time continuous monitoring of BBB functions (via electrodes inserted in the luminal and abluminal compartments)	
	-Pikney <i>et al.</i> , 1998 [115]	-Allows the study of the response to different shear stress: brain capillaries to larger vessels	
	-Stannes <i>et al.</i> , 1999 [118]	-Allows on-line computer BBB integrity assessment (TEER monitoring)	
	-Santaguida <i>et al.</i> , 2006 [107]		
	-Cucullo <i>et al.</i> , 2002 [114]		
	-Cucullo <i>et al.</i> , 2010 [119]		

2.2.2. Brain endothelial cells and neurons

Given the lack of a close anatomical connection between BMECs and neurons, it used to be assumed that their relationship was indirectly mediated by astrocytes [57]. However, a study published in 2003 by Carmeliet *et al.*, [120] provided strong evidence for the direct functional correlation between BMECs and neurons. On investigating the hemodynamic neurovascular coupling mechanisms and the relationship between neurogenesis and angiogenesis, it was found that there was communication between endothelial cells and neurons by mutual coordination both in the regulation of local cerebral blood flow and the initiation of repair following injury. Many more recent studies have also demonstrated the relationship between BMECs and neurons, but most have only examined these connections in physiological conditions. Li *et al.*, aimed to elucidate the effect of paracrine signalling of rat BMECs in pathological conditions on rat cortical neuron survival. Normal and injured neurons were treated with EC-N-CM (endothelial cells normal conditioned medium) and EC-I-CM (endothelial

cells ischaemia conditioned medium), respectively, in order to find the relationship between the two kinds of cells in both the physiological state and cerebral ischaemia. The authors found that EC-N-CM had no apparent role on the normal neurons, but had a neuroprotective effect on injured neurons. Once endothelial cells were injured, the neuroprotective effect disappeared and in fact became neurotoxic. When the ischaemic injury was initiated, the neurotoxic effect was found to further induce the injury on neurons and to promote neuron death. Paracrine signalling of BMECs was concluded to play a role in the survival of neurons, and that this role changed depending on whether the conditions were normal or pathological [57].

Roitbak *et al.*, used a direct and a Transwell co-culture model with mouse neural stem/progenitor cells (NSPC) and mouse brain endothelial cells (bEnd.3) to examine the interactions between the two cellular types in the context of ischaemia both *in-vitro* and *in-vivo* (NSPC intracerebral mice transplantation subjected to transient middle cerebral artery occlusion). To this end, cells were submitted to three hours of OGD using deoxygenated glucose-free Earl’s Balanced Salt Solution [74]. This study lends support to NSPCs having a proangiogenic role under ischaemic conditions through HIF-VEG signalling pathways.

2.3. In-Vitro Ischaemic Media

Different oxygen-glucose deprivation media are currently being used to perform *in-vitro* ischaemic experiments with microvascular endothelial cells (see Table 5). Glucose-free Krebs solution is a common buffer used in OGD experiments to mimic *in-vitro* brain ischaemic conditions. It was first used by Pedata *et al.*, in ischaemic experiments with hippocampal slices [121] and has since been used to submit rat [55,57] and human [42,43,45] BMECs to ischaemic conditions.

Table 5. Composition of the different media used in the different studies performed with brain endothelial cells submitted to OGD.

OGD	Composition/description	Species	Authors
Glucose-free Krebs solution	NaCl (119 mM), KCl (4.7 mM), KH ₂ PO ₄ (1.2 mM), NaHCO ₃ (25 mM), CaCl ₂ (2.5 mM), and MgCl ₂ (1 mM)	Human	Stanimirovic <i>et al.</i> , 1997 [42] Zhu <i>et al.</i> , 2010 [45] Zhang <i>et al.</i> , 1999 [43]
		Rat	Li <i>et al.</i> , 2009 [57] Du <i>et al.</i> , 2010 [55]
Glucose-free HBSS	CaCl ₂ (1.26 mM), MgCl ₂ ·6H ₂ O (0.493 mM), MgSO ₄ ·7H ₂ O (0.407 mM), KCl (5.33 mM), KH ₂ PO ₄ (0.441 mM), NaHCO ₃ (4.17 mM), NaCl (137.93), and Na ₂ HPO ₄ (0.338 mM)	Human	Zhang <i>et al.</i> , 2007 [122] Allen <i>et al.</i> , 2010 [36]
		Mouse	Yin <i>et al.</i> , 2002 [69] Hu <i>et al.</i> , 2006 [65] Narasimhan <i>et al.</i> , 2009 [67] Yin <i>et al.</i> , 2010 [99]
		Bovine	Xu <i>et al.</i> , 2000 [86]

Table 5. Cont.

Glucose-free EBSS	KCl, NaHCO ₃ , NaCl, NaH ₂ PO ₄ -H ₂ O additional components may be found	Mouse	Roitbak <i>et al.</i> , 2008 [74]
		Rat	Domoki <i>et al.</i> , 2008 [54]
Glucose-free BSSO.O	NaCl (116 mM), CaCl ₂ (1.8 mM), MgSO ₄ (0.8 mM), KCl (5.4 mM), NaH ₂ PO ₄ (1 mM), NaHCO ₃ (14.7 mM), and HEPES [4-(2-hydroxyethyl)-1- piperazineethanesulfonic acid] (10 mM, pH 7.4)	Mouse	Jung <i>et al.</i> , 2010 [70] Guo <i>et al.</i> , 2010 [12]
Glucose-free DMEM solution	Dulbecco's modified Eagle's medium without glucose	Human	Cowan <i>et al.</i> , 2010 [46] Andjelkovic <i>et al.</i> , 2003 [14]
		Mouse	Lee <i>et al.</i> , 2009 [71] Plane <i>et al.</i> , 2010 [73] Lee <i>et al.</i> , 2010 [123]
		Rat	An <i>et al.</i> , 2009 [13]
Serum- lightened medium	serum-lightened (5% v/v serum) and low-glucose (0.2 g/L) Bovine		Brillault <i>et al.</i> , 2002 [82] Culot <i>et al.</i> , 2009 [83]
Conventional medium	Medium used in the conventional culture conditions with low glucose concentrations or without glucose	Human	Slevin <i>et al.</i> , 2009 [41]
		Mouse	Milner <i>et al.</i> , 2007 [66] Dehouck <i>et al.</i> , 2002 [84]
			Abbruscato <i>et al.</i> , 2004 [80]
		Bovine	Benchenene <i>et al.</i> , 2005 [81] Paulson <i>et al.</i> , 2006 [85]

Balanced salt solutions, based on the physiological saline solution first developed by Ringer, are also used as ischaemic medium to submit cerebrovascular endothelial cells to OGD experiments. These solutions are composed of inorganic salts which maintain cells in a viable state rather than promoting growth. Glucose-free Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS) is a commercially available medium buffered with phosphate that contains the salt composition indicated in Table 5, although this can vary slightly from one manufacturer to another. This solution contains the same inorganic salts as glucose-free Krebs solution, although the concentrations vary, and additionally contains magnesium sulphate (MgSO₄·7H₂O) and anhydrous dibasic sodium phosphate (Na₂HPO₄).

Several authors have used deoxygenated glucose-free HBSS to mimic *in-vitro* ischaemia-like conditions in mouse cerebral vascular endothelial cells [65,67,69,99], bovine cerebral endothelial cells [86] and human brain microvascular endothelial cells (HBMEC) [36,122].

Another balanced salt solution also used in the cerebromicrovascular endothelial cells OGD model is deoxygenated glucose-free Earl's Balanced Salt Solution (EBSS). The basic formulation consists of potassium chloride (KCl), sodium bicarbonate (NaHCO₃), sodium chloride (NaCl), and sodium

phosphate monobasic ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) but additional components may be found. Domoki *et al.*, and Roitbak *et al.*, performed the OGD experiments with the EBBS medium using rat and piglet cerebromicrovascular endothelial cells and mouse brain endothelial cells, respectively, as ischaemic *in-vitro* models [54,74].

Recent studies such as Jung *et al.*, and Guo *et al.*, also used a deoxygenated glucose-free balanced salt solution but with slightly different concentrations and compositions of the inorganic salts (without MgCl_2 and KH_2PO_4 but with NaH_2PO_4 and HEPES) [12,70]. This medium, called BSSO.O as it consists of 0.0 mM of glucose. The salt composition can be annotated in table 5. Immortalized mouse brain endothelial cell lines (bEnd.3) were used in the two studies.

A deoxygenated glucose-free DMEM solution has been used in various studies with different animal models, including primary rBMECs [13], mouse brain endothelial cell culture (mBMEC and bEnd.3) [14,71,73,123] and a human brain endothelial cell line (hCMEC/D3) [46].

Brillault *et al.*, and Culot *et al.*, performed OGD experiments with bovine brain capillary endothelial cells (BBECs) and used a serum-lightened (5% v/v serum) and low-glucose (0.2 g/L) medium equilibrated with nitrogen in order to mimic the ischaemic conditions. They used this serum-lightened medium to avoid temporary permeability-increasing artefacts due to serum growth factors as their aim was to investigate the effect of ischaemia on permeability changes [82, 83].

Finally, Dehouck *et al.*, Abbruscato *et al.*, Slevin *et al.*, and Paulson *et al.*, submitted human (HBMEC) [41] and bovine (BCEC) [80, 84, 85] brain microvessel endothelial cells to OGD using conventional medium without glucose, previously equilibrated in the hypoxic chamber. Similarly, Milner *et al.*, and Benchenane *et al.*, exposed primary cultures of murine [66] and bovine [81] brain endothelial cells to OGD using conventional medium with low glucose concentrations and also equilibrated in a hypoxic chamber.

2.4. Time of OGD Treatment

In order to mimic the ischaemic conditions as closely as possible, it is important to fix and determine the optimal period of time that cerebromicrovascular endothelial cells will be submitted to OGD conditions. This will vary depending on the cellular type, the ischaemic medium used and, especially, the purpose of the study.

As previously reported, PC (with brief, non-lethal ischaemia) can reduce the injury of subsequent severe ischaemia. This phenomenon described in several organs is called ischaemic tolerance. Ischaemic PC stimuli can be either a short period of global ischaemia or a short period or periods of focal cerebral ischaemia. Some authors use the PC protocol in combination with OGD, in order to elucidate the role of this process plays in the decrease of cell injury after OGD treatment. *In-vitro* ischaemic PC studies have allowed the use of such cultures to examine the mechanisms involved in this process.

As the duration of OGD treatment varies widely between different studies, principally depending on the aim of the study, we decided to review this issue categorizing the reported studies by species and cell type. However, although for ease of reference we have made this classification, it should not be understood that the cellular model used in any way determines the length of the OGD treatment.

2.4.1. Rat endothelial cells

Li *et al.*, who used Krebs buffer to mimic the OGD model with rBMECs, studied the effect on neuron survival of paracrine signalling under pathological conditions, testing different periods of OGD (1 h, 2 h, 4 h, 6 h and 8 h) and checking endothelial cell viability by the MTT [(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)] assay. They finally selected to use 6 h of OGD as this was the first condition in which a significant decrease ($P < 0.001$) of cell viability was observed in comparison with the control group (not exposed to OGD) [57]. Similarly, Du *et al.*, used the same ischaemic medium and cells but different periods of OGD (1, 3, and 16 h) to study the involvement of placental growth factor (PIGF) in cerebral ischaemia injury [55].

An also used a rBMEC model but with DMEM glucose-free solution. The cells were submitted to a previous PC protocol consisting of a 30 min exposure to OGD and normoxic incubation for 24 h for reoxygenation before inducing OGD injury for 2.5 h. A second group was studied without the PC protocol to compare the three conditions (control, OGD, PC + OGD). The PC procedure was included in order to analyze the effects of PC on the tight junction and cell adhesion of cerebral endothelial cells. Their results demonstrated that OGD preconditioning alleviated the injury and induced protective effects on endothelial cells. Transendothelial electrical resistance was similar to the control, ZO-1 and F-actin localization were maintained as in the control, and a reduction of ICAM-1 and VCAM-1 expression (involved in leukocyte adhesion and activation) was observed. In their preliminary experiments, the authors found on testing different periods of exposure to OGD (15 min, 0.5 h, 1 h, 1.5 h, 2 h, 2.5 h, 3 h) that more than 2 h produced irreversible injury, 3 h produced severe damage with apoptosis or necrosis in most cells, whereas 0.5 h of PC did not result in apparent injury but led to ischaemic tolerance [13].

Domoki *et al.*, who used EBSS medium and rat cerebromicrovascular endothelial cells (CMVECs), performed ischaemic experiments exposing the cells to 12 h of OGD. The aim of the study was to determine whether primary cultures of rat CMVECs were sensitive to L-glutamate (L-glut) or *N*-methyl-D-aspartate (NMDA). To this end, they combined L-glut/NMDA (0.1-1 mM) treatment with OGD for 12 h. After OGD, EBSS was replaced with regular culture medium for 12 h before determining cellular viability. The exposure of rat CMVEC cultures to 12 h of OGD was found to significantly reduce viability. However, the addition of 1 mM L-glut or NMDA into the glucose-free EBSS solution did not affect cell death induced by OGD [54]. On the other hand, there are also some authors that used primary [56,58] or immortalized human brain endothelial cells in their studies, but in these cases, they performed hypoxia (oxygen deprivation) instead of ischaemia experiments (oxygen and glucose deprivation) (see Table 3). In summary, when rat brain endothelial cells are used as the OGD model, the time of OGD exposure varies greatly (from 1 to 16 hours) depending on the medium used and the objective of the study.

2.4.2. Mouse endothelial cells

When the cerebrovascular endothelial cells are from mouse, OGD exposure times seem to be more consistent between the different studies. Yin *et al.*, for example, investigated the potential interaction of ataxia telangiectasia mutated (ATM) and NF- κ B after OGD in mouse cerebral endothelial cells,

exposing cells with deoxygenated glucose-free HBSS to OGD for 4 h. They performed the analysis at 4 h after OGD onset, as this was approximately when 30% of cells had died and when ATM was induced [69]. The same authors exposed mouse endothelial cells to 4 and 16 h of OGD (with deoxygenated glucose-free HBSS) in a more recent study [99] to study the molecular mechanisms of peroxisome proliferator-activated receptor δ (PPAR δ) on ischaemia-induced cerebrovascular injury. Taking 4 and 16 h of OGD exposure, the authors explored whether Golgi fragmentation, an essential process in the development of cell death [124] occurred in OGD. They report that after OGD the morphology of the Golgi apparatus changes to debris-like structures scattered in the cytoplasm (nuclear shrinkage). These alterations in cellular morphology were observed as early as 4 h after OGD onset and were further enhanced after 16 h.

Hu *et al.*, and Narasimhan *et al.*, submitted primary mouse cerebral endothelial cells to 4 h and 8 h of OGD, respectively, with glucose-free buffered salt solution (HBSS) [65,67]. Milner *et al.*, submitted the cerebral cells to 18 h of OGD using low-glucose medium (1.0 g/L glucose) [66,125]. Other recent studies that used mouse immortalized cerebral endothelial cells (b.End3) to perform the OGD experiments exposed the cells to glucose-free DMEM medium during 3, 6, 12, 18 or 24 h [123] and 5 h [73] of OGD or to deoxygenated glucose-free BSS0.0 during 60 min, 90 min, 3 h or 6 h of OGD, depending on the experiment [12], or 6 h of OGD [70] to mimic ischaemic conditions. Yan *et al.*, also used the b.End3 cell line, but in this case they used serum-free low-glucose medium during larger periods of time (24 h, 36 h, 48 h) as the OGD protocol [76].

Finally, Andjelkovic *et al.*, exposed an immortalized mouse brain endothelial cell line (bEnd.3) and primary cultures of mBMEC to 5 hours of OGD using deoxygenated DMEM glucose-free medium to examine whether cerebral endothelial cells can be preconditioned *in vitro* in the absence of other cell types. This study consisted of four different sets of experiments comparing different PC duration, the effects of altering the time interval between the PC stimuli and OGD injury, the cell viability of the two types of cerebral endothelial cells and the effect of PC on the endothelial intercellular adhesion molecule (ICAM-1) mRNA and protein after OGD. In all of the experiments cerebral endothelial cells were exposed to a short duration of OGD as a stimulus and, after different time intervals, exposed to a longer duration of OGD (5 h) with or without reoxygenation to examine whether prior PC would reduce cell injury. In the first set of experiments they examined the optimal duration of the PC (15, 30, 45, or 60 min) stimulus using bEnd.3 using lactate dehydrogenase (LDH) assays. In this study the authors found evidence of protection from 15 min of OGD as the PC stimulus to reach the maximum protection level between 45 and 60 min of OGD (longer periods were not used as they were found to cause endothelial damage). In the second set of experiments, the duration of the PC stimulus was kept constant (1 h), and the time interval between that stimulus and the prolonged OGD was varied (4 h, 12 h, 24 h, 48 h, 72 h). They found that 1 h of PC stimulus and a 24 h interval between the PC stimulus and the OGD injury were the optimal conditions to provide a protective effect on bEnd.3. This delay was considered to be due to the need for new protein synthesis [126], and this also appears to be the case for the protection of the cerebral endothelium. The third set of experiments compared the effects of PC on cell viability (using calcein-AM and EthD-1) of two types of cerebral endothelial cells, bEnd.3 and primary cultures (mBMEC). The two types of cerebral endothelial cells gave almost identical results when they were exposed to 1 h of PC stimuli and 24 h as the time interval between PC and the 5 h of OGD. The PC was found to significantly reduce LDH release in both cell types. To determine the

effect of PC on the inflammatory response of bEnd.3 cells, the fourth set of experiments examined the mRNA and protein levels of the ICAM-1 after PC stimulus (15, 30, 45, 60 min) and OGD with reoxygenation (24 h, 48 h, 72 h). They conclude that PC has anti-inflammatory effects on cerebral endothelial cells, as they observed a down-regulation of ICAM-1 increased when the duration of the PC was lengthened from 15 to 60 min [14].

In conclusion, the time of OGD used in the experiments with mouse cerebromicrovascular endothelial cells normally ranges from 4 to 8 h, with the exception of the previously reported studies performed by Lee *et al.*, and Yan *et al.*, which used significantly longer periods of time (24 h, 36 h, 48 h).

2.4.3. Human cerebral vascular endothelial cells

Human cerebromicrovascular endothelial cells (HCEC) have also been used as an *in-vitro* model to mimic ischaemic conditions. Zhang *et al.*, and Stanimirovic *et al.*, who performed experiments exposing cells to glucose-free Krebs solution during 4 h, are a clear example [42,43]. Authors such as Zhang *et al.*, exposed HBMEC to longer periods of time (8 hours) using HBSS without serum and performing a previous hypoxic preconditioning protocol consisting of two 3 h periods of hypoxia/day (with an interval of 1 h of normoxia) during five days [122]. Other recent studies by Slevin *et al.*, Guo *et al.*, Allen *et al.*, and Cowan and Easton, have also used human brain endothelial cells in their experiments [36,38, 41,46]. In the cases of Slevin *et al.*, and Guo *et al.*, 6 and 24 h of OGD were used, respectively, and in the other cases different periods of *in-vitro* ischaemia were selected. Allen *et al.*, used either 4 h or 20 h (using HBSS medium), and in the case of Cowan and Easton cells (in which they used hCMEC/D3, an immortalized human brain endothelial cell line) were exposed for 1 h, 12 h and 24 h to OGD in order to compare results in the different conditions. In the case of Cowan and Easton, two different OGD media, glucose-free PBS and glucose-free DMEM, were used.

Like the experiments performed with rat brain endothelial cells, the OGD experiments with human cerebral endothelial cells exposed the cells to a wide variety of different periods of time, ranging from 4 or 8 h to 24 h.

2.4.4. Bovine endothelial cells

Some authors have also used bovine brain capillary endothelial cells for their experiments. Brillault *et al.*, for example, aimed to investigate the effect of hypoxia on permeability changes by specifically exposing cells to serum-lightened (5% v/v serum) and low-glucose (0.2 g/L) medium during 4 h to mimic *in-vitro* ischaemic conditions [82]. Similarly, Culot *et al.*, used the same medium as well as the same time of OGD as Brillault *et al.*, [83]. On the other hand, Abbruscato *et al.*, and Paulson *et al.*, used conventional medium without glucose during 6 hours as the OGD protocol in their experiments with bovine brain capillary endothelial cells [80,85]. The purpose of both studies was to explore different molecular mechanisms of nicotine and tobacco smoke effects through the BBB during ischaemia. On the other hand, Benchenane *et al.*, used a serum-free and low-glucose medium during 4 h to determine whether vascular tPA crosses the blood-brain barrier (BBB) during cerebral ischaemia [81]. Finally, Xu *et al.*, perform the OGD experiments using HBSS medium during different periods of time between 1-8 hours. The aim of the study was to characterize bovine cerebral endothelial cell death in relation to iNOS expression after experimental ischaemia [86]. In summary,

the different studies with bovine brain endothelial cells used a period of OGD ranging from 1-9 h, although most were within the 4-6 h range.

2.4.5. Porcine endothelial cells

Several studies have used porcine brain endothelial cells as a BBB cellular model although most perform hypoxia rather than undertaking ischaemic experiments. Beetsch *et al.*, used several periods of hypoxia, none less than 10 h, to measure oxygen free radical production by cerebral endothelial cells and determine its role in hypoxia injury [87]. Fischer *et al.*, used periods from 1.5 to 48 h of hypoxia to investigate the effects of methohexital and thiopental on the permeability of the endothelial cell monolayer under these conditions [89]. In another study, the same group used 24 h of hypoxia using the same *in-vitro* BBB model to evaluate the mechanisms by which hypoxia regulates paracellular permeability. They concluded that the VEGF released leads to delocalization, decreased expression and enhanced phosphorylation of ZO-1 (zona occludens) [48]. The time of hypoxia treatment in the studies cited here vary widely between the different reports from 1.5 to 48 h.

2.5. Time of Reperfusion

Although the previously reported studies are based on the OGD experimental model which consisted of replacing the conventional medium and exposing the cerebral endothelial cells from different animal models to OGD conditions, they principally differ in the reperfusion time during which sample collection was performed. All the authors analyzed the samples from between 16 and 20 h of reperfusion, except one who used 72 h of reoxygenation [14], when a single collection was made [36,38,70,86,127] and from 0 to 24 h when a time course analysis was performed [43,69,73,99].

3. Discussion and Conclusions

Ischaemic cerebral stroke is produced by arterial occlusion resulting in dramatically reduced levels of oxygen and glucose to the region supplied. In recent years, cerebral endothelium, an important component of the neurovascular unit, has become a potential therapeutic target for neurological diseases including stroke [12,105,128-130].

Different studies aiming to mimic the ischaemic conditions of stroke have used hypoxia as well as ischaemic models. For *in-vitro* experiments, OGD is the closest approximation to the conditions that occur during cerebral ischaemia as only oxygen deprivation is performed in hypoxia experiments. For this reason we have focused on ischaemic models in reviewing the different published studies that have used cerebral vascular endothelial cells as an *in-vitro* ischaemic cellular model.

The studies that have been reviewed here reveal that there is no general consensus as to the conditions (ischaemia medium, time of OGD treatment and time of reperfusion) and cellular models to be used in the OGD experiments performed with cerebrovascular endothelial cells. However, the most widely used cellular model in the last thirteen years has been that of the mouse cerebral endothelial cells, principally the bEnd.3. In this case, we have seen that there is a greater correlation in the type of ischaemia medium used than in the OGD exposure time. The most common media used in OGD experiments with these cells are especially glucose-free HBSS but also DMEM glucose-free. The time

of OGD varies widely between studies although it is more standardized when glucose-free HBSS is used. In contrast with the studies reported using mouse endothelial cells, in which OGD conditions appear to be more homogeneous, the experiments performed with rat as well as human brain endothelial cells use very different ischaemia media (including glucose-free Krebs solution, glucose-free HBSS, glucose-free EBSS, glucose-free DMEM, glucose-free conventional medium) and a wide range of times of OGD exposure. Therefore, although it appears that for some species there is a consensus in some reviewed studies, when OGD experimental conditions and protocol design are being developed (ischaemia medium and especially the time of OGD treatment) it is extremely important to take the objectives of the study into account.

Most authors performed their experiments with brain microvascular endothelial cells to study ischaemia given that they are responsible for angiogenesis in cerebral ischaemia. However, some authors used HUVEC (human umbilical vein endothelial cells) cultures in their experiments as they are a cellular model in angiogenic studies [131]. These cells are a rich source of CD34+ stem cells, which have been found to secrete numerous angiogenic factors, including VEGF, HGF and IGF. Despite this, it has been reported that ECs from different blood vessels and microvascular ECs from different tissues have distinct and characteristic gene expression profiles [131, 132] and so this model cannot supply reliable information when the focus is brain ischaemia research since the differential gene expression profiles of ECs from different sites affect their development potential, their interaction with other cells and their response to experimental manipulation. It is therefore necessary to use organ specific endothelial cells in the *in-vitro* studies.

Although most of the studies reviewed used a serum-free media in models of ischaemia, some used a serum-lightened medium in their experimental studies in order to avoid temporary permeability-increasing artefacts due to serum growth factors and improve cell viability and proliferation amongst other reasons. These differences in the media composition should be taken into account in the analysis of the results and in comparing different studies, as serum growth factors has been reported as affecting the barrier properties of an endothelial cell culture, promoting a decrease in the electrical resistance and the opening of the tight junctions, thus affecting the final differentiation of the cells [134, 135].

Some of the studies reported performed the OGD experiments co-culturing endothelial cells with neurons or astrocytes in order to mimic as closely as possible *in-vivo* brain conditions (BBB). More reliable results are obtained in this way as they take into account paracrine signalling among the different cell types as occurs in physiological and physiopathologic conditions. Hence, *in-vivo* ischaemic conditions are better simulated and the repercussions of injury to the different brain cell types can be better analyzed. With regards to the brain endothelial cell differential response in mono versus co-culture conditions, it has been reported that when brain endothelial cells are assayed in co-culture with astrocytes, an earlier increase in the permeability of the ECs (hyperpermeability) is observed in OGD experiments in comparison with EC monocultures. This occurs due to glial cell activation that produces a secretion of soluble factors which make endothelial cells more sensitive to OGD. Some of the reported studies used conditioned media from endothelial cells previously exposed to OGD conditions or from control conditions with cultured neuronal cells to study the effect of this interaction on neuronal [57] and non-neuronal [59, 82] brain cells surveillance (astrocytes, oligodendrocyte precursor cells). In these cases, instead of co-culturing the two cell types, the model tries to mimic the co-existence of different injured and non-injured cell types, which may occur in

some brain areas after stroke. A recent study into the new dynamic human BBB model developed by Cucullo *et al.*, is particularly worthy of mention. This new DIVBBB system is composed of human endothelial cells and human astrocytes, which avoid species differences in the co-culture providing a more reliable physiological model. As this *in-vitro* model allows cell extravasation analysis under realistic perfusion pressures and shear stress levels, it is a useful tool to study the BBB characteristics in different pathophysiological conditions.

It should be noted that the literature reviewed here does not provide viability, mortality, gene expression data of cerebral endothelial cells exposed to OGD after longer than 72 h post *in-vitro* ischaemia. In our opinion, further studies are necessary to better understand the long-term response of microvascular endothelial cells after OGD as part of a broader attempt to unravel the different molecular mechanisms of stroke. Finally, we would like to stress the importance of standardizing the OGD experimental conditions with cerebrovascular endothelial cells in order to provide comparative and reproducible results and to avoid misinterpretation due to the cellular model and experimental conditions used.

Acknowledgements

This work was partially supported by the Centre d'Innovació i Desenvolupament Empresarial (CIDEM) of the Generalitat de Catalunya (grant no.RDITSCON07-1-0006), Grupo Ferrer Internacional SA, Spanish Ministry of Science and Innovation and the European Regional Development Fund (ERDF) (PROFIT grant no. CIT 090000-20008-11), Institut de Salut Carlos III (ISCIII) grant nos. FIS-PI070322 and ISCIII retics-RENEVAS-RD07/0026/2002.

References and Notes

1. Taoufik, E.; Probert, L. Ischemic neuronal damage. *Curr. Pharm. Des* **2008**, *14*, 3565-3573.
2. Ginsberg, M.D. Neuroprotection for ischemic stroke: past, present and future. *Neuropharmacology* **2008**, *55*, 363-389.
3. Tabakman, R.; Jiang, H.; Shahar, I.; Arien-Zakay, H.; Levine, R.A.; Lazarovici, P. Neuroprotection by NGF in the PC12 *in vitro* OGD model: involvement of mitogen-activated protein kinases and gene expression. *Ann. NY Acad. Sci.* **2005**, *1053*, 84-96.
4. Liebeskind, D.S. Neuroprotection from the collateral perspective. *IDrugs* **2005**, *8*, 222-228.
5. Staton, C.A.; Stribbling, S.M.; Tazzyman, S.; Hughes, R.; Brown, N.J.; Lewis, C.E. Current methods for assaying angiogenesis *in vitro* and *in vivo*. *Int. J. Exp. Pathol.* **2004**, *85*, 233-248.
6. Folkman, J.; Shing, Y. Angiogenesis. *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*, 10931-10934.
7. Folkman, J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N. Engl. J. Med.* **1971**, *285*, 1182-1186.
8. Folkman, J. Tumor angiogenesis. *Adv. Cancer Res.* **1985**, *43*, 175-203.
9. Conway, E.M.; Collen, D.; Carmeliet, P. Molecular mechanisms of blood vessel growth. *Cardiovasc. Res.* **2001**, *49*, 507-521.
10. Hurtado, O.; Pradillo, J.M.; Alonso-Escolano, D.; Lorenzo, P.; Sobrino, T.; Castillo, J.; Lizasoain, I.; Moro, M.A. Neurorepair versus neuroprotection in stroke. *Cerebrovasc. Dis.* **2006**, *21* (Suppl. 2), 54-63.

11. Davidson, S.M.; Duchon, M.R. Endothelial mitochondria: contributing to vascular function and disease. *Circ. Res.* **2007**, *100*, 1128-1141.
12. Guo, J.; Krause, D.N.; Horne, J.; Weiss, J.H.; Li, X.; Duckles, S.P. Estrogen-receptor-mediated protection of cerebral endothelial cell viability and mitochondrial function after ischemic insult *in vitro*. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **2010**, *30*, 545-554.
13. An, P.; Xue, Y.X. Effects of preconditioning on tight junction and cell adhesion of cerebral endothelial cells. *Brain Res.* **2009**, *1272*, 81-88.
14. Andjelkovic, A.V.; Stamatovic, S.M.; Keep, R.F. The protective effects of preconditioning on cerebral endothelial cells *in vitro*. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **2003**, *23*, 1348-1355.
15. Chen, W.Y.; Sun, C.M.; Wang, H.M.; Huang, M.; Zhu, G.X.; Zhu, B.D.; Liu, F.Y. Effect of tanshinone IIA pretreatment on IL-1beta and Re1A mRNA expression in rats with focal cerebral ischemia. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao* **2010**, *30*, 2115-2118.
16. Murry, C.E.; Jennings, R.B.; Reimer, K.A. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation* **1986**, *74*, 1124-1136.
17. Pradillo, J.M.; Fernandez-Lopez, D.; Garcia-Yebenes, I.; Sobrado, M.; Hurtado, O.; Moro, M.A.; Lizasoain, I. Toll-like receptor 4 is involved in neuroprotection afforded by ischemic preconditioning. *J. Neurochem.* **2009**, *109*, 287-294.
18. Badaut, J.; Hirt, L.; Price, M.; de Castro, R.M.; Magistretti, P.J.; Regli, L. Hypoxia/hypoglycemia preconditioning prevents the loss of functional electrical activity in organotypic slice cultures. *Brain Res.* **2005**, *1051*, 117-122.
19. Gidday, J.M. Cerebral preconditioning and ischaemic tolerance. *Nat. Rev. Neurosci.* **2006**, *7*, 437-448.
20. Kapinya, K.J. Ischemic tolerance in the brain. *Acta Physiol Hung.* **2005**, *92*, 67-92.
21. Romera, C.; Hurtado, O.; Mallolas, J.; Pereira, M.P.; Morales, J.R.; Romera, A.; Serena, J.; Vivancos, J.; Nombela, F.; Lorenzo, P.; Lizasoain, I.; Moro, M.A. Ischemic preconditioning reveals that GLT1/EAAT2 glutamate transporter is a novel PPARgamma target gene involved in neuroprotection. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **2007**, *27*, 1327-1338.
22. Masada, T.; Hua, Y.; Xi, G.; Ennis, S.R.; Keep, R.F. Attenuation of ischemic brain edema and cerebrovascular injury after ischemic preconditioning in the rat. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **2001**, *21*, 22-33.
23. Blanco, M.; Lizasoain, I.; Sobrino, T.; Vivancos, J.; Castillo, J. Ischemic preconditioning: a novel target for neuroprotective therapy. *Cerebrovasc. Dis.* **2006**, *21* (Suppl. 2), 38-47.
24. Brea, D.; Sobrino, T.; Ramos-Cabrer, P.; Castillo, J. Reorganisation of the cerebral vasculature following ischaemia. *Rev. Neurol.* **2009**, *49*, 645-654.
25. van Bruggen, N.; Thibodeaux, H.; Palmer, J.T.; Lee, W.P.; Fu, L.; Cairns, B.; Tumas, D.; Gerlai, R.; Williams, S.P.; van Lookeren, C.M.; Ferrara, N. VEGF antagonism reduces edema formation and tissue damage after ischemia/reperfusion injury in the mouse brain. *J. Clin. Invest.* **1999**, *104*, 1613-1620.
26. Beck, H.; Plate, K.H. Angiogenesis after cerebral ischemia. *Acta Neuropathol.* **2009**, *117*, 481-496.
27. Goodwin, A.M. *In vitro* assays of angiogenesis for assessment of angiogenic and anti-angiogenic agents. *Microvasc. Res.* **2007**, *74*, 172-183.
28. Ucuzian, A.A.; Greisler, H.P. *In vitro* models of angiogenesis. *World J. Surg.* **2007**, *31*, 654-663.

29. Goldberg, W.J.; Kadingo, R.M.; Barrett, J.N. Effects of ischemia-like conditions on cultured neurons: protection by low Na⁺, low Ca²⁺ solutions. *J. Neurosci.* **1986**, *6*, 3144-3151.
30. Hlatky, L.; Sachs, R.K.; Alpen, E.L. Joint oxygen-glucose deprivation as the cause of necrosis in a tumor analog. *J. Cell. Physiol.* **1988**, *134*, 167-178.
31. Berger, R.; Jensen, A.; Paschen, W. Metabolic disturbances in hippocampal slices of fetal guinea pigs during and after oxygen-glucose deprivation: is nitric oxide involved? *Neurosci. Lett.* **1998**, *245*, 163-166.
32. Aird, W.C. Phenotypic heterogeneity of the endothelium: I. Structure, function, and mechanisms. *Circ. Res.* **2007**, *100*, 158-173.
33. Aird, W.C. Phenotypic heterogeneity of the endothelium: II. Representative vascular beds. *Circ. Res.* **2007**, *100*, 174-190.
34. Nagy, Z.; Vastag, M.; Kolev, K.; Bori, Z.; Karaidi, I.; Skopal, J. Human cerebral microvessel endothelial cell culture as a model system to study the blood-brain interface in ischemic/hypoxic conditions. *Cell. Mol. Neurobiol.* **2005**, *25*, 201-210.
35. Rizzo, M.T.; Leaver, H.A. Brain endothelial cell death: modes, signaling pathways, and relevance to neural development, homeostasis, and disease. *Mol. Neurobiol.* **2010**, *42*, 52-63.
36. Allen, C.; Srivastava, K.; Bayraktutan, U. Small GTPase RhoA and its effector rho kinase mediate oxygen glucose deprivation-evoked *in vitro* cerebral barrier dysfunction. *Stroke* **2010**, *41*, 2056-2063.
37. Griffin, J.H.; Fernandez, J.A.; Liu, D.; Cheng, T.; Guo, H.; Zlokovic, B.V. Activated protein C and ischemic stroke. *Crit. Care Med.* **2004**, *32*, S247-S253.
38. Guo, S.; Stins, M.; Ning, M.; Lo, E.H. Amelioration of inflammation and cytotoxicity by dipyridamole in brain endothelial cells. *Cerebrovasc. Dis.* **2010**, *30*, 290-296.
39. Haarmann, A.; Deiss, A.; Prochaska, J.; Foerch, C.; Weksler, B.; Romero, I.; Couraud, P.O.; Stoll, G.; Rieckmann, P.; Buttmann, M. Evaluation of soluble junctional adhesion molecule-A as a biomarker of human brain endothelial barrier breakdown. *PLoS One* **2010**, *5*, e13568.
40. Howard, E.F.; Chen, Q.; Cheng, C.; Carroll, J.E.; Hess, D. NF-kappa B is activated and ICAM-1 gene expression is upregulated during reoxygenation of human brain endothelial cells. *Neurosci. Lett.* **1998**, *248*, 199-203.
41. Slevin, M.; Krupinski, J.; Rovira, N.; Turu, M.; Luque, A.; Baldellou, M.; Sanfeliu, C.; de Vera, N.; Badimon, L. Identification of pro-angiogenic markers in blood vessels from stroked-affected brain tissue using laser-capture microdissection. *BMC Genomics* **2009**, *10*, 113.
42. Stanimirovic, D.; Shapiro, A.; Wong, J.; Hutchison, J.; Durkin, J. The induction of ICAM-1 in human cerebrovascular endothelial cells (HCEC) by ischemia-like conditions promotes enhanced neutrophil/HCEC adhesion. *J. Neuroimmunol.* **1997**, *76*, 193-205.
43. Zhang, W.; Smith, C.; Shapiro, A.; Monette, R.; Hutchison, J.; Stanimirovic, D. Increased expression of bioactive chemokines in human cerebrovascular endothelial cells and astrocytes subjected to simulated ischemia *in vitro*. *J. Neuroimmunol.* **1999**, *101*, 148-160.
44. Zhang, W.; Smith, C.; Monette, R.; Hutchison, J.; Stanimirovic, D.B. Indomethacin and cyclosporin a inhibit *in vitro* ischemia-induced expression of ICAM-1 and chemokines in human brain endothelial cells. *Acta Neurochir. Suppl.* **2000**, *76*, 47-53.

45. Zhu, D.; Wang, Y.; Singh, I.; Bell, R.D.; Deane, R.; Zhong, Z.; Sagare, A.; Winkler, E.A.; Zlokovic, B.V. Protein S controls hypoxic/ischemic blood-brain barrier disruption through the TAM receptor Tyro3 and sphingosine 1-phosphate receptor. *Blood* **2010**, *115*, 4963-4972.
46. Cowan, K.M.; Easton, A.S. Neutrophils block permeability increases induced by oxygen glucose deprivation in a culture model of the human blood-brain barrier. *Brain Res.* **2010**, *1332*, 20-31.
47. Cucullo, L.; Couraud, P.O.; Weksler, B.; Romero, I.A.; Hossain, M.; Rapp, E.; Janigro, D. Immortalized human brain endothelial cells and flow-based vascular modeling: a marriage of convenience for rational neurovascular studies. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **2008**, *28*, 312-328.
48. Fischer, S.; Wobben, M.; Marti, H.H.; Renz, D.; Schaper, W. Hypoxia-induced hyperpermeability in brain microvessel endothelial cells involves VEGF-mediated changes in the expression of zonula occludens-1. *Microvasc. Res.* **2002**, *63*, 70-80.
49. Jin, G.; Arai, K.; Murata, Y.; Wang, S.; Stins, M.F.; Lo, E.H.; van Leyen, K. Protecting against cerebrovascular injury: contributions of 12/15-lipoxygenase to edema formation after transient focal ischemia. *Stroke* **2008**, *39*, 2538-2543.
50. Vukic, V.; Callaghan, D.; Walker, D.; Lue, L. F.; Liu, Q.Y.; Couraud, P.O.; Romero, I.A.; Weksler, B.; Stanimirovic, D.B.; Zhang, W. Expression of inflammatory genes induced by beta-amyloid peptides in human brain endothelial cells and in Alzheimer's brain is mediated by the JNK-AP1 signaling pathway. *Neurobiol. Dis.* **2009**, *34*, 95-106.
51. Weksler, B.B.; Subileau, E.A.; Perriere, N.; Charneau, P.; Holloway, K.; Leveque, M.; Tricoire-Leignel, H.; Nicotra, A.; Bourdoulous, S.; Turowski, P.; Male, D.K.; Roux, F.; Greenwood, J.; Romero, I.A.; Couraud, P.O. Blood-brain barrier-specific properties of a human adult brain endothelial cell line. *FASEB J.* **2005**, *19*, 1872-1874.
52. Poller, B.; Gutmann, H.; Krahenbuhl, S.; Weksler, B.; Romero, I.; Couraud, P. O.; Tuffin, G.; Drewe, J.; Huwyler, J. The human brain endothelial cell line hCMEC/D3 as a human blood-brain barrier model for drug transport studies. *J. Neurochem.* **2008**, *107*, 1358-1368.
53. Muruganandam, A.; Herx, L.M.; Monette, R.; Durkin, J.P.; Stanimirovic, D.B. Development of immortalized human cerebrovascular endothelial cell line as an *in vitro* model of the human blood-brain barrier. *FASEB J.* **1997**, *11*, 1187-1197.
54. Domoki, F.; Kis, B.; Gaspar, T.; Bari, F.; Busija, D.W. Cerebromicrovascular endothelial cells are resistant to L-glutamate. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **2008**, *295*, R1099-R1108.
55. Du, H.; Li, P.; Pan, Y.; Li, W.; Hou, J.; Chen, H.; Wang, J.; Tang, H. Vascular endothelial growth factor signaling implicated in neuroprotective effects of placental growth factor in an *in vitro* ischemic model. *Brain Res.* **2010**, *1357*, 1-8.
56. Hiu, T.; Nakagawa, S.; Hayashi, K.; Kitagawa, N.; Tsutsumi, K.; Kawakubo, J.; Honda, M.; Suyama, K.; Nagata, I.; Niwa, M. Tissue plasminogen activator enhances the hypoxia/reoxygenation-induced impairment of the blood-brain barrier in a primary culture of rat brain endothelial cells. *Cell. Mol. Neurobiol.* **2008**, *28*, 1139-1146.
57. Li, W.; Li, P.; Hua, Q.; Hou, J.; Wang, J.; Du, H.; Tang, H.; Xu, Y. The impact of paracrine signaling in brain microvascular endothelial cells on the survival of neurons. *Brain Res.* **2009**, *1287*, 28-38.

58. Liu, K.; Chi, L.; Guo, L.; Liu, X.; Luo, C.; Zhang, S.; He, G. The interactions between brain microvascular endothelial cells and mesenchymal stem cells under hypoxic conditions. *Microvasc. Res.* **2008**, *75*, 59-67.
59. Arai, K.; Lo, E.H. An oligovascular niche: cerebral endothelial cells promote the survival and proliferation of oligodendrocyte precursor cells. *J. Neurosci.* **2009**, *29*, 4351-4355.
60. Chow, J.; Ogunshola, O.; Fan, S.Y.; Li, Y.; Ment, L.R.; Madri, J.A. Astrocyte-derived VEGF mediates survival and tube stabilization of hypoxic brain microvascular endothelial cells *in vitro*. *Brain Res. Dev. Brain Res.* **2001**, *130*, 123-132.
61. Davis, B.; Tang, J.; Zhang, L.; Mu, D.; Jiang, X.; Biran, V.; Vexler, Z.; Ferriero, D.M. Role of vasodilator stimulated phosphoprotein in VEGF induced blood-brain barrier permeability in endothelial cell monolayers. *Int. J. Dev. Neurosci.* **2010**, *28*, 423-428.
62. Rabin, O.; Piciotti, M.; Drieu, K.; Bourre, J.M.; Roux, F. Effect of anoxia and reoxygenation on antioxidant enzyme activities in immortalized brain endothelial cells. *In vitro Cell. Dev. Biol. Anim.* **1996**, *32*, 221-224.
63. Robertson, S.J.; Kania, K.D.; Hladky, S.B.; Barrand, M.A. P-glycoprotein expression in immortalised rat brain endothelial cells: comparisons following exogenously applied hydrogen peroxide and after hypoxia-reoxygenation. *J. Neurochem.* **2009**, *111*, 132-141.
64. Yu, C.; Kastin, A.J.; Ding, Y.; Pan, W. Gamma glutamyl transpeptidase is a dynamic indicator of endothelial response to stroke. *Exp. Neurol.* **2007**, *203*, 116-122.
65. Hu, C.J.; Chen, S.D.; Yang, D.I.; Lin, T.N.; Chen, C.M.; Huang, T.H.; Hsu, C.Y. Promoter region methylation and reduced expression of thrombospondin-1 after oxygen-glucose deprivation in murine cerebral endothelial cells. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **2006**, *26*, 1519-1526.
66. Milner, R.; Hung, S.; Wang, X.; Berg, G.I.; Spatz, M.; del Zoppo, G.J. Responses of endothelial cell and astrocyte matrix-integrin receptors to ischemia mimic those observed in the neurovascular unit. *Stroke* **2008**, *39*, 191-197.
67. Narasimhan, P.; Liu, J.; Song, Y.S.; Massengale, J.L.; Chan, P.H. VEGF Stimulates the ERK 1/2 signaling pathway and apoptosis in cerebral endothelial cells after ischemic conditions. *Stroke* **2009**, *40*, 1467-1473.
68. Yang, M.Z.; Mun, C.H.; Choi, Y.J.; Baik, J.H.; Park, K.A.; Lee, W.T.; Lee, J.E. Agmatine inhibits matrix metalloproteinase-9 via endothelial nitric oxide synthase in cerebral endothelial cells. *Neurol. Res.* **2007**, *29*, 749-754.
69. Yin, K.J.; Chen, S.D.; Lee, J.M.; Xu, J.; Hsu, C.Y. ATM gene regulates oxygen-glucose deprivation-induced nuclear factor-kappaB ADN-binding activity and downstream apoptotic cascade in mouse cerebrovascular endothelial cells. *Stroke* **2002**, *33*, 2471-2477.
70. Jung, H.J.; Yang, M.Z.; Kwon, K.H.; Yenari, M.A.; Choi, Y.J.; Lee, W.T.; Park, K.A.; Lee, J.E. Endogenous agmatine inhibits cerebral vascular matrix metalloproteinases expression by regulating activating transcription factor 3 and endothelial nitric oxide synthesis. *Curr. Neurovasc. Res.* **2010**, *7*, 201-212.
71. Lee, H.T.; Chang, Y.C.; Tu, Y.F.; Huang, C.C. VEGF-A/VEGFR-2 signaling leading to cAMP response element-binding protein phosphorylation is a shared pathway underlying the protective effect of preconditioning on neurons and endothelial cells. *J. Neurosci.* **2009**, *29*, 4356-4368.

72. Li, X.; Zhou, T.; Zhi, X.; Zhao, F.; Yin, L.; Zhou, P. Effect of hypoxia/reoxygenation on CD73 (ecto-5'-nucleotidase) in mouse microvessel endothelial cell lines. *Microvasc. Res.* **2006**, *72*, 48-53.
73. Plane, J.M.; Andjelkovic, A.V.; Keep, R.F.; Parent, J.M. Intact and injured endothelial cells differentially modulate postnatal murine forebrain neural stem cells. *Neurobiol. Dis.* **2010**, *37*, 218-227.
74. Roitbak, T.; Li, L.; Cunningham, L.A. Neural stem/progenitor cells promote endothelial cell morphogenesis and protect endothelial cells against ischemia via HIF-1alpha-regulated VEGF signaling. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **2008**, *28*, 1530-1542.
75. Tixier, E.; Leconte, C.; Touzani, O.; Roussel, S.; Petit, E.; Bernaudin, M. Adrenomedullin protects neurons against oxygen glucose deprivation stress in an autocrine and paracrine manner. *J. Neurochem.* **2008**, *106*, 1388-1403.
76. Yan, F.L.; Zheng, Y.; Zhao, F.D. Effects of ginkgo biloba extract EGb761 on expression of RAGE and LRP-1 in cerebral microvascular endothelial cells under chronic hypoxia and hypoglycemia. *Acta Neuropathol.* **2008**, *116*, 529-535.
77. Dohgu, S.; Nishioku, T.; Sumi, N.; Takata, F.; Nakagawa, S.; Naito, M.; Tsuruo, T.; Yamauchi, A.; Shuto, H.; Kataoka, Y. Adverse effect of cyclosporin A on barrier functions of cerebral microvascular endothelial cells after hypoxia-reoxygenation damage *in vitro*. *Cell. Mol. Neurobiol.* **2007**, *27*, 889-899.
78. Nishioku, T.; Takata, F.; Yamauchi, A.; Sumi, N.; Yamamoto, I.; Fujino, A.; Naito, M.; Tsuruo, T.; Shuto, H.; Kataoka, Y. Protective action of indapamide, a thiazide-like diuretic, on ischemia-induced injury and barrier dysfunction in mouse brain microvascular endothelial cells. *J. Pharmacol. Sci.* **2007**, *103*, 323-327.
79. Yamaji, R.; Fujita, K.; Takahashi, S.; Yoneda, H.; Nagao, K.; Masuda, W.; Naito, M.; Tsuruo, T.; Miyatake, K.; Inui, H.; Nakano, Y. Hypoxia up-regulates glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in mouse brain capillary endothelial cells: involvement of Na⁺/Ca²⁺ exchanger. *Biochim. Biophys. Acta* **2003**, *1593*, 269-276.
80. Abbruscato, T.J.; Lopez, S.P.; Roder, K.; Paulson, J.R. Regulation of blood-brain barrier Na,K,2Cl-cotransporter through phosphorylation during *in vitro* stroke conditions and nicotine exposure. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2004**, *310*, 459-468.
81. Benchenane, K.; Berezowski, V.; Fernandez-Monreal, M.; Brillault, J.; Valable, S.; Dehouck, M.P.; Cecchelli, R.; Vivien, D.; Touzani, O.; Ali, C. Oxygen glucose deprivation switches the transport of tPA across the blood-brain barrier from an LRP-dependent to an increased LRP-independent process. *Stroke* **2005**, *36*, 1065-1070.
82. Brillault, J.; Berezowski, V.; Cecchelli, R.; Dehouck, M.P. Intercommunications between brain capillary endothelial cells and glial cells increase the transcellular permeability of the blood-brain barrier during ischaemia. *J. Neurochem.* **2002**, *83*, 807-817.
83. Culot, M.; Mysiorek, C.; Renftel, M.; Roussel, B.D.; Hommet, Y.; Vivien, D.; Cecchelli, R.; Fenart, L.; Berezowski, V.; Dehouck, M.P.; Lundquist, S. Cerebrovascular protection as a possible mechanism for the protective effects of NXY-059 in preclinical models: an *in vitro* study. *Brain Res.* **2009**, *1294*, 144-152.

84. Dehouck, M.P.; Cecchelli, R.; Richard, G.A.; Renftel, M.; Lundquist, S. *In vitro* blood-brain barrier permeability and cerebral endothelial cell uptake of the neuroprotective nitrone compound NXY-059 in normoxic, hypoxic and ischemic conditions. *Brain Res.* **2002**, *955*, 229-235.
85. Paulson, J.R.; Roder, K.E.; McAfee, G.; Allen, D.D.; Van der Schyf, C.J.; Abbruscato, T.J. Tobacco smoke chemicals attenuate brain-to-blood potassium transport mediated by the Na,K,2Cl-cotransporter during hypoxia-reoxygenation. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2006**, *316*, 248-254.
86. Xu, J.; He, L.; Ahmed, S.H.; Chen, S.W.; Goldberg, M.P.; Beckman, J.S.; Hsu, C.Y. Oxygen-glucose deprivation induces inducible nitric oxide synthase and nitrotyrosine expression in cerebral endothelial cells. *Stroke* **2000**, *31*, 1744-1751.
87. Beetsch, J.W.; Park, T.S.; Dugan, L.L.; Shah, A.R.; Gidday, J.M. Xanthine oxidase-derived superoxide causes reoxygenation injury of ischemic cerebral endothelial cells. *Brain Res.* **1998**, *786*, 89-95.
88. Elfeber, K.; Kohler, A.; Lutzenburg, M.; Osswald, C.; Galla, H.J.; Witte, O.W.; Koepsell, H. Localization of the Na⁺-D-glucose cotransporter SGLT1 in the blood-brain barrier. *Histochem. Cell Biol.* **2004**, *121*, 201-207.
89. Fischer, S.; Renz, D.; Schaper, W.; Karliczek, G.F. Effects of barbiturates on hypoxic cultures of brain derived microvascular endothelial cells. *Brain Res.* **1996**, *707*, 47-53.
90. Fischer, S.; Renz, D.; Kleinstuck, J.; Schaper, W.; Karliczek, G.F. *In vitro* effects of anaesthetic agents on the blood-brain barrier. *Anaesthetist* **2004**, *53*, 1177-1184.
91. Fukumoto, K.; Takagi, N.; Yamamoto, R.; Moriyama, Y.; Takeo, S.; Tanonaka, K. Prostanoid EP1 receptor antagonist reduces blood-brain barrier leakage after cerebral ischemia. *Eur. J. Pharmacol.* **2010**, *640*, 82-86.
92. Kago, T.; Takagi, N.; Date, I.; Takenaga, Y.; Takagi, K.; Takeo, S. Cerebral ischemia enhances tyrosine phosphorylation of occludin in brain capillaries. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2006**, *339*, 1197-1203.
93. Lam, T.I.; Wise, P.M.; O'Donnell, M.E. Cerebral microvascular endothelial cell Na/H exchange: evidence for the presence of NHE1 and NHE2 isoforms and regulation by arginine vasopressin. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* **2009**, *297*, C278-C289.
94. Li, M.; Zeynalov, E.; Li, X.; Miyazaki, C.; Koehler, R.C.; Littleton-Kearney, M. T. Effects of estrogen on postischemic pial artery reactivity to ADP. *Microcirculation* **2009**, *16*, 403-413.
95. McCaffrey, G.; Willis, C.L.; Staatz, W.D.; Nametz, N.; Quigley, C.A.; Hom, S.; Lochhead, J.J.; Davis, T.P. Occludin oligomeric assemblies at tight junctions of the blood-brain barrier are altered by hypoxia and reoxygenation stress. *J. Neurochem.* **2009**, *110*, 58-71.
96. Nagafuji, T.; Sugiyama, M.; Matsui, T. Temporal profiles of Ca²⁺/calmodulin-dependent and -independent nitric oxide synthase activity in the rat brain microvessels following cerebral ischemia. *Acta Neurochir. Suppl. (Wien.)* **1994**, *60*, 285-288.
97. Wiernsperger, N.; Gyax, P.; Hofmann, A. Calcium antagonist PY 108-068: demonstration of its efficacy in various types of experimental brain ischemia. *Stroke* **1984**, *15*, 679-685.
98. Wang, G.; Liu, X.; Guo, Q.; Namura, S. Chronic treatment with fibrates elevates superoxide dismutase in adult mouse brain microvessels. *Brain Res.* **2010**, *1359*, 247-255.

99. Yin, K.J.; Deng, Z.; Hamblin, M.; Xiang, Y.; Huang, H.; Zhang, J.; Jiang, X.; Wang, Y.; Chen, Y.E. Peroxisome proliferator-activated receptor delta regulation of miR-15a in ischemia-induced cerebral vascular endothelial injury. *J. Neurosci.* **2010**, *30*, 6398-6408.
100. Micic, D.; Swink, M.; Micic, J.; Klatzo, I.; Spatz, M. The ischemic and postischemic effect on the uptake of neutral amino acids in isolated cerebral capillaries. *Experientia* **1979**, *35*, 625-626.
101. Nell, J.H.; Welch, K.M. Cerebral microvessel 2-deoxy-D-glucose uptake during ischemia-induced seizures. *Ann. Neurol.* **1980**, *7*, 457-461.
102. Li, G.; Simon, M.J.; Cancel, L.M.; Shi, Z.D.; Ji, X.; Tarbell, J.M.; Morrison, B., III; Fu, B.M. Permeability of endothelial and astrocyte cocultures: *in vitro* blood-brain barrier models for drug delivery studies. *Ann. Biomed. Eng.* **2010**, *38*, 2499-2511.
103. Sano, Y.; Shimizu, F.; Abe, M.; Maeda, T.; Kashiwamura, Y.; Ohtsuki, S.; Terasaki, T.; Obinata, M.; Kajiwara, K.; Fujii, M.; Suzuki, M.; Kanda, T. Establishment of a new conditionally immortalized human brain microvascular endothelial cell line retaining an *in vivo* blood-brain barrier function. *J. Cell. Physiol.* **2010**, *225*, 519-528.
104. Lok, J.; Gupta, P.; Guo, S.; Kim, W.J.; Whalen, M.J.; van Leyen, K.; Lo, E.H. Cell-cell signaling in the neurovascular unit. *Neurochem. Res.* **2007**, *32*, 2032-2045.
105. Hawkins, B.T.; Davis, T P. The blood-brain barrier/neurovascular unit in health and disease. *Pharmacol. Rev.* **2005**, *57*, 173-185.
106. Roux, F.; Couraud, P.O. Rat brain endothelial cell lines for the study of blood-brain barrier permeability and transport functions. *Cell. Mol. Neurobiol.* **2005**, *25*, 41-58.
107. Santaguida, S.; Janigro, D.; Hossain, M.; Oby, E.; Rapp, E.; Cucullo, L. Side by side comparison between dynamic versus static models of blood-brain barrier *in vitro*: a permeability study. *Brain Res.* **2006**, *1109*, 1-13.
108. Abbott, N.J.; Ronnback, L.; Hansson, E. Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nat. Rev. Neurosci.* **2006**, *7*, 41-53.
109. Leybaert, L.; Cabooter, L.; Braet, K. Calcium signal communication between glial and vascular brain cells. *Acta Neurol. Belg.* **2004**, *104*, 51-56.
110. Lauer, R.; Bauer, R.; Linz, B.; Pittner, F.; Peschek, G.A.; Ecker, G.; Friedl, P.; Noe, C.R. Development of an *in vitro* blood-brain barrier model based on immortalized porcine brain microvascular endothelial cells. *Farmaco* **2004**, *59*, 133-137.
111. Cohen-Kashi, M.K.; Cooper, I.; Teichberg, V.I. Closing the gap between the *in-vivo* and *in-vitro* blood-brain barrier tightness. *Brain Res.* **2009**, *1284*, 12-21.
112. Garberg, P.; Ball, M.; Borg, N.; Cecchelli, R.; Fenart, L.; Hurst, R.D.; Lindmark, T.; Mabondzo, A.; Nilsson, J.E.; Raub, T.J.; Stanimirovic, D.; Terasaki, T.; Oberg, J.O.; Osterberg, T. *In vitro* models for the blood-brain barrier. *Toxicol. In vitro* **2005**, *19*, 299-334.
113. Mysiorek, C.; Culot, M.; Dehouck, L.; Derudas, B.; Staels, B.; Bordet, R.; Cecchelli, R.; Fenart, L.; Berezowski, V. Peroxisome-proliferator-activated receptor-alpha activation protects brain capillary endothelial cells from oxygen-glucose deprivation-induced hyperpermeability in the blood-brain barrier. *Curr. Neurovasc. Res.* **2009**, *6*, 181-193.
114. Cucullo, L.; McAllister, M.S.; Kight, K.; Krizanac-Bengez, L.; Marroni, M.; Mayberg, M.R.; Stanness, K.A.; Janigro, D. A new dynamic *in vitro* model for the multidimensional study of astrocyte-endothelial cell interactions at the blood-brain barrier. *Brain Res.* **2002**, *951*, 243-254.

115. Pekny, M.; Stanness, K.A.; Eliasson, C.; Betsholtz, C.; Janigro, D. Impaired induction of blood-brain barrier properties in aortic endothelial cells by astrocytes from GFAP-deficient mice. *Glia* **1998**, *22*, 390-400.
116. Stanness, K.A.; Guatteo, E.; Janigro, D. A dynamic model of the blood-brain barrier "in vitro". *Neurotoxicology* **1996**, *17*, 481-496.
117. Stanness, K.A.; Westrum, L.E.; Fornaciari, E.; Mascagni, P.; Nelson, J.A.; Stenglein, S.G.; Myers, T.; Janigro, D. Morphological and functional characterization of an *in vitro* blood-brain barrier model. *Brain Res.* **1997**, *771*, 329-342.
118. Stanness, K.A.; Neumaier, J.F.; Sexton, T.J.; Grant, G.A.; Emmi, A.; Maris, D.O.; Janigro, D. A new model of the blood--brain barrier: co-culture of neuronal, endothelial and glial cells under dynamic conditions. *Neuroreport* **1999**, *10*, 3725-3731.
119. Cucullo, L.; Marchi, N.; Hossain, M.; Janigro, D. A dynamic *in vitro* BBB model for the study of immune cell trafficking into the central nervous system. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **2010**, doi: 10.1038/jcbfm.2010.162.
120. Carmeliet, P. Blood vessels and nerves: common signals, pathways and diseases. *Nat. Rev. Genet.* **2003**, *4*, 710-720.
121. Pedata, F.; Latini, S.; Pugliese, A.M.; Pepeu, G. Investigations into the adenosine outflow from hippocampal slices evoked by ischemia-like conditions. *J. Neurochem.* **1993**, *61*, 284-289.
122. Zhang, Y.; Park, T.S.; Gidday, J.M. Hypoxic preconditioning protects human brain endothelium from ischemic apoptosis by Akt-dependent survivin activation. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **2007**, *292*, H2573-H2581.
123. Lee, H.T.; Chang, Y.C.; Tu, Y.F.; Huang, C.C. CREB activation mediates VEGF-A's protection of neurons and cerebral vascular endothelial cells. *J. Neurochem.* **2010**, *113*, 79-91.
124. Gonatas, N.K.; Stieber, A.; Gonatas, J.O. Fragmentation of the Golgi apparatus in neurodegenerative diseases and cell death. *Neurol. Sci.* **2006**, *246*, 21-30.
125. Milner, R.; Hung, S.; Wang, X.; Spatz, M.; del Zoppo, G.J. The rapid decrease in astrocyte-associated dystroglycan expression by focal cerebral ischemia is protease-dependent. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **2008**, *28*, 812-823.
126. Barone, F.C.; White, R.F.; Spera, P.A.; Ellison, J.; Currie, R.W.; Wang, X.; Feuerstein, G.Z. Ischemic preconditioning and brain tolerance: temporal histological and functional outcomes, protein synthesis requirement, and interleukin-1 receptor antagonist and early gene expression. *Stroke* **1998**, *29*, 1937-1951.
127. Haile, W.B.; Echeverry, R.; Wu, J.; Yepes, M. The interaction between tumor necrosis factor-like weak inducer of apoptosis and its receptor fibroblast growth factor-inducible 14 promotes the recruitment of neutrophils into the ischemic brain. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **2010**, *30*, 1147-1156.
128. Bastide, M.; Ouk, T.; Plaisier, F.; Petrault, O.; Stolc, S.; Bordet, R. Neurogliovascular unit after cerebral ischemia: is the vascular wall a pharmacological target. *Psychoneuroendocrinology* **2007**, *32* (Suppl. 1), S36-S39.
129. del Zoppo, G.J.; Mabuchi, T. Cerebral microvessel responses to focal ischemia. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **2003**, *23*, 879-894.

130. Iadecola, C.; Goldman, S.S.; Harder, D.R.; Heistad, D.D.; Katusic, Z.S.; Moskowitz, M.A.; Simard, J.M.; Sloan, M.A.; Traystman, R.J.; Velletri, P.A. Recommendations of the National Heart, Lung, and Blood Institute working group on cerebrovascular biology and disease. *Stroke* **2006**, *37*, 1578-1581.
131. Crampton, S.P.; Davis, J.; Hughes, C.C. Isolation of human umbilical vein endothelial cells (HUVEC). *J. Vis. Exp.* **2007**, 183.
132. Chi, J.T.; Chang, H.Y.; Haraldsen, G.; Jahnsen, F.L.; Troyanskaya, O.G.; Chang, D.S.; Wang, Z.; Rockson, S.G.; van de, R.M.; Botstein, D.; Brown, P.O. Endothelial cell diversity revealed by global expression profiling. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 10623-10628.
133. Conway, E.M.; Carmeliet, P. The diversity of endothelial cells: a challenge for therapeutic angiogenesis. *Genome Biol.* **2004**, *5*, 207.
134. Hoheisel, D.; Nitz, T.; Franke, H.; Wegener, J.; Hakvoort, A.; Tilling, T.; Galla, H. J. Hydrocortisone reinforces the blood-brain barrier properties in a serum free cell culture system. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1998**, *244*, 312-316.
135. Nitz, T.; Eisenblatter, T.; Psathaki, K.; Galla, H.J. Serum-derived factors weaken the barrier properties of cultured porcine brain capillary endothelial cells *in vitro*. *Brain Res.* **2003**, *981*, 30-40.

© 2010 by the authors; licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open-access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution license (<http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>).

2 Identificación de FTs implicados en isquemia cerebral y cerebroreparación

Con el fin de identificar factores de transcripción involucrados en la respuesta a la isquemia cerebral como posibles mecanismos de regulación, empezamos realizando, paralelamente, dos estudios: el análisis de la actividad de unión de diferentes factores de transcripción tras la isquemia cerebral mediante el ensayo *Multiplex Transcription Factor Profiling* y la identificación de TFBS putativos en las secuencias promotoras de genes candidatos implicados en angiogénesis tras la isquemia cerebral, mediante herramientas bioinformáticas (ver apartado 2.1 sección IV). A partir de estos dos estudios, seleccionamos los factores de transcripción OCT2 y HMG1Y y procedimos a su caracterización en el contexto de la isquemia cerebral. Los resultados obtenidos en este apartado se recogieron en dos publicaciones:

Oct-2 Transcription Factor Binding Activity and Expression Up-Regulation in Rat Cerebral Ischaemia is Associated with a Diminution of Neuronal Damage In Vitro. *Neuromolecular Med.* 2014 Jun; 16(2):332-49. doi: 10.1007/s12017-013-8279-1. Epub 2013 Nov 27.

The High Mobility Group I-Y transcription factor is involved in cerebral ischaemia and modulates the expression of angiogenic proteins. *Neuroscience.* 2014 Jun 6; 269:112-30. doi: 10.1016/j.neuroscience.2014.03.036. Epub 2014 Mar 27.

2.1 Identificación de FT implicados en angiogénesis mediante análisis bioinformático

2.1.1 Selección de genes candidatos implicados en angiogénesis tras la isquemia cerebral

Para identificar FTs implicados en la respuesta a la isquemia cerebral, concretamente en los mecanismos de reparación cerebral, se buscaron en la bibliografía grupos de genes

involucrados en la regulación de la función angiogénica. Estos genes (representados en la Tabla 14) fueron seleccionados como genes candidatos para el análisis bioinformático.

Tabla 14a. Genes candidatos involucrados en la regulación de la función angiogénica, seleccionados para el análisis bioinformático (I).

FUNCIÓN	GEN CANDIDATO	
Sobreexpresados en la zona subventricular con función angiogénica después del ictus	Akt1	Proto-oncogen viral de timoma 1
	Angpt2	Angiopoyetina 2
	Ctgf	Factor de crecimiento del tejido conectivo
	Fgf1	Factor de crecimiento de fibroblástico 1
	Hgf	Factor de crecimiento hepatocitario
	Notch4	Gen homólogo Notch
	Ptgs1	Prostaglandina-endoperoxidasa sintasa
	TGFb3	Factor de crecimiento transformante beta 3
	Vegfb	Factor de crecimiento B del endotelio vascular
Regulación de la estimulación, apoptosis y supervivencia de las células endoteliales	PAR 1	Receptor de proteasa activado 1
	Birc5a	Survivin
	XIAP	Inhibidor de apoptosis ligado a X
	EPO	Eritropoyetina
	VEGF	Factor de crecimiento del endotelio vascular
	PDGF	Factor de crecimiento plaquetario
	bFGF	Factor de crecimiento fibroblástico básico
	TGF α , β	Factor de crecimiento transformante alfa, beta
	TNF α	Factor de necrosis tumoral alfa
	HGF	Factor de crecimiento hepatocitario
	TIMP-2	Inhibidor de metaloproteinasas de tejido 2
Adhesión y supervivencia de las células endoteliales. Proteínas de matriz extracelular	COL4A3	Colágeno tipo IV, alfa-3
	LAMA4	Lamin, alfa 4
	FN1	Fibronectina 1
	ELN	Elastina
	NID	Nidogen 1
	Hspg2	Proteoglicano heparán sulfato 2
	SDC	Sindecán
	THBS	Trombospondina 1
	COL18A1	Colágeno, tipo XVIII, alfa-1
	HAS1, 2, 3	Hialuronan sintasa 1, 2, 3
	HABP2	Proteína de unión a hialuronan 2
	HMMR	Receptor de movilidad modulado por hialuronan
	CD44	Antígeno CD44
	ADAMTS	Desintegrina y metaloproteinasas con motivos de trombospondina

RESULTADOS

Tabla 14b. Genes candidatos involucrados en la regulación de la función angiogénica, seleccionados para el análisis bioinformático (II).

FUNCIÓN	GEN CANDIDATO	
Inhibidores de la angiogénesis	PF4	Factor plaquetario 4
	TSP1	Proteína secretora rica en cisteína 2
	TGF-β1	Factor de crecimiento transformante, beta 1
	PAI-1	Inhibidor del activador del plasminógeno
	A2M	Macroglobulina alfa-2
Factores de transcripción involucrados en angiogénesis	TAL1	Leucemia linfocítica aguda de células T, 1
	HAND1, 2	Gen 1 y 2 derivados y expresados en corazón y crestas neurales
	GTF2I	Factor de transcripción general II-I
	GTF2IRD1	Proteína con repeticiones del dominio GTF2I
	HEY1, 2	Potenciador de Split relacionado con el motivo YRPW 1,2
	SREBF1	Factor de transcripción de unión al elemento regulatorio esterol 1
	CREB1	Proteína de unión al elemento de respuesta a cAMP
	FOSL1	Antígeno Fos-like 1
	JUND	Oncogen jun-D
	MEF2C	Factor de transcripción enhancer 2 Mads box, polipéptido C
	SMAD5,4,3,2	Homólogo al gen de drosophila <i>Mothers against decapentaplegic</i> 5, 4, 3, 2
	STAT3	Transductor de la señal y activador de la transcripción 3
	NFATC2	Factor nuclear de células T activadas, citoplasmático, dependiente de calcineurina 2
	KLF2, 5	Factor Kruppel-like 2, 5
	VEZF1	Dedo zinc endotelial vascular 1
	EGR1	Respuesta de crecimiento precoz 1
	NR2F2	Receptor nuclear subfamilia 2, grupo F, miembro 2
	PPARG	Receptor proliferador de peroxisomas activados gamma
	HOXD3, B3, D10, A3, A9	Homeobox D3, B3, D10, A3, A9
	MEOX2	Homeobox mesenquimal 2
	ETS1,2	V-ETS virus aviar eritroblastosis E26 homólogo de oncogén 1
	ELF1,3	Factor E74-like 1, 3
	ELK3	ELK3, proteína con dominio ETS
GET	BDNF	Factor neurotrófico derivado del cerebro
	Nrn1	Neuritin 1
	Arc	Proteína regulada por la actividad asociada al citoesqueleto

GET: genes de expresión temprana

2.1.2 Identificación de sitios de unión putativos: genes candidatos co-expresados e involucrados en procesos de angiogénesis comparten sitios de unión para el FT HMG1Y

Tras la selección de los genes candidatos, las secuencias promotoras de estos genes se sometieron a un análisis bioinformático con el fin de identificar señales de regulación transcripcional y sitios de unión para FTs (TFBS) comunes entre los diferentes genes candidatos co-expresados. Los resultados obtenidos del análisis bioinformático están recopilados y resumidos en las Tablas 15-20, donde los genes candidatos que comparten TFBS comunes se muestran agrupados según la función que desempeñan. La nomenclatura de la base de datos y los programas bioinformáticos se ha conservado. Concretamente V\$ indica el grupo de la especie biológica (vertebrados) y el valor "Q" es un indicativo de la calidad de la matriz de TFBS.

A partir de los resultados obtenidos de este análisis, seleccionamos el FT HMG1Y para ser caracterizado en el contexto de la isquemia cerebral, ya que observamos que genes involucrados en la regulación de la supervivencia, proliferación, diferenciación y maduración de las células endoteliales, así como en la modulación de genes inflamatorios y receptores de superficie celular, comparten TFBS para el FT HMG1Y (Tabla 21). De este modo, el FT HMG1Y apareció como un posible modulador de genes involucrados en el proceso de la angiogénesis.

RESULTADOS

Tabla 15. Sitios de unión para factores de transcripción (TFBS) comunes entre genes candidatos que se sobreexpresan en la zona subventricular del cerebro después de la isquemia cerebral. Se han marcado los genes de estudio que comparten TFBS para el FT HMGIY.

TFBS	GENES	FUNCIÓN
V\$MZF1_01	Akt1, ANGPT2, Ctgf, FGF1, HGF, Noctch4, Ptgs1, TGFb3, VEGFb	Genes sobreexpresados en la zona subventricular del cerebro con funciones angiogénicas después del ictus
V\$NF1_Q6_01	Akt1, ANGPT2, Ctgf, FGF1, HGF, Notch4, TGFb3, VEGFb	
V\$LYF1_01	ANGPT2, Ctgf, FGF1, HGF, Notch4, Ptgs1, TGFb3, VEGFb	
V\$LFA1_Q6	Akt1, ANGPT2, Ctgf, HGF, Notch4, Ptgs1, TGFb3, VEGFb	
V\$ETS_Q4	ANGPT2, Ctgf, HGF, Notch4, Ptgs1, TGFb3, VEGFb3	
V\$SRF_Q5_01	ANGPT2, Ctgf, FGF1, HGF, TGFb3, VEGFb	
V\$PU1_Q6	ANGPT2, FGF1, HGF, Notch4, Ptgs1, TGFb3	
V\$AP1FJ_Q2	Akt1, ANGPT2, Ctgf, Notch4, Ptgs1	
V\$AP1_01	Ctgf, FGF1, Notch4, TGFb3	
V\$MYOGNF1_01	Ctgf, HGF, TGFb3	
V\$MTATA_B	ANGPT2, Ctgf, TGFb3	
V\$HEB_Q6	Notch4, TGFb3, VEGFb	
V\$HAND1E47_01	ANGPT2, Ctgf, Hgf	
V\$ETS1_B	Ctgf, Ptgs1, TGFb3	
V\$ELF1_Q6	ANGPT2, HGF, Ptgs1	
V\$AREB6_04	Ctgf, Notch4, Ptgs1	

“V\$”: grupo de la especie biológica (vertebrados); “Q”: calidad de la matriz de TFBS.

Tabla 16. Sitios de unión para factores de transcripción (TFBS) comunes entre genes candidatos involucrados en la regulación de las funciones de estimulación, muerte/supervivencia de las células endoteliales.

TFBS	GENES	FUNCIÓN
V\$AP1_Q4	SURVIVIN, PAR-1, XIAP	Estimulación, apoptosis/supervivencia de las células endoteliales
V\$E2_Q6	XIAP, EPO	
V\$FOXHJ2_01		
v\$HFH3_01		
V\$AP1FJ_Q2	IL-10, BCL2, BCLxL	Genes anti-apoptóticos
V\$CEBPB_01		
V\$CREB_Q3		
V\$ETS_Q4		
V\$MYOD_01		
V\$NFAT_Q6		
V\$PBX_Q3		
V\$TCF4_Q5		
V\$LMO2COM_01	BCL2, BCLxL	
V\$NRF2_01		
V\$PITX2_Q2		
V\$WHN_B		
V\$AP1_01	IL-10, BCL2	
V\$AP1_Q2		
V\$CRECATF_Q6		
V\$CREB_Q2_01		
V\$CREB_Q4_01		
V\$ER_Q6		
V\$GATA3_03		
V\$HES1_Q2		
V\$MMEF2_Q6		
V\$VMAF_01		
V\$STAT_Q6	VEGF, ANGPT1, FGF2	Supervivencia de las células endoteliales
V\$SMAD_Q6_01	VEGF, ANGPT1, FGF2	
V\$HMGYI_Q6	VEGF, ANGPT1, FGF2	
V\$ZTA_Q2	ANGPT1, FGF2	
V\$MYCMAX_B	VEGF, ANGPT1	
V\$MYOD_Q6_01	VEGF, VEGFB, TGFB1, HGF	
V\$USF_Q6		
V\$TCF1P_Q6	VEGFC, VEGFB, TGFB1, FGF2	

RESULTADOS

Tabla 17. Sitios de unión para factores de transcripción (TFBS) comunes entre genes candidatos implicados en la regulación de la adhesión y supervivencia de las células endoteliales.

TFBS	GENES	FUNCIÓN
V\$SP1_Q2_01	COL4A3, LAMA4, FN1, ELN, NID, hspg2, SDC	Supervivencia y adhesión de las células endoteliales
V\$HELIOSA_01		
V\$EGR_Q6		
V\$MAZ_Q6	COL4A3, LAMA4, FN1, ELN, NID, hspg2	
V\$COMP1	THBS1, THBS2	
V\$OCT1_06	HYAL2, HMMR, HABP2	
V\$AREB6_04	HYAL2, HABP2	
V\$AREB6_02	HMMR, HAS1	
V\$CDPCR3HD_01	CD44, HABP2	
V\$SMAD_Q6_01	HYAL2, CD44	
V\$HNF4_DR1_Q3	HYAL2, CD44	
V\$ZF5_01	ADAMTS1, ADAMTS2, ADAMTS4, ADAMTS5, ADAMTS7, ADAMTS8, ADAMTS12, ADAMTS13, ADAMTS16, ADAMTS17, ADAMTS18, ADAMTS19, ADAMTS20	
V\$Z5F_B		
V\$E2A_Q6	ADAMTS2, ADAMTS4, ADAMTS5, ADAMTS16, ADAMTS17, ADAMTS18	
V\$MYOD_Q6_01		
V\$MYOGENIN_Q6		

Tabla 18. Sitios de unión para factores de transcripción (TFBS) comunes entre genes candidatos involucrados en la inhibición de la angiogénesis.

TFBS	GENES	FUNCIÓN
V\$NFAT_Q4_01	THBS1, TGFB1, PAI-1, A2M	Inhibición de la angiogénesis
V\$NFAT_Q6		
V\$AP1_Q4	THBS1, PAI-1, A2M	
V\$E2F_03	THBS1, TGFB1	
V\$E2F_Q4		
V\$AML1_Q6	TGFB1, PAI-1	

Tabla 19. Sitios de unión para factores de transcripción (TFBS) comunes entre genes candidatos que codifican para FTs involucrados en angiogénesis, clasificados según su función específica.

TFBS	GENES	FUNCIÓN	TFBS	GENES	FUNCIÓN
V\$EGR_Q6	RUNX2, HOXA9, FOXO3A, MLLT7, HDAC1, EGR1	Supervivencia/proliferación celular, diferenciación y maduración de las células endoteliales	V\$DR4_Q2	MEOX2, PPARG, EGR1	Modulación genes inflamatorios
V\$MAZ_Q6			V\$HMGYI_Q6		
V\$MEF2_Q6_01			V\$TFIIA_Q6		
V\$TFIII_Q6			RUNX2, HOXA9, MLLT7, HDAC1, EGR1		V\$ZF5
V\$HMGYI_Q6					
V\$NFAT_Q4_01	V\$SP1				
V\$AP2GAMMA_01	NET1, ETS1, MLLT7, MEF2C, ELF1, NR2F2, ELF3, SMAD3, SMAD4, PPARG, MEOX2, KLF2, FOSL1, ID1, ID3, IGR1, KLF5, STAT3, ZNF161, HAND1, HEY1, HEY2	Factores solubles	V\$TFIII_Q6	ELF1, SMAD2, ID1, ID3, HOXA9, KLF2, EGR1, GTF21, HAND2, CREB1, TAL1, HEY2	
V\$GC_01			V\$NF1_Q6_01	ELF1, SMAD2, ID3, HOXA9, KLF2, EGR1, GTF21, HAND2, TAL1, HEY1	
V\$SP1_Q6			V\$CRX_Q4	SMAD2, ID3, HOXA9, KLF2, EGR1, GTF21, HAND2, CREB1, TAL1, HEY1	
V\$TBP_Q6			V\$CP2_02	ID1, ID3, HOXA9, KLF2, EGR1, GTF21, HAND2, CREB1, TAL1, HEY1	
V\$ZF5_01			V\$MAZ_Q6	ELF1, ID1, ID3, HOXA9, EGR1, CREB1, TAL1, HEY1, HEY2	
V\$EGR_Q6	FOXO1A, FOXO3A, MLLT7, SERBP1, NOTCH1, PPARG	Vía de la PI3K-Akt y otras vías de señalización	V\$HMGYI_Q6	SMAD2, ID1, ID3, HOXA9, EGR1, GTF21, HAND2, TAL1, HEY1	Receptores superficie celular
V\$LFA1_Q6			V\$HELIOSA_02	ELF1, SMAD2, ID1, ID3, HOXA9, GTF21, HAND2, CREB1, TAL1	
V\$MUSCLE_INI_B			V\$ELK1_02	SMAD1, ID3, HOXA9, KLF2, EGR1, GTF21, CREB1, TAL1, HEY1	
V\$CETS168_Q6	FOXO3A, MLLT7, SERBP1	V\$XPF1_Q6	ID3, HOXA9, EGR1, GTF21, CREB1, TAL1, HEY1, HEY2		
V\$SMAD4_Q6		V\$E2F_Q6	ELF1, SMAD2, ID3, GTF21, HAND2, CREB1, HEY1, HEY2		
V\$E2F1_Q4_01	FOXO3A, MLLT7, SERBP1		V\$MAZR_01	ELF1, GTF21, HAND2, CREB1, TAL1, HEY2	
V\$YY1_02			V\$AHRHIF_Q6	SMAD2, HOXA9, GTF21, HAND2, HEY1, HEY2	
			V\$MEIS1_01	KLF2, GTF21, CREB1, TAL1, HEY1	

RESULTADOS

Tabla 20. Sitios de unión para factores de transcripción (TFBS) comunes entre genes candidatos de respuesta inmediata.

TFBS	GENES	FUNCIÓN
V\$AP1	BDNF, NRN1, ARC	Genes de respuesta inmediata
V\$KROX		
V\$USF		
V\$HAND1	BDNF, ARC	
V\$SREBP1		
V\$COMP1	BDNF, NRN1	
V\$E2F1		
V\$ELK		
V\$ETS1		
V\$IK1		
V\$IRF1		
V\$IRF7		
V\$IRF		
V\$MTATA		

Tabla 21. Resumen de los genes candidatos que comparten sitios de unión para factores de transcripción (TFBS) comunes para HMG1Y en sus promotores, de acuerdo con el análisis bioinformático (Tablas 14-19).

TFBS	GENES	FUNCIÓN
V\$HMG1Y	VEGF, ANGPT1, FGF2	Supervivencia de las células endoteliales
	RUNX2, HOXA9, MLLT7, HDAC1, EGR1	Proliferación/supervivencia celular, diferenciación y maduración de las células endoteliales
	MEOX2, PPARG, EGR1	Modulación de genes inflamatorios
	SMAD2, ID1, ID3, HOXA9, EGR1, GTF2I, HAND2, TAL1, HEY1	Receptores de superficie celular

2.2 Identificación de FTs con actividad de unión diferencial tras la isquemia cerebral

Los resultados obtenidos tras analizar la actividad de unión de 50 FTs simultáneamente en los extractos nucleares de corteza cerebral de rata muestran que la isquemia cerebral experimental induce cambios en la actividad de unión de los diferentes FTs analizados.

En la Figura 23 se representa la intensidad de fluorescencia media (IFM) para cada uno de los FTs analizados en extractos nucleares obtenidos de cerebro de ratas control, y sometida a isquemia cerebral. Se han analizado por separado las distintas zonas isquémicas (el núcleo o *core* del infarto, el peri-infarto isquémico y el tejido sano ipsilateral) a las 6, 24 y 72 horas y a los 7 y 14 días post-isquemia.

En el Anexo VII se han representado los valores de IFM de cada FT en las distintas muestras analizadas independientemente. Los resultados obtenidos muestran que los factores de transcripción que presentan mayor actividad de unión tanto en el hemisferio ipsilateral como en el contralateral a la MCAO, independientemente del tiempo analizado, son el factor de respuesta de crecimiento inicial (EGR, del inglés *early growth response*) y el factor nuclear-1 (NF1, del inglés *nuclear factor 1*). La única excepción la encontramos en el día 7 tras la isquemia, tiempo en el cual el FT EGR no es mayoritario en las zonas del núcleo y la penumbra del infarto. Estos FTs aparecieron también en el análisis bioinformático.

Los datos obtenidos del análisis de la actividad de unión de los 50 FTs tras la isquemia cerebral experimental mediante el ensayo *Multiplex Transcription Factor Profiling* también se representaron en diagramas de dispersión (Figura 23). Cada punto de la gráfica corresponde a un FT diferente.

Según los resultados de estas gráficas, a las 6 horas de reperusión se observó una actividad de unión menor al control (tejido contralateral a la MCAO) en los FTs SP1 (en las zona

RESULTADOS

del peri-infarto y tejido no dañado ipsilateral a la MCAO) y en la familia Octamer (en el núcleo del infarto, en el peri-infarto y en el tejido no dañado ipsilateral a la MCAO) ya que representaron puntos no co-alineados situados a la parte inferior a la recta.

A las 24 horas de reperusión tras la isquemia cerebral experimental, se observó un aumento de la actividad de unión del FT CRE-ATF1 en el núcleo del infarto, mientras que en el tejido no dañado ipsilateral a la MCAO, se observó una ligera disminución de ésta. En el núcleo del infarto también se incrementó la actividad de unión del FT NFκB. Además, la actividad de unión de la familia Octamer continuó mostrándose inferior respecto al control en las tres zonas cerebrales analizadas (principalmente en el tejido no dañado ipsilateral a la MCAO), así como también la del FT CREB.

Por otro lado, a las 72 horas de reperusión, en el núcleo del infarto se observó una ligera disminución de la actividad de unión de los FTs AP2, PPAR y la familia Octamer, respecto al control contralateral. En el tejido peri-infartado, la familia Octamer continuó con una menor actividad de unión, mientras que el FT CRE-ATF1 mostró un aumento de ésta. Y en el tejido no dañado ipsilateral se observó un aumento de la actividad de unión de los FTs CRE-ATF1, SP1 y NFAT respecto al control.

En las muestras obtenidas a los 7 días de reperusión, la actividad de unión de NFκB se vio aumentada en el núcleo y el peri-infarto ipsilateral, en cambio en el tejido no dañado ipsilateral incrementó la actividad de unión de los FTs CRE-ATF1, SP1 y AP2. Por otro lado, el tejido peri-infartado ipsilateral se caracterizó por una disminución de la actividad de unión de los FTs CRE-ATF1 y HNF1. En el núcleo del infarto y el tejido peri-infartado, la familia Octamer mantuvo una actividad de unión inferior al control contralateral.

Finalmente, a los 14 días de reperusión tras la isquemia cerebral experimental, se observó una disminución de la actividad de unión de HNF1 en el tejido peri-infartado y un aumento en la actividad de la familia Octamer tanto en el núcleo del infarto como en el tejido

peri-infartado. Finalmente, el tejido no dañado ipsilateral se caracterizó por un aumento de la actividad de unión de los FTs CRE-ATF1 y SP1.

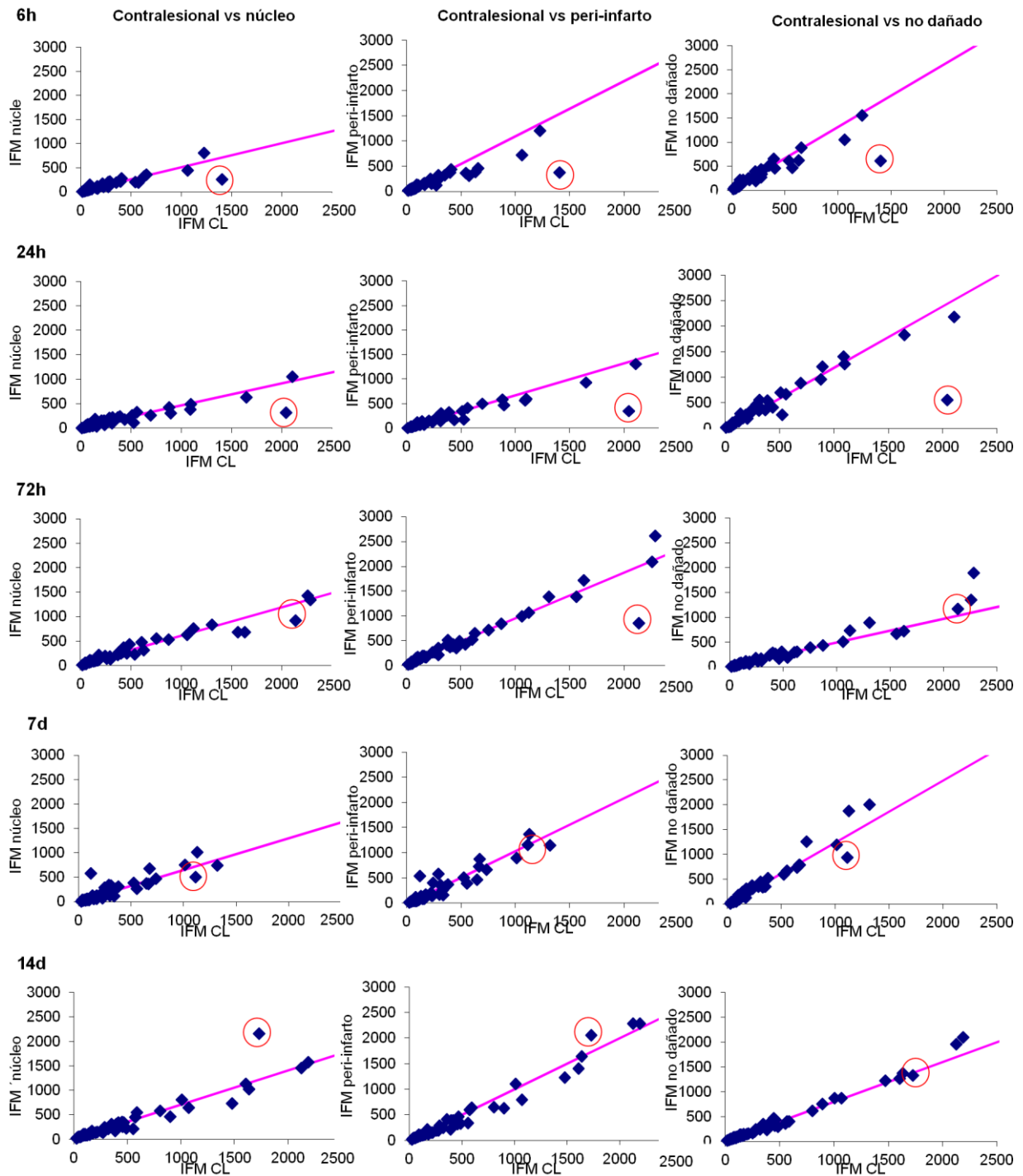


Figura 23. Análisis de la actividad de unión de 50 FTs diferentes en extractos nucleares de tejido isquémico y control de rata (tejido contralateral a la MCAO). Comparación de la actividad de unión de los FTs en el núcleo del infarto, el tejido peri-infartado y el tejido no dañado ipsilateral a la MCAO respecto al tejido contralateral (CL) a la MCAO, recogidas a las 6, 24 y 72 horas y 7 y 14 días de reperusión. La actividad de unión se midió como la intensidad de fluorescencia media (IFM). La actividad de unión de la familia Octamer está indicada mediante un círculo rojo.

2.2.1 La isquemia cerebral modifica la actividad de unión de la familia de factores de transcripción Octamer

De los resultados obtenidos en la cuantificación de la actividad de unión de los 50 FTs tras la isquemia, destacó la familia octamer, la cual presentó una actividad de unión diferencial entre la fase aguda y la fase crónica de la isquemia cerebral experimental. En la fase aguda, se observó la inhibición de su actividad de unión por encima del 70% en el tejido isquémico respecto al tejido cerebral contralateral (Figura 24 A), detectándose la menor actividad de unión a las 24 horas de reperusión, mostrando una inducción del 0,23 (correspondiente a un valor de IFM=558) en el tejido no dañado ipsilateral a la MCAO en comparación con el tejido contralateral a la MCAO (valor de IFM=2040; Dev F=9,81). Por otro lado, a los 7 y 14 días (fase crónica), se observó un aumento de la actividad de unión de la familia octamer en el tejido cerebral isquémico respecto a del tejido contralateral a la MCAO (Figura 24 B), principalmente a los 14 días, tiempo en el cual el tejido cerebral isquémico (concretamente núcleo y peri-infarto ipsilateral a la MCAO) mostró la máxima actividad de unión (inducción de la actividad de unión=1,78 en el núcleo) respecto al tejido control contralateral a la MCAO (Dev F=7,56). En la Tabla 22 se muestran los valores de la actividad de unión de la familia de FTs octamer (valores reales y previstos) medidos en IFM y los valores de inducción (<0: inhibición de la actividad de unión; >0: aumento de la actividad de unión, respecto al control contralateral) en las diferentes áreas de infarto y a los diferentes tiempos analizados.

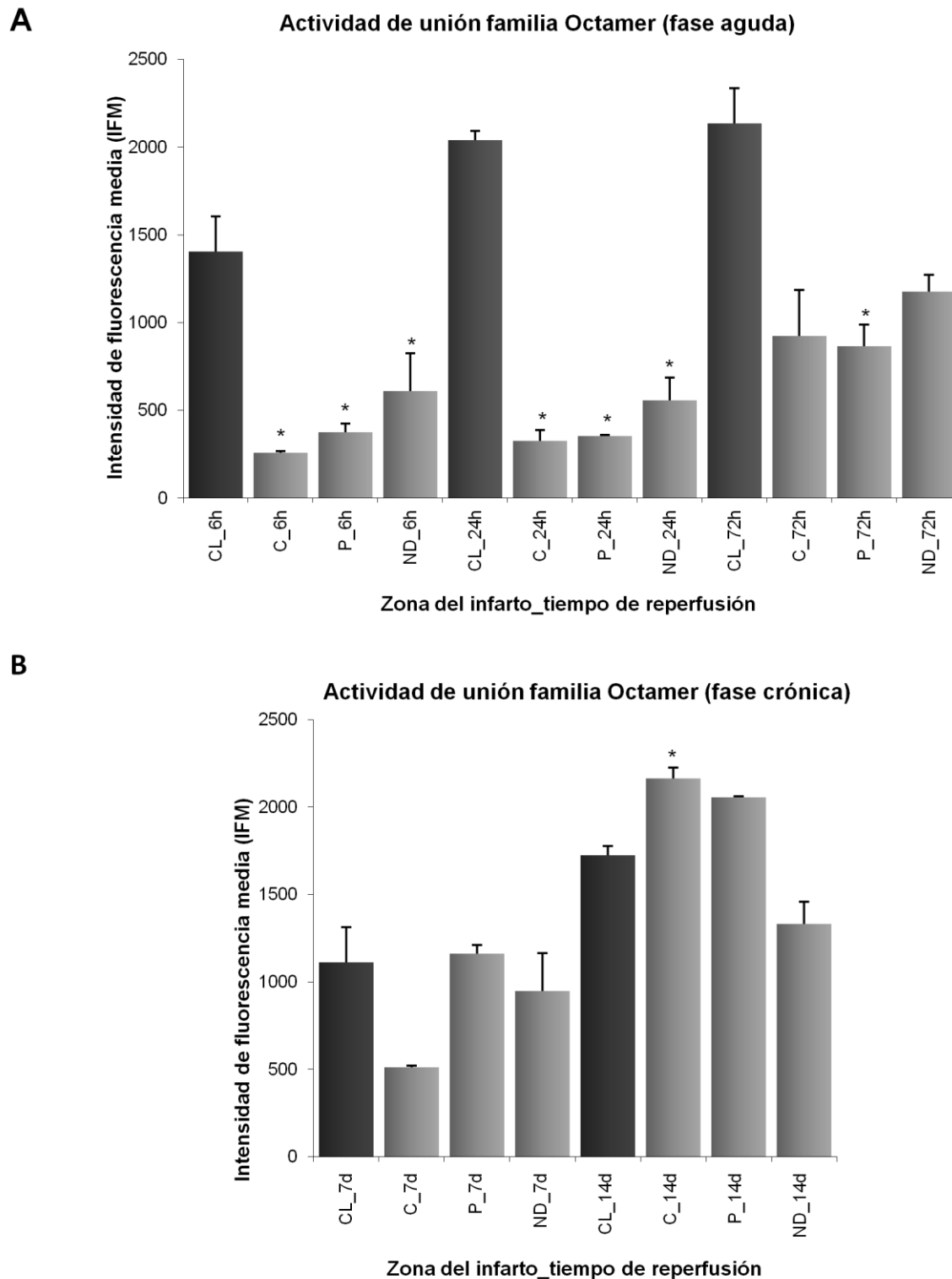


Figura 24. Análisis de la actividad de unión (medida en IFM) de la familia de FTs Octamer, en extractos nucleares de cerebro de rata sometida a TMCAO, en diferentes áreas del infarto (núcleo: C, peri-infarto: P, no dañado: ND) en la fase aguda (A) y crónica de la isquemia cerebral (B) comparado con el tejido control contralateral (CL) correspondiente. (*) Indica cambios significativos, es decir aquellos en que se ha observado una inducción de la actividad de unión $\geq 1,25$ veces y una Dev F $\geq 2,0$ respecto al control o bien una inducción $\leq 0,75$ veces (es decir una reducción de su actividad) y una Dev F $\geq 2,0$ respecto al control. Los valores de IFM específicos se muestran en la Tabla 22.

RESULTADOS

Tabla 22. Comparación de la actividad de unión de octamer, en las diferentes áreas del infarto en las fases aguda y crónica de la isquemia cerebral. Se consideran cambios significativos aquellos en que se ha observado una inducción de la actividad de unión $\geq 1,25$ veces y una Dev F $\geq 2,0$ respecto al control o bien una inducción $\leq 0,75$ veces (es decir una reducción de su actividad) y una Dev F $\geq 2,0$ respecto al control.

Tiempo de reperusión después de tMCAO y zona de infarto	Actividad de unión (IFM)	IFM prevista	% de la prevista	Dev F	Inducción (Fold ind)
6 h					
Tejido CL	1403				
Núcleo	260	712	-64	4.09	0.36 *
Peri-infarto	375	1536	-76	4.27	0.24 *
Tejido ND	609	1839	-67	2.57	0.33 *
24h					
Tejido CL	2040				
Núcleo	326	933	-65	7.16	0.35 *
Peri-infarto	355	1348	-74	24.68	0.26 *
Tejido ND	558	2433	-77	9.81	0.23 *
72h					
Tejido CL	2135				
Núcleo	923	1269	-27	0.91	0.73
Peri-infarto	865	1997	-57	3.67	0.43 *
Tejido ND	1176	1033	14	0.74	1.14
7d					
Tejido CL	1113				
Núcleo	513	723	-29	1.50	0.71
Peri-infarto	1160	1149	1	0.06	1.01
Tejido ND	948	1379	-31	1.96	0.69
14d					
Tejido CL	1726				
Núcleo	2164	1217	78	7.56	1.78 *
Peri-infarto	2056	1726	19	3.07	1.19
Tejido ND	1330	1381	-4	0.22	0.96

Tejido contralateral a la MCAO (tejido CL); tejido no dañado ipsilateral a la MCAO (tejido ND); valor de IFM que se esperaría si la isquemia no tuviera ningún efecto en la muestra estudiada (IFM prevista); porcentaje del cambio de la IFM de la muestra estudiada comparado con la IFM prevista. Los valores en los que las diferencias entre la actividad de unión del tejido isquémico respecto al tejido contralateral a la MCAO fueron significativos están marcados con (*).

De entre todos los miembros de la familia Octamer, se seleccionó el FT Oct-2 debido a que es el único de la familia que se expresa en cerebro y por sus peculiares características, tal y como se recoge en el apartado 2 de la sección VI (Discusión).

3 Estudio y caracterización de los FTs seleccionados en isquemia cerebral de rata

3.1 Caracterización del factor de transcripción Oct-2

3.1.1 Identificación de isoformas en cerebro de rata: los transcritos del FT Oct-2 se expresan en condiciones control e isquémicas

Para caracterizar el FT Oct-2 o POU2F2 en cerebro de rata y en isquemia cerebral, empezamos buscando las variantes transcripcionales predichas con el programa *Ensembl* y comprobamos mediante PCR convencional y cebadores específicos, su expresión real en condiciones control e isquémicas (pMCAO).

3.1.1.1 Predicción de las isoformas de Oct-2 en cerebro de rata mediante *Ensembl*

La predicción *Ensembl* indicó que existen seis transcritos de Oct-2 candidatos para la especie *Rattus norvegicus*. En la Figura 25 se muestran los resultados obtenidos en la búsqueda mediante *Ensembl*. En la Tabla 23 se indican los diferentes nombres de los transcritos según *Ensembl* y las correspondientes abreviaturas utilizadas para facilitar la lectura en la presente tesis.

RESULTADOS

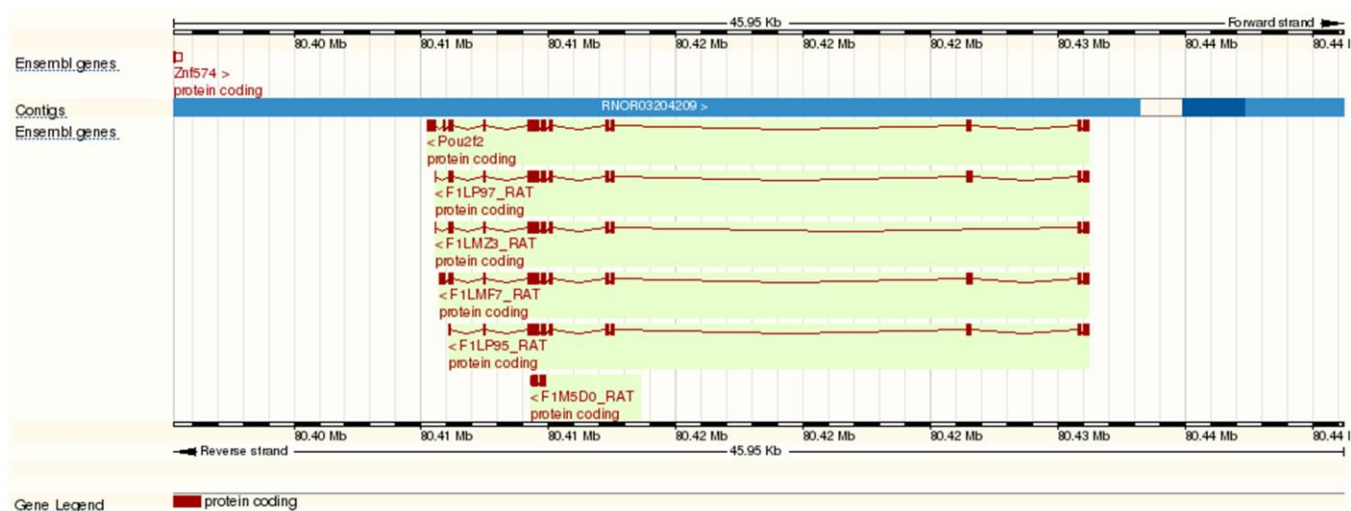


Figura 25. Resultados de la predicción de los transcritos de Oct-2 (gen *Pou2f2*) en la especie de rata (*Rattus norvegicus*) mediante el programa *Ensembl*.

Tabla 23. Nombre y número de identificación (ID) de los transcritos según el programa *Ensembl* y su correspondiente abreviatura utilizada en la presente tesis.

Nombre	ID transcrito (<i>Ensembl</i>)	Abreviatura
Pou2f2/Pou2f2-201*	ENSRNOT00000048002	Oct-2_002
F1LP97_RAT/Pou2f2-202*	ENSRNOT00000027649	Oct-2_649
F1LMZ3_RAT/Pou2f2-203*	ENSRNOT00000046678	Oct-2_678
F1LMF7_RAT	ENSRNOT00000041651	Oct-2_651
F1LP95_RAT	ENSRNOT00000027655	Oct-2_655
F1M5D0_RAT	ENSRNOT00000068776	Oct-2_776

* Indica el nombre actual de los transcritos predichos por la última versión del *Ensembl*.

3.1.1.2 Identificación de las isoformas de Oct-2 expresadas en cerebro de rata mediante PCR

A partir del ADNc de cerebro de rata y mediante PCR y cebadores específicos (ver Tabla 8 sección IV y Figura 26) se amplificaron los transcritos para identificar cuáles de los predichos por *Ensembl* se expresan en cerebro, en condiciones control y en condiciones de isquemia

experimental (pMCAO). En la Figura 26 se muestra el resultado del alineamiento de las secuencias de ADNc de las isoformas de Oct-2 predichas en la especie de *Rattus norvegicus* por *Ensembl*. Los resultados de la PCR (Figura 27) mostraron la amplificación de cinco fragmentos, tanto en condiciones control como en condiciones de pMCAO, que corresponden a los transcritos Oct-2_002 (fragmento de 269 pares de bases (pb)), Oct-2_649 (fragmento de 252 pb), Oct-2_651 (fragmento de 156 pb), Oct-2_678 (fragmento de 509 pb) y Oct-2_776 (fragmento de 107 pb), descritos según *Ensembl*. El transcrito Oct-2_655 (337 bp), no presentó expresión en ninguna de las dos condiciones estudiadas ya que en la PCR correspondiente sólo se observó una banda de 470 pb, correspondiente a la amplificación del resto de variantes de Oct-2.

```

Oct-2_002 ATGGTTCATTCCAGCATGGGGGCTCCAGAAATAAGAATGTCTAAGCCCCTGGAGGCCGAG 60
Oct-2_678 ATGGTTCATTCCAGCATGGGGGCTCCAGAAATAAGAATGTCTAAGCCCCTGGAGGCCGAG 60
Oct-2_651 ATGGTTCATTCCAGCATGGGGGCTCCAGAAATAAGAATGTCTAAGCCCCTGGAGGCCGAG 60
Oct-2_655 ATGGTTCATTCCAGCATGGGGGCTCCAGAAATAAGAATGTCTAAGCCCCTGGAGGCCGAG 60
Oct-2_649 ATGGTTCATTCCAGCATGGGGGCTCCAGAAATAAGAATGTCTAAGCCCCTGGAGGCCGAG 60
Oct-2_776 -----

Oct-2_002 AAGCAAAGTCTGGACTCCCCGTCAGAGCACACAGACACTGAAAGAAATGGACCCGACATT 120
Oct-2_678 AAGCAAAGTCTGGACTCCCCGTCAGAGCACACAGACACTGAAAGAAATGGACCCGACATT 120
Oct-2_651 AAGCAAAGTCTGGACTCCCCGTCAGAGCACACAGACACTGAAAGAAATGGACCCGACATT 120
Oct-2_655 AAGCAAAGTCTGGACTCCCCGTCAGAGCACACAGACACTGAAAGAAATGGACCCGACATT 120
Oct-2_649 AAGCAAAGTCTGGACTCCCCGTCAGAGCACACAGACACTGAAAGAAATGGACCCGACATT 120
Oct-2_776 -----

Oct-2_002 AACCATCAGAACCCCCAGAACAAAGCGTCCCCATTCTCTGTGTCCCCAACTGGCCCCAGC 180
Oct-2_678 AACCATCAGAACCCCCAGAACAAAGCGTCCCCATTCTCTGTGTCCCCAACTGGCCCCAGC 180
Oct-2_651 AACCATCAGAACCCCCAGAACAAAGCGTCCCCATTCTCTGTGTCCCCAACTGGCCCCAGC 180
Oct-2_655 AACCATCAGAACCCCCAGAACAAAGCGTCCCCATTCTCTGTGTCCCCAACTGGCCCCAGC 180
Oct-2_649 AACCATCAGAACCCCCAGAACAAAGCGTCCCCATTCTCTGTGTCCCCAACTGGCCCCAGC 180
Oct-2_776 -----

Oct-2_002 ACCAAGA----- 187
Oct-2_678 ACCAAG----- 186
Oct-2_651 ACCAAGGTGGGCATTCTCTCTGGCCTCCACTTAACATTCTGGGGTCCCGGACCCCTGCCTC 240
Oct-2_655 ACCAAG----- 186
Oct-2_649 ACCAAGGTGGGCATTCTCTCTGGCCTCCACTTAACATTCTGGGGTCCCGGACCCCTGCCTC 240
Oct-2_776 -----

Oct-2_002 -----TCAAGGCTGAAGACCCAGTGGTGATTTCAGCCCAGCAGCACCCTCG 234
Oct-2_678 -----
Oct-2_651 TCTCCTCCCCAGATCAAGGCTGAAGACCCAGTGGTGATTTCAGCCCAGCAGCACCCTCG 300
Oct-2_655 -----ATCAAGGCTGAAGACCCAGTGGTGATTTCAGCCCAGCAGCACCCTCG 234
Oct-2_649 TCTCCTCCCCAGATCAAGGCTGAAGACCCAGTGGTGATTTCAGCCCAGCAGCACCCTCG 300
Oct-2_776 -----

Oct-2_002 CCCCCCAGCCGGCTCAGCCTCATCTGCCCCAGGCCAACTCATGTTGACGGGCAGCCAG 294
Oct-2_678 -----
Oct-2_651 CCCCCCAGCCGGCTCAGCCTCATCTGCCCCAGGCCAACTCATGTTGACGGGCAGCCAG 360
Oct-2_655 CCCCCCAGCCGGCTCAGCCTCATCTGCCCCAGGCCAACTCATGTTGACGGGCAGCCAG 294
Oct-2_649 CCCCCCAGCCGGCTCAGCCTCATCTGCCCCAGGCCAACTCATGTTGACGGGCAGCCAG 360
Oct-2_776 -----

Oct-2_002 CTAGCTGGGGACATACAGCAACTCCTCCAGCTCCAACAGCTGGTGCTTGTCCCCGGCCAC 354
Oct-2_678 -----GACATACAGCAACTCCTCCAGCTCCAACAGCTGGTGCTTGTCCCCGGCCAC 237
Oct-2_651 CTAGCTGGGGACATACAGCAACTCCTCCAGCTCCAACAGCTGGTGCTTGTCCCCGGCCAC 420
Oct-2_655 CTAGCTGGGGACATACAGCAACTCCTCCAGCTCCAACAGCTGGTGCTTGTCCCCGGCCAC 354
Oct-2_649 CTAGCTGGGGACATACAGCAACTCCTCCAGCTCCAACAGCTGGTGCTTGTCCCCGGCCAC 420

```

Figura 26 (cont)

RESULTADOS

```

Oct-2_776 -----
Oct-2_002 CACCTCCAGCCACCTGCTCAGTTCCCTGCTGCCACAAGCGCAGCAGAGTCAGCCAGGGCTG 414
Oct-2_678 CACCTCCAGCCACCTGCTCAGTTCCCTGCTGCCACAAGCGCAGCAGAGTCAGCCAGGGCTG 297
Oct-2_651 CACCTCCAGCCACCTGCTCAGTTCCCTGCTGCCACAAGCGCAGCAGAGTCAGCCAGGGCTG 480
Oct-2_655 CACCTCCAGCCACCTGCTCAGTTCCCTGCTGCCACAAGCGCAGCAGAGTCAGCCAGGGCTG 414
Oct-2_649 CACCTCCAGCCACCTGCTCAGTTCCCTGCTGCCACAAGCGCAGCAGAGTCAGCCAGGGCTG 480
Oct-2_776 -----

Oct-2_002 CTACCAACGCCAAATCTATTCCAGTACCTCAGCAAACCCAGGGAGCTCTCCTGACCTCC 474
Oct-2_678 CTACCAACGCCAAATCTATTCCAGTACCTCAGCAAACCCAGGGAGCTCTCCTGACCTCC 357
Oct-2_651 CTACCAACGCCAAATCTATTCCAGTACCTCAGCAAACCCAGGGAGCTCTCCTGACCTCC 540
Oct-2_655 CTACCAACGCCAAATCTATTCCAGTACCTCAGCAAACCCAGGGAGCTCTCCTGACCTCC 474
Oct-2_649 CTACCAACGCCAAATCTATTCCAGTACCTCAGCAAACCCAGGGAGCTCTCCTGACCTCC 540
Oct-2_776 -----

Oct-2_002 CAGCCCCGGGTGGGCTTCCCTACACAGCCCTCGAAATGCTTGGAGCCACCATCCCACCCG 534
Oct-2_678 CAGCCCCGGGTGGGCTTCCCTACACAGCCCTCGAAATGCTTGGAGCCACCATCCCACCCG 417
Oct-2_651 CAGCCCCGGGTGGGCTTCCCTACACAGCCCTCGAAATGCTTGGAGCCACCATCCCACCCG 600
Oct-2_655 CAGCCCCGGGTGGGCTTCCCTACACAGCCCTCGAAATGCTTGGAGCCACCATCCCACCCG 534
Oct-2_649 CAGCCCCGGGTGGGCTTCCCTACACAGCCCTCGAAATGCTTGGAGCCACCATCCCACCCG 600
Oct-2_776 -----TACCACCAG 9
* .***** . *

Oct-2_002 GAGGAGCCAGTGATCTGGAGGAGCTGGAACAGTTCGCTCGCACCTTCAAGCAACGCCGC 594
Oct-2_678 GAGGAGCCAGTGATCTGGAGGAGCTGGAACAGTTCGCTCGCACCTTCAAGCAACGCCGC 477
Oct-2_651 GAGGAGCCAGTGATCTGGAGGAGCTGGAACAGTTCGCTCGCACCTTCAAGCAACGCCGC 660
Oct-2_655 GAGGAGCCAGTGATCTGGAGGAGCTGGAACAGTTCGCTCGCACCTTCAAGCAACGCCGC 594
Oct-2_649 GAGGAGCCAGTGATCTGGAGGAGCTGGAACAGTTCGCTCGCACCTTCAAGCAACGCCGC 660
Oct-2_776 -----

Oct-2_002 ATCAAGCTGGGCTTACACAGGGTGATGTGGGCTGGCCATGGGCAAGCTCTATGGCAAC 654
Oct-2_678 ATCAAGCTGGGCTTACACAGGGTGATGTGGGCTGGCCATGGGCAAGCTCTATGGCAAC 537
Oct-2_651 ATCAAGCTGGGCTTACACAGGGTGATGTGGGCTGGCCATGGGCAAGCTCTATGGCAAC 720
Oct-2_655 ATCAAGCTGGGCTTACACAGGGTGATGTGGGCTGGCCATGGGCAAGCTCTATGGCAAC 654
Oct-2_649 ATCAAGCTGGGCTTACACAGGGTGATGTGGGCTGGCCATGGGCAAGCTCTATGGCAAC 720
Oct-2_776 -----GGTGATGTGGGCTGGCCATGGGCAAGCTCTATGGCAAC 48
*****

Oct-2_002 GACTTCAGCCAAACGACCATTTCCTCGCTTCGAGGCCCTTAACCTGAGCTTCAAGAACATG 714
Oct-2_678 GACTTCAGCCAAACGACCATTTCCTCGCTTCGAGGCCCTTAACCTGAGCTTCAAGAACATG 597
Oct-2_651 GACTTCAGCCAAACGACCATTTCCTCGCTTCGAGGCCCTTAACCTGAGCTTCAAGAACATG 780
Oct-2_655 GACTTCAGCCAAACGACCATTTCCTCGCTTCGAGGCCCTTAACCTGAGCTTCAAGAACATG 714
Oct-2_649 GACTTCAGCCAAACGACCATTTCCTCGCTTCGAGGCCCTTAACCTGAGCTTCAAGAACATG 780
Oct-2_776 GACTTCAGCCAAACGACCATTTCCTCGCTTCGAGGCCCTTAACCTGAGCTTCAAGAACATG 108
*****

Oct-2_002 TGTAAACTCAAGCCCTCCTGGAGAAGTGGCTCAACGACGCGAGAGACTATGTCTG--TGG 772
Oct-2_678 TGTAAACTCAAGCCCTCCTGGAGAAGTGGCTCAACGACGCGAGAGACTATGTCTG--TGG 655
Oct-2_651 TGTAAACTCAAGCCCTCCTGGAGAAGTGGCTCAACGACGCGAGAGACTATGTCTG--TGG 838
Oct-2_655 TGTAAACTCAAGCCCTCCTGGAGAAGTGGCTCAACGACGCGAGAGACTATGTCTG--TGG 772
Oct-2_649 TGTAAACTCAAGCCCTCCTGGAGAAGTGGCTCAACGACGCGAGAGACTATGTCTG--TGG 838
Oct-2_776 TGTAAACTCAAGCCCTCCTGGAGAAGTGGCTCAACGACGCGAGG--TGAGCCTGGCTGG 165
*****

Oct-2_002 ATTCAGGCTACCCAGCCAAACCAGCTGAGCAGCCAGCCTGGGTTTCGACGGGCTGC 832
Oct-2_678 ATTCAGGCTACCCAGCCAAACCAGCTGAGCAGCCAGCCTGGGTTTCGACGGGCTGC 715
Oct-2_651 ATTCAGGCTACCCAGCCAAACCAGCTGAGCAGCCAGCCTGGGTTTCGACGGGCTGC 898
Oct-2_655 ATTCAGGCTACCCAGCCAAACCAGCTGAGCAGCCAGCCTGGGTTTCGACGGGCTGC 832
Oct-2_649 ATTCAGGCTACCCAGCCAAACCAGCTGAGCAGCCAGCCTGGGTTTCGACGGGCTGC 898
Oct-2_776 AGGCCTCGTGGGGCGCCAAACCAGGGGA--CTGCCAAACCAG-----CTGAGCAGC 217
* . . * * .***** . * . * * * * * * . * . * * * * *

Oct-2_002 CGGGCGGAGACGCAAGAAGAGGACCAGCATCGAGACGAATGTCCGCTTCGCCTTAGAGA 892
Oct-2_678 CGGGCGGAGACGCAAGAAGAGGACCAGCATCGAGACGAATGTCCGCTTCGCCTTAGAGA 775
Oct-2_651 CGGGCGGAGACGCAAGAAGAGGACCAGCATCGAGACGAATGTCCGCTTCGCCTTAGAGA 958
Oct-2_655 CGGGCGGAGACGCAAGAAGAGGACCAGCATCGAGACGAATGTCCGCTTCGCCTTAGAGA 892
Oct-2_649 CGGGCGGAGACGCAAGAAGAGGACCAGCATCGAGACGAATGTCCGCTTCGCCTTAGAGA 958
Oct-2_776 CCCAGCTGGACGCAAGAAGAGGACCAGCATCGAGACGAATGTCCGCTTCGCCTTAGAGA 277
* . * . * .*****

Oct-2_002 AGAGTTTCTAGCGAACCAGAAGCCTACCTCAGAGGAGATCCTGCTGATTGCAGAGCAGC 952
Oct-2_678 AGAGTTTCTAGCGAACCAGAAGCCTACCTCAGAGGAGATCCTGCTGATTGCAGAGCAGC 835
Oct-2_651 AGAGTTTCTAGCGAACCAGAAGCCTACCTCAGAGGAGATCCTGCTGATTGCAGAGCAGC 1018
Oct-2_655 AGAGTTTCTAGCGAACCAGAAGCCTACCTCAGAGGAGATCCTGCTGATTGCAGAGCAGC 952
Oct-2_649 AGAGTTTCTAGCGAACCAGAAGCCTACCTCAGAGGAGATCCTGCTGATTGCAGAGCAGC 1018
Oct-2_776 AGAGTTTCTAGCGAACCAGAAGCCTACCTCAGAGGAGATCCTGCTGATTGCAGAGCAGC 337
*****

Oct-2_002 TGCACATGAAAAGGAAGTGATCCCGCTCTGGTTCTGCAACCGGGCCAGAAGGAGAAAAC 1012
Oct-2_678 TGCACATGAAAAGGAAGTGATCCCGCTCTGGTTCTGCAACCGGGCCAGAAGGAGAAAAC 895
Oct-2_651 TGCACATGAAAAGGAAGTGATCCCGCTCTGGTTCTGCAACCGGGCCAGAAGGAGAAAAC 1078
Oct-2_655 TGCACATGAAAAGGAAGTGATCCCGCTCTGGTTCTGCAACCGGGCCAGAAGGAGAAAAC 1012
Oct-2_649 TGCACATGAAAAGGAAGTGATCCCGCTCTGGTTCTGCAACCGGGCCAGAAGGAGAAAAC 1078

```

Figura 26 (cont)

```

Oct-2_776 TGCACATGGAAGGAAAGTATC----- 360
*****

Oct-2_002 GCATCAACCCCTGTCAGTGCAGGCCCCATGCTGCCAGCCCGGAAAGCCGACCAGTTACA 1072
Oct-2_678 GCATCAACCCCTGTCAGTGCAGGCCCCATGCTGCCAGCCCGGAAAGCCGACCAGTTACA 955
Oct-2_651 GCATCAACCCCTGTCAGTGCAGGCCCCATGCTGCCAGCCCGGAAAGCCGACCAGTTACA 1138
Oct-2_655 GCATCAACCCCTGTCAGTGCAGGCCCCATGCTGCCAGCCCGGAAAGCCGACCAGTTACA 1072
Oct-2_649 GCATCAACCCCTGTCAGTGCAGGCCCCATGCTGCCAGCCCGGAAAGCCGACCAGTTACA 1138
Oct-2_776 -----

Oct-2_002 GCCCGCACCTGGTCACACCCCAAGGGGGCGCAGGAACCTTACCATTGTCCCAAGCTTCTA 1132
Oct-2_678 GCCCGCACCTGGTCACACCCCAAGGGGGCGCAGGAACCTTACCATTGTCCCAAGCTTCTA 1015
Oct-2_651 GCCCGCACCTGGTCACACCCCAAGGGGGCGCAGGAACCTTACCATTGTCCCAAGCTTCTA 1198
Oct-2_655 GCCCGCACCTGGTCACACCCCAAGGGGGCGCAGGAACCTTACCATTGTCCCAAGCTTCTA 1132
Oct-2_649 GCCCGCACCTGGTCACACCCCAAGGGGGCGCAGGAACCTTACCATTGTCCCAAGCTTCTA 1198
Oct-2_776 -----

Oct-2_002 GCAGTCTGAGCACAACAGTTACTACCTTATCCTCAGCTGTGGGGACACTCCATCCCAGCC 1192
Oct-2_678 GCAGTCTGAGCACAACAGTTACTACCTTATCCTCAGCTGTGGGGACACTCCATCCCAGCC 1075
Oct-2_651 GCAGTCTGAGCACAACAGTTACTACCTTATCCTCAGCTGTGGGGACACTCCATCCCAGCC 1258
Oct-2_655 GCAGTCTGAGCACAACAG----- 1150
Oct-2_649 GCAGTCTGAGCACAACAGTTACTACCTTATCCTCAGCTGTGGGGACACTCCATCCCAGCC 1258
Oct-2_776 -----

Oct-2_002 GGACAGCAGGAGGGGGTGGCGGTGGGGGCGNANCCNCGCCCCCTCAATTCCATCCCCG 1252
Oct-2_678 GGACAGCAGGAGGGGGTGGCGGTGGGGGCGNANCCNCGCCCCCTCAATTCCATCCCCG 1135
Oct-2_651 GGACAGCAGGAGGGGGTGGCGGTGGGGGCGNANCCNCGCCCCCTCAATTCCATCCCCG 1318
Oct-2_655 -----
Oct-2_649 GGACAGCAGGAGGGGGTGGCGGTGGGGGCGNANCCNCGCCCCCTCAATTCCATCCCCG 1318
Oct-2_776 -----

Oct-2_002 TCACTCCCCACCCCGGCCACCACCAACAGCACAACCCGAGCCCTCAAGGCAGCCACT 1312
Oct-2_678 TCACTCCCCACCCCGGCCACCACCAACAGCACAACCCGAGCCCTCAAGGCAGCCACT 1195
Oct-2_651 TCACTCCCCACCCCGGCCACCACCAACAGCACAACCCGAGCCCTCAAGGCAGCCACT 1378
Oct-2_655 -----CACAACCCGAGCCCTCAAGGCAGCCACT 1179
Oct-2_649 TCACTCCCCACCCCGGCCACCACCAACAGCACAACCCGAGCCCTCAAGGCAGCCACT 1378
Oct-2_776 -----

Oct-2_002 CGGCTATCGGCTTGACGGGCTGAACCCAGCGCAGGAAGCACAATGGTGGGGTTGAGCT 1372
Oct-2_678 CGGCTATCGGCTTGACGGGCTGAACCCAGCGCAG----- 1231
Oct-2_651 CGGCTATCGGCTTGACGGGCTGAACCCAGCGCAGGAAGCACAATGGTGGGGTTGAGCT 1438
Oct-2_655 CGGCTATCGGCTTGA----- 1194
Oct-2_649 CGGCTATCGGCTTGACGGGCTGAACCCAGCGCAG----- 1414
Oct-2_776 -----

Oct-2_002 CGGGGCTGAGCCAGCCCTCATGGGAACAACCCCTTGGCCACTATCCAAGCCCTG--- 1428
Oct-2_678 -----GCCCTG--- 1237
Oct-2_651 CGGGGCTGAGCCAGCCCTCATGGGAACAACCCCTTGGCCACTATCCAAGGTGCGTGCT 1498
Oct-2_655 -----
Oct-2_649 -----
Oct-2_776 -----

Oct-2_002 GCCTCTGGTGGAAACCCCTG--CCCTTACCAGCCTTGATAGCAGCGGGAACCTGGTGTGG 1486
Oct-2_678 GCCTCTGGTGGAAACCCCTG--CCCTTACCAGCCTTGA----- 1272
Oct-2_651 GCCTCATGTACACCCATTGCCACCAGTCTGCTCT-----CCTGGGCTCG 1546
Oct-2_655 -----
Oct-2_649 -----GCCCTGGCTCT-----GGTGG----- 1431
Oct-2_776 -----

Oct-2_002 GGGCAGCCGGTGGGCCCCAGGGAGCCCCAGCTAGTAACCTCGCCTCTCTTCTTGAACC 1546
Oct-2_678 -----
Oct-2_651 AGGCCCCC-----CCCATGCTGCCCCAGCCATGCCATCCTGCC----- 1586
Oct-2_655 -----
Oct-2_649 -AACCCCTG-----CCCTT-----ACCAGCCTTGA----- 1455
Oct-2_776 -----

Oct-2_002 ACACCGGGCTGCCCTGCTCAGTGCACCCAGGCGTGGGTCTGGTCTCAGCAGCGGCTG 1606
Oct-2_678 -----
Oct-2_651 -----CTCCCGCTCACTGCATGCTCG-----CCTG--TTCATCACCATCTG 1626
Oct-2_655 -----
Oct-2_649 -----
Oct-2_776 -----

Oct-2_002 CAGCTGTGGCAGGACCATCTCCAGCAAGTCTCCTGGCCTCTCTCTCTGCTTTCATCCT 1666
Oct-2_678 -----
Oct-2_651 TCTTCGGGGAAGGTGTGA----- 1644
Oct-2_655 -----
Oct-2_649 -----

```

Figura 26 (cont)

RESULTADOS

```

Oct-2_776 -----
Oct-2_002 CCTCCTCCTCCTCCACTTGCAGTGAAGTGGCAGCGCAGACCTCTGGAGGCCCGGGGGAC 1726
Oct-2_678 -----
Oct-2_651 -----
Oct-2_655 -----
Oct-2_649 -----
Oct-2_776 -----

Oct-2_002 CCGAGGCAGGGTCCAAGGCCGAGTGA 1752                                % Homología respecto Oct-2_002
Oct-2_678 -----                                                                100
Oct-2_651 -----                                                                93,37
Oct-2_655 -----                                                                100
Oct-2_649 -----                                                                95,46
Oct-2_776 -----                                                                90,28

```

Figura 26. Alineamiento de las secuencias de ADNc de las isoformas de Oct-2 predichas por *Ensembl*, realizado con *ClustalW2*. Las secuencias subrayadas indican los sitios de unión de los *primers* diseñados para su detección mediante PCR convencional. Al final del alineamiento se indica el porcentaje de homología de cada transcrito respecto a la isoforma de referencia (Oct-2_002).

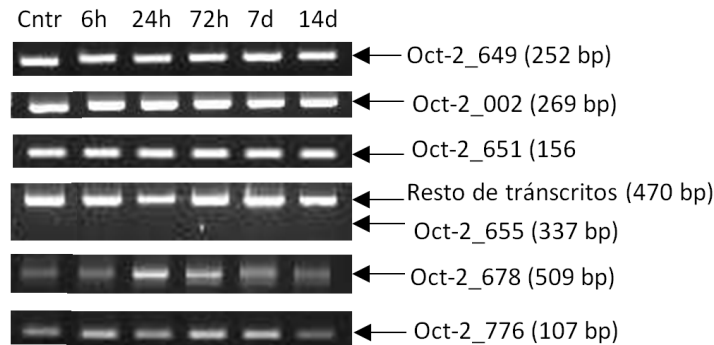


Figura 27. Identificación de las isoformas de Oct-2 expresadas en corteza cerebral de rata control y sometida a isquemia mediante su amplificación por PCR convencional. Cntr: muestra control; 6h: 6 horas post-pMCAO; 24h: 24 horas post-pMCAO; 72h: 72 horas post-pMCAO; 7d: 7 días post pMCAO; 14d: 14 días post-pMCAO; bp: tamaño de los fragmentos amplificados en pares de bases.

3.1.2 Análisis del perfil de expresión de Oct-2 en isquemia cerebral de rata: la expresión de

Oct-2 a nivel de ARNm y de proteína aumenta en la fase crónica de la isquemia

3.1.2.1. Perfil de expresión de Oct-2 a nivel de ARNm mediante qPCR

Las diferentes variantes transcripcionales identificadas por PCR convencional en condiciones control e isquémicas, fueron analizadas por PCR cuantitativa (qPCR) para estudiar su perfil de expresión a nivel de ARN mensajero en los diferentes tiempos después de la

isquemia. Se diseñaron ensayos TaqMan específicos para 4 de las 5 variantes de Oct-2 identificadas en cerebro de rata. Para la variante ENSRNOT00000068776 no fue posible diseñar dicho ensayo debido a su corta secuencia. Para la normalización se utilizaron los ensayos TaqMan específicos para los genes endógenos *Ywhaz* y *Sdha*.

Por un lado el análisis por qPCR reveló que la isoforma Oct-2_002 es el transcrito predominante en el presente estudio, mostrando los valores de CT más bajos (27-28) en las muestras analizadas (Figura 28).

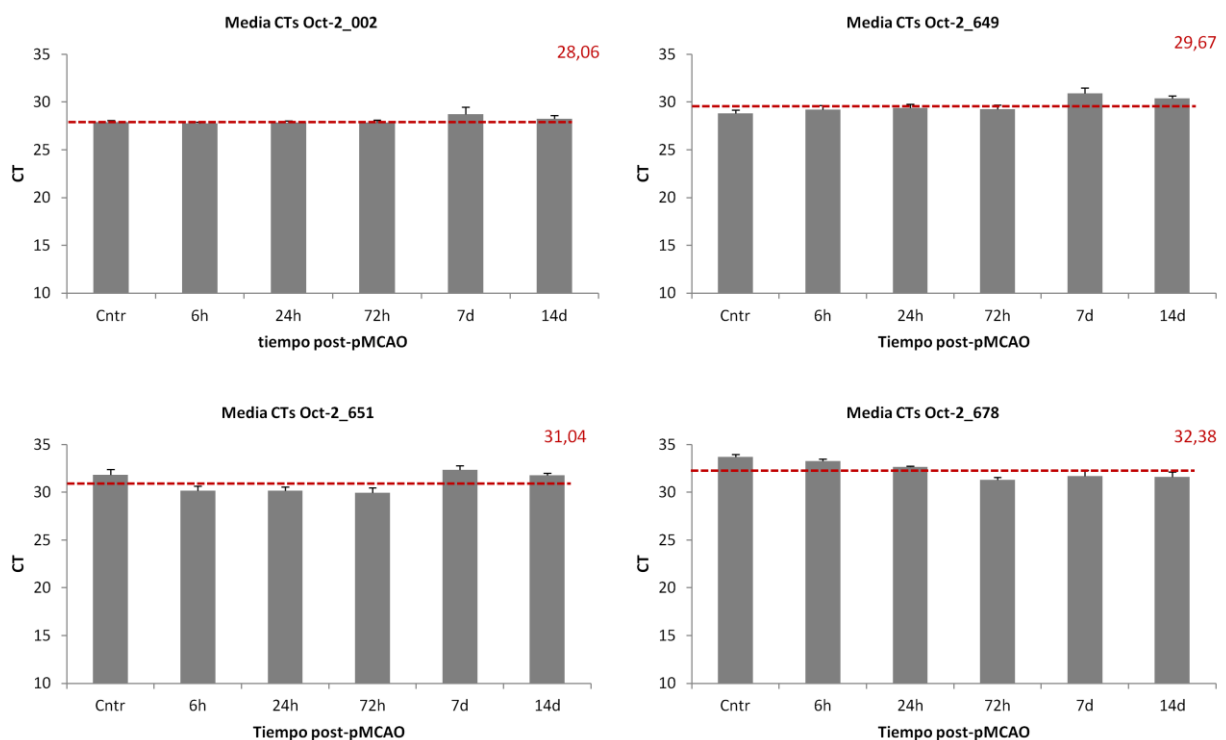


Figura 28. Media de los ciclos de amplificación (CT) de las diferentes isoformas obtenidos por qPCR en los diferentes tiempos después de la isquemia cerebral experimental (pMCAO). En rojo se indica el valor de la media global de CT's para cada isoforma.

Además, el estudio también mostró que la isquemia induce cambios en el perfil de expresión a nivel de ARNm de los distintos transcritos (Figura 29 A). Concretamente la expresión del transcrito Oct-2_002 se mantuvo en los niveles basales de las 6 hasta las 72 horas después de la pMCAO. A los 7 días, la expresión incrementó significativamente ($p < 0.001$)

a valores superiores al doble de la del control y posteriormente, a los 14 días disminuyó, manteniéndose aún por encima de la del control.

Por otro lado, la expresión de la variante Oct-2_649, se mantuvo baja en el control y durante la fase aguda de la isquemia (de las 6 a las 72 horas después de la pMCAO). A los 7 días, la expresión aumentó significativamente ($p < 0.01$) respecto al control y disminuyó ligeramente a los 14 días manteniendo una expresión superior a la del control.

Respecto a la variante Oct-2_651, esta mostró una disminución de la expresión desde las 6 a las 24 horas post isquemia, incrementando progresivamente a las 72 horas después de la pMCAO. A los 7 días llegó a su máxima expresión, siendo un 60% mayor que el control ($p < 0.05$).

Finalmente, el perfil de expresión del transcrito Oct-2_678, se caracterizó por un aumento progresivo de la expresión entre las 6 horas y los 7 días después de la isquemia, mostrando su máxima expresión en este último tiempo (15 veces mayor que el control). El análisis estadístico indicó que este incremento fue significativo a las 72 horas ($p < 0.001$), a los 7 días ($p < 0.001$) y a los 14 días ($p < 0.001$) después de la isquemia.

Así pues, el análisis de la expresión mediante qPCR puso de manifiesto que los transcritos de Oct-2 identificados mostraron distintos patrones de expresión en la isquemia cerebral pero con un aumento común de la expresión a nivel de ARNm a los 7 días después de la isquemia (Figura 29 A).

3.1.2.2. Perfil de expresión proteica de Oct-2 mediante WB

Los resultados obtenidos del perfil de expresión de Oct-2 a nivel de proteína en cerebro de rata sometida a isquemia, fueron los siguientes: la expresión proteica de Oct-2 (59 KDa) cuantificada con el anticuerpo sc-25400 por Western blot, mostró un aumento progresivo de Oct-2, especialmente de las 72 horas a los 14 días después de la isquemia ($p < 0.01$), respecto al

control. La isoforma Oct-2_002, con un peso molecular teórico de 59 KDa, fue el único transcrito detectado por Western blot con el anticuerpo sc-25400, debido a que representa el transcrito predominante (Figura 29 B).

El transcrito Oct-2_678 (44 KDa), mostró un incremento progresivo de la expresión de las 24 horas a los 14 días después de la pMCAO, siendo significativo a los 14 días ($p < 0.05$) y mostrando una expresión proteica más de diez veces superior respecto al control (Figura 29 C).

A partir de este análisis, concluimos que la isquemia induce un incremento de la expresión proteica de Oct-2 siendo máxima a los 14 días después de la pMCAO.

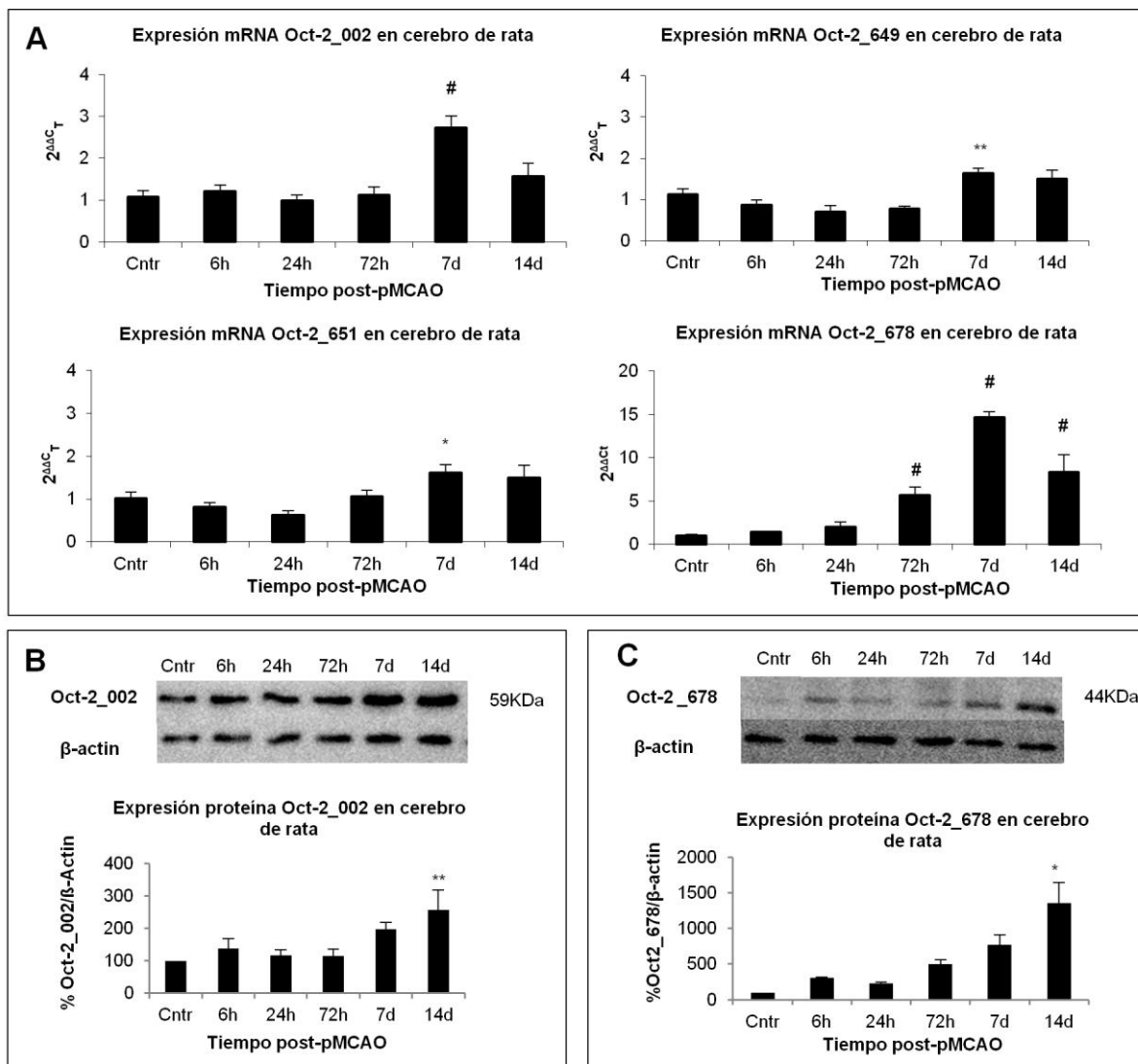


Figura 29. Análisis de la expresión génica a nivel de ARNm (A) y proteína (B-C) de las variantes transcripcionales de Oct-2 en corteza cerebral de rata en condiciones control y a diferentes tiempos después de la isquemia (pMCAO). La

RESULTADOS

cuantificación de la expresión a nivel de ARNm se realizó mediante qPCR y el método $2^{\Delta\Delta CT}$. *Ywhaz* y *Sdha* se utilizaron como genes endógenos para normalizar los resultados de la qPCR. El análisis a nivel de proteína se llevó a cabo por WB mediante el anticuerpo sc-25400 que detecta todas las isoformas y el anticuerpo sc-233, capaz de detectar específicamente la variante Oct-2_678 (análisis realizado mediante BLAST; apartado 2.1.3 de la sección IV). El análisis de la expresión proteica del resto de transcritos por separado no fue posible debido a que no hay anticuerpos específicos disponibles para cada uno. Los resultados del WB fueron normalizados con β -actina. Los transcritos de Oct-2 se han abreviado con los tres últimos números del código de *Ensembl*. (*= $p<0.05$; **= $p<0.01$; #= $p<0.001$).

3.1.3 Localización celular y subcelular de Oct-2 en corteza cerebral de rata: Oct-2 se expresa en células neuronales

Continuando con la caracterización de Oct-2 en cerebro de rata y en condiciones de isquemia cerebral, analizamos la expresión y localización celular de Oct-2 en corteza cerebral control e isquémica mediante inmunofluorescencia. Los resultados obtenidos mostraron que la expresión de Oct-2 está localizada en las células NeuN positivas (es decir, en neuronas) en ambas condiciones (control e isquémicas) (Figura 30), mostrando una expresión ligeramente mayor en la isquemia. La expresión de Oct-2 se localizó tanto a nivel nuclear (colocalizando con la tinción DAPI) como en el citoplasma, en ambas condiciones, incrementando sutilmente en el núcleo en las neuronas de la zona del límite del infarto (izquierda de la imagen de pMCAO).

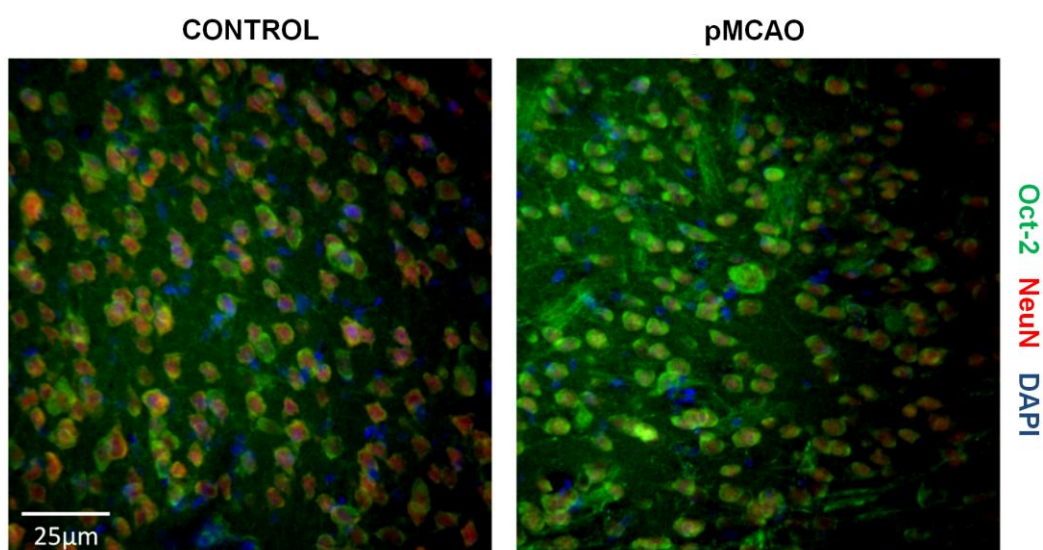


Figura 30. El factor de transcripción Oct-2 se expresa en células neuronales de corteza cerebral de rata en condiciones control e isquémicas. El estudio de localización de Oct-2 se realizó en cortes corticales de cerebro de

rata control y sometida a pMCAO (24h), mediante inmunofluorescencia y utilizando los anticuerpos correspondientes contra: Oct-2 (verde), el marcador celular NeuN (rojo) y el marcador nuclear DAPI (azul).

3.1.4 Identificación de los dominios proteicos de las isoformas de Oct-2 mediante análisis bibliográfico

Los resultados obtenidos en el análisis bibliográfico se han recogido en la Figura 31. Estos resultados muestran que la proteína Oct-2 comprende un dominio de transactivación N-terminal, caracterizado por un dominio de unión a ADN bipartido^{193,194}, y un dominio de transactivación C-terminal (CTD), indispensable para las funciones de Oct-2 *in vivo*¹⁹⁵. Además, también contiene, según la isoforma, un dominio de regulación negativo (NRD) el cual ejercerá un efecto negativo sobre el dominio de activación N-terminal, afectando también al dominio C-terminal y provocando un impacto general sobre el potencial de transactivación de la proteína^{196,197}.

Respecto al motivo de unión a ADN (necesario para realizar la función de FT), se ha visto que contiene dos subdominios (bipartido): el específico POU y el homeo POU. Si comparamos las secuencias proteicas de las isoformas observamos que todos los transcritos analizados presentan el motivo completo de unión a ADN, con la excepción de la variante Oct-2_776, el cual sólo contiene la estructura mínima para unirse a su secuencia diana (los subdominios específicos POU y homeo). Además este transcrito, tampoco presenta ningún dominio de transactivación.

Dentro del dominio CTD se ha observado la presencia de nueve aminoácidos críticos para la función del mismo, los cuales dictan la actividad transcripcional activadora (señalados en rojo en la Figura 30).

Por lo tanto, según estudios previos, la inclusión (Oct-2_678, Oct-2_649) o exclusión (Oct-2_002, Oct-2_651) del CTD entero (que contiene los nueve aminoácidos esenciales) y la

RESULTADOS

presencia del NRD (Oct-2_649) en las secuencias proteicas de las isoformas de Oct-2, determina la función transcripcional y el potencial de transactivación de la proteína ¹⁹⁴.



Figura 31. Identificación de los principales dominios proteicos de las isoformas de Oct-2 presentes en cerebro de rata. En el alineamiento de sus secuencias se han marcado: el dominio regulador negativo (NRD) está señalado en verde, los nueve aminoácidos esenciales C-terminales en rojo, el dominio de transactivación N-terminal con una línea de puntos naranja, El dominio de transactivación C-terminal con una línea discontinua azul y el dominio de

RESULTADOS

unión a ADN (bipartido: el subdominio específico POU y el subdominio homeo POU) en morado. Los nombres de los transcritos se han abreviado con los últimos números del código de *Ensembl*.

3.1.5 Análisis de la expresión proteica de Oct-2 en RN expuestas a POG mediante WB: la expresión de Oct-2 aumenta a las 24 horas post-POG

Se realizó el análisis de la expresión proteica de Oct-2 mediante WB en cultivos primarios de neuronas corticales de rata sometidos a un protocolo de POG subletal, con el fin de comparar los resultados con los obtenidos en corteza cerebral de rata mediante inmunofluorescencia. Los resultados de este estudio, mostraron que 6 horas después de la POG, la expresión de Oct-2 en cultivo de neuronas disminuye un 40% respecto al control ($p < 0,05$). Mientras que a las 24 horas después de la isquemia experimental, la expresión proteica de Oct-2 aumenta un 50% respecto su control ($p < 0,05$) (Figura 32).

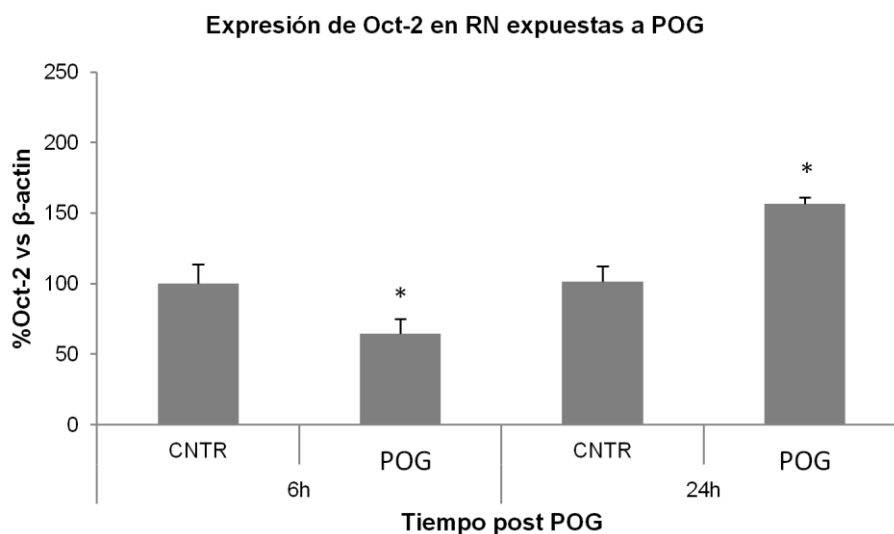


Figura 32. Análisis de la expresión proteica de Oct-2 en cultivo primario de neuronas corticales de rata (RN) a diferentes tiempos después de ser sometidas a POG. Los resultados se normalizaron con β -actina. *= $p < 0.05$.

3.1.6 Análisis del perfil de interacciones de Oct-2 en corteza cerebral de rata: la isquemia induce cambios en las interacciones de Oct-2 con otros FTs.

Con el fin de estudiar en qué vías de señalización está implicado Oct-2, analizamos el perfil de interacciones de Oct-2 en cortes de corteza cerebral de rata mediante un array de interacciones FT-FT. Los resultados del experimento mostraron que la proteína Oct-2 en condiciones control interacciona con diferentes FTs incluyendo: ERE, MEF, ETS, MYC-MAX, OCT-1, NFκB, RXR(DR1), SIE, Smad SBE and VDR(DR3). También se observaron interacciones con otros FTs como NF-E1, NF-E2, STAT4, USF-1, HSE y RAR(DR5), sin embargo éstas se observaron con menor intensidad, lo que significa que son interacciones débiles (Figura 33 B). No obstante, las interacciones de Oct-2 con otros FTs, previamente mencionados, cambiaron en condiciones de isquemia (tMCAO), comparado con las muestras de tejido control. Por un lado las interacciones con ETS, MEF, NF-E2, NF-E1, RAR(DR5), RXR(DR1), SIE, Smad SBE, STAT4, USF-1 and HSE desaparecieron. Por el contrario, en condiciones de tMCAO se observaron nuevas interacciones con NF-1 y SER, a pesar de que se detectaron como interacciones débiles (Figura 33 C). Las diferentes interacciones de Oct-2 con otros FTs mostradas en los paneles control e isquémico, están resumidas en la Figura 33 D. El nombre completo de los FTs que interaccionan con Oct-2 se muestra en la Tabla 24.

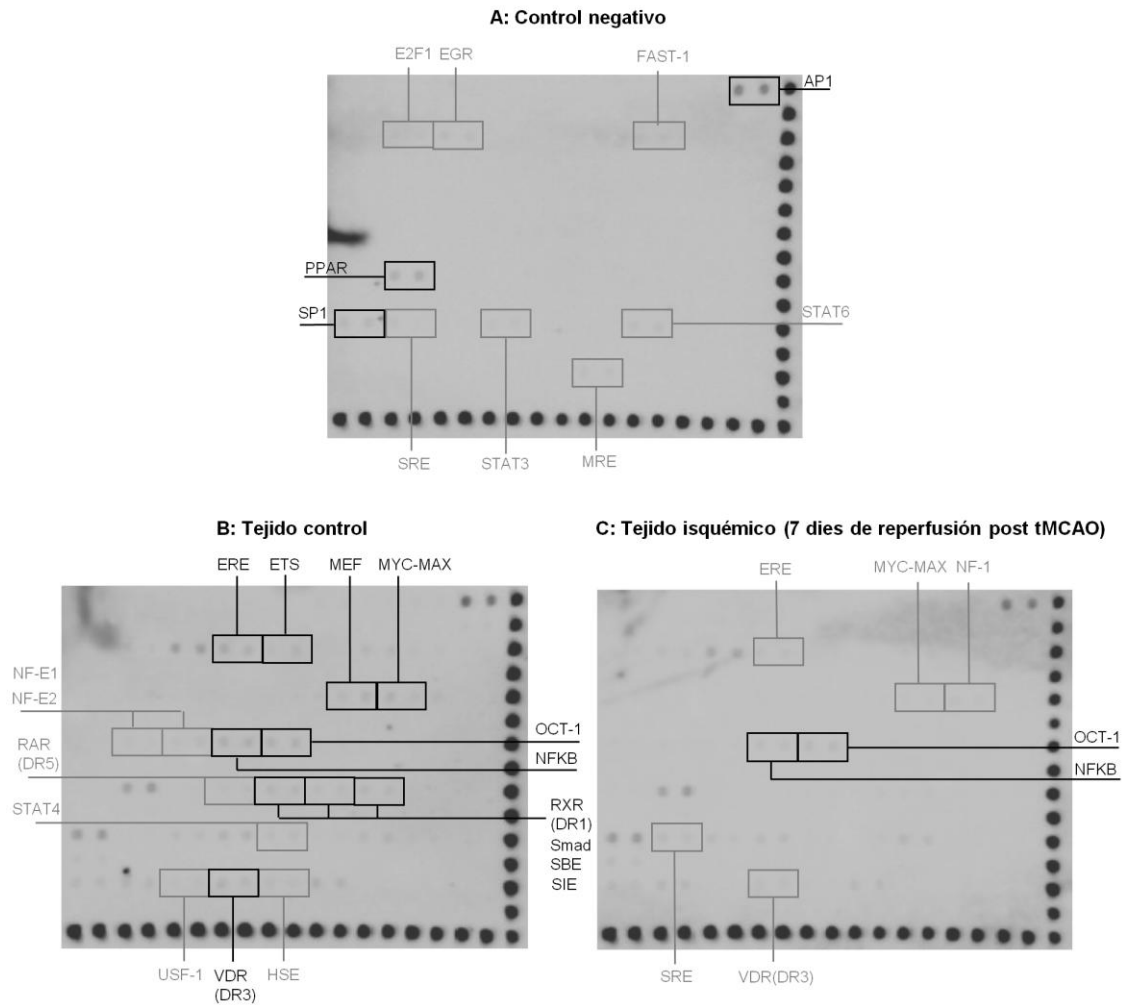


Figura 33. Patrón de interacciones de Oct-2 con otros factores de transcripción en condiciones control (B: control) y de isquemia experimental (C: tejido isquémico a 7 días de reperusión después de tMCAO, núcleo ipsilesional), mediante el kit TransSignal TF-TF Array versión I. Las interacciones fuertes están indicadas en negro, las débiles, en gris. Los FTs observados en el control negativo (A) (muestra inmunoprecipitada con el anticuerpo normal IgG, el cual no tiene ningún antígeno como diana), corresponden a interacciones inespecíficas.

Tabla 24. Abreviatura y nombre completo de los FTs que interactúan con Oct-2 tanto en condiciones control como en condiciones de isquemia experimental.

Interacciones de Oct-2 con otros FTs	
Abreviatura FT	Nombre FT
ERE	Elemento de respuesta al estrógeno
MEF	Factor potenciador de la transcripción <i>mads box</i>
ETS	Oncogen 1 homólogo al virus E26 de la eritroblastosis aviar v-ets
MYC-MAX	Oncogen myc y factor X asociado a myc
OCT-1	Factor de transcripción octamer-1
NFκB	Factor nuclear kappa beta
RXR(DR1)	Receptor retinoide X
SIE	Elemento inducible cis
Smad SBE	Elemento de unión a Smad
VDR(DR3)	Receptor de vitamina D
NF-E1	Factor nuclear eritroide 1
NF-E2	Factor nuclear eritroide 2
STAT4	Transductor de la señal y activador de la transcripción 4
USF-1	Factor estimulador <i>upstream1</i>
HSE	Epimerasa 3-alfa-hidroxiesteroide
RAR(DR5)	Receptor retinoide A
NF-1	Neurofibromin
SRE	Serum response element

3.1.6.1 Análisis bibliográfico de la función de los FTs que interactúan con Oct-2

Los resultados obtenidos en el análisis bibliográfico se han recogido en la Tabla 25. Estos resultados muestran que Oct-2 interactúa con FTs involucrados en diferentes vías de señalización relacionadas con: angiogénesis y desarrollo vascular (a través de ETS, del inglés *V-ets avian erythroblastosis virus E26 oncogene homolog*)^{198,199}; supervivencia de nuevas neuronas diferenciadas y desarrollo cardiovascular (a través de MEF, del inglés *mads box transcription enhancer factor*)²⁰⁰⁻²⁰²; muerte neuronal y respuesta inflamatoria (NFκB, del

RESULTADOS

inglés *nuclear factor kappa-B*)^{203,204}; proliferación, diferenciación y apoptosis celular (a través de MYC-MAX, del inglés *oncogene MYC and MYC-associated factor X*)^{205,206} y con procesos de crecimiento, diferenciación, desarrollo y homeostasis (mediante ERE, del inglés *estrogen responsive element* y RXR(DR1), del inglés *Retinoid X receptor*)^{127,207-209}.

Tabla 25. Resultados del análisis bibliográfico de la función de los FTs que interactúan con Oct-2

FT	PROCESO	CITA
ETS	Desarrollo vascular	Sato, 2001; Lelievre, 2001
MEF	Supervivencia de nuevas neuronas diferenciadas y el desarrollo cardiovascular	Agarwal, 2011; Ikeshima, 1995; Naya, 1999
NFκB	Muerte neuronal y respuesta inflamatoria	Crack and Taylor 2005; Qin, 1998
MYC-MAX	Proliferación, diferenciación y apoptosis	Chen, 1995; Tencheva and Panov 2008
ERE, RXR(DR1)	Crecimiento, diferenciación, desarrollo y homeostasis	Collino, 2008; Giaginis, 2011; Lee and Mouradian 1999; Mathisen 2011

3.2 Caracterización del factor de transcripción HMGIY

3.2.1 Análisis del perfil de expresión en isquemia cerebral: la expresión de HMGIY a nivel de ARNm y proteína aumenta tras la isquemia en corteza cerebral de rata

Empezamos la caracterización del FT HMGIY analizando el perfil de expresión temporal del FT a nivel de ARNm y proteína en corteza cerebral de rata, en condiciones control y de isquemia experimental.

3.2.1.1 Perfil de expresión de HMGIY a nivel de ARNm mediante qPCR

La cuantificación de la expresión a nivel de ARNm se realizó mediante qPCR y ensayos TaqMan específicos. Los controles endógenos utilizados para la normalización de los resultados fueron *Ywhaz*, *Sdha* y *Hprt* (de acuerdo con¹⁷³). Los resultados obtenidos revelaron que entre las 6 y las 24 horas después de la isquemia, el transcrito HMGIY presentaba un

aumento significativo de la expresión del ARNm en la corteza cerebral de rata sometida a pMCAO, respecto al grupo control ($p > 50\%$; $p < 0.05$). (Figura 34 A).

3.2.1.2 Perfil de expresión de HMGIY a nivel de proteína mediante WB

Por otro lado, se analizó la expresión proteica de HMGIY mediante WB y el anticuerpo específico ab4078. Se detectó una banda de 60 KDa observándose un incremento progresivo de la expresión de la proteína desde las 6 horas ($p < 0,05$) hasta los 14 días ($p < 0,001$), mostrando un pico de expresión (aproximadamente 5 veces mayor respecto al control) a las 72 horas después de la isquemia. En todos los tiempos analizados después de la pMCAO, la expresión de HMGIY en las muestras isquémicas, fue superior a la de las muestras control (Figura 34 B).

Estos experimentos permitieron obtener el perfil de expresión del FT HMGIY después de la isquemia experimental, a nivel de ARNm y proteína de HMGIY, en los tiempos analizados en el presente estudio.

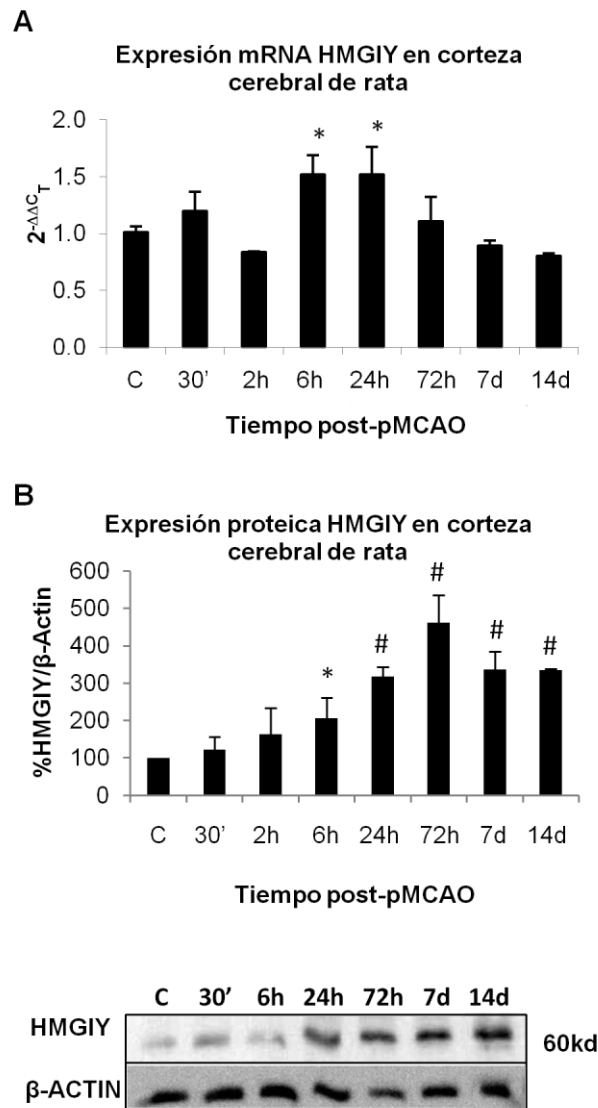


Figura 34. Análisis de la expresión génica de HMGIY, mediante qPCR (A) y Western blot (B) en muestras de cerebro de rata control y sometida a isquemia. *Ywhaz*, *Sdha* y *Hprt* se utilizaron como genes de referencia en la qPCR. Los resultados de WB fueron normalizados con β-actina. *p<0.05, **p<0.01, #p<0.001.

3.2.2 Localización celular y subcelular de HMGIY en corteza cerebral de rata: HMGIY se expresa en células neuronales y endoteliales de la corteza cerebral de rata

Con el fin de continuar la caracterización del FT HMGIY en cerebro de rata control y sometida a isquemia, determinamos la localización celular del FT en rodajas de corteza cerebral de rata mediante inmunofluorescencia. Los resultados de este análisis mostraron que la proteína HMGIY se expresa principalmente en células NeuN (Figura 35 A) y RECA-1 positivas (Figura 35 C), tanto en condiciones control como en condiciones de isquemia (pMCAO), siendo

mayor la expresión en condiciones de isquemia. Por el contrario, no se observó expresión de la proteína HMGIY en células GFAP positivas ni en condiciones control ni en isquemia. Estos resultados indican que este FT se expresa en neuronas y en células endoteliales, pero no se expresa en astrocitos en cerebro de rata, en las condiciones estudiadas en el presente trabajo.

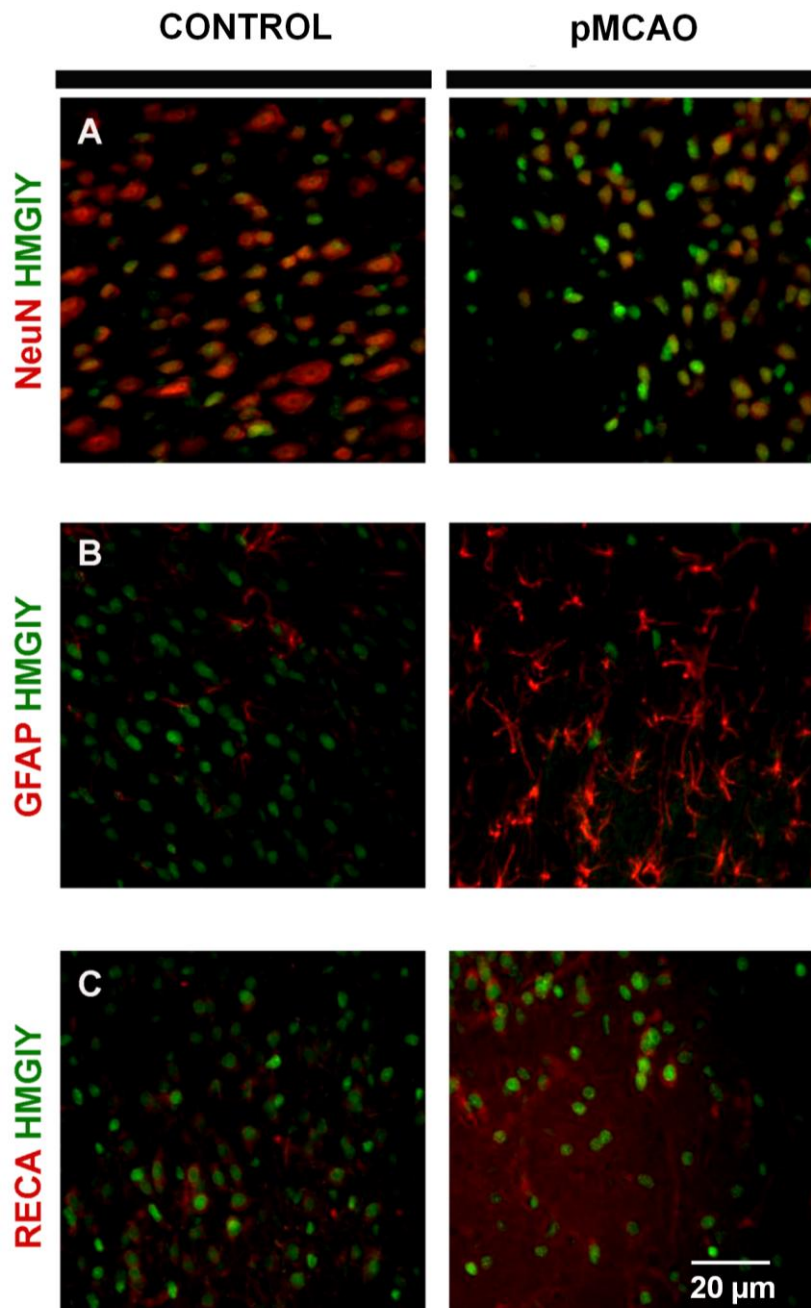
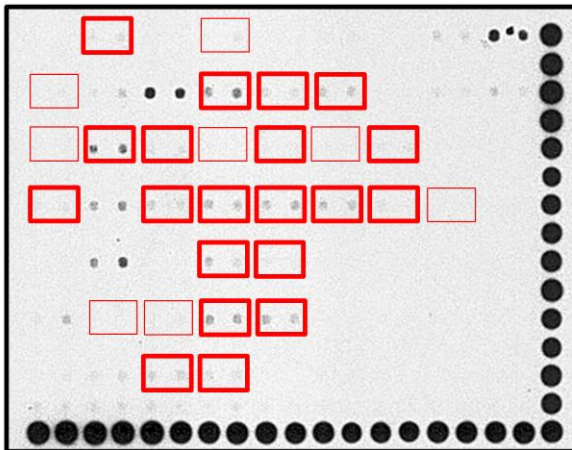


Figura 35. El factor de transcripción HMGIY se expresa en células neuronales y endoteliales en corteza cerebral de rata control e isquémica. El estudio de localización de HMGIY se realizó en cortes corticales de cerebro de rata control y sometida a pMCAO (24h), mediante inmunofluorescencia y utilizando los anticuerpos correspondientes contra HMGIY (verde) y contra el marcador de tipo celular: neuronal (A: NeuN; rojo), astrocitario (B: GFAP; rojo) y endotelial (C: RECA-1; rojo).

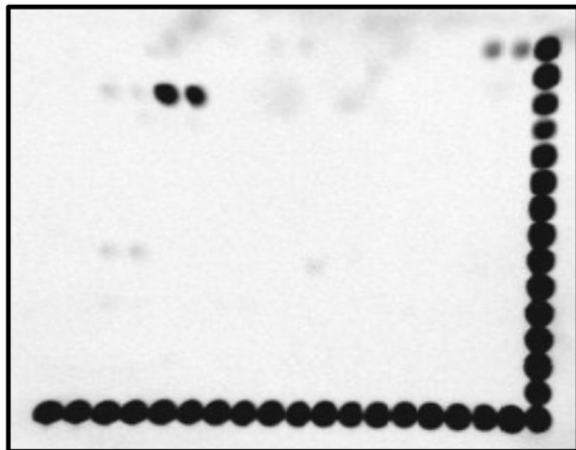
3.2.3 Perfil de interacciones de HMGIY en corteza cerebral de rata: la isquemia induce cambios en las interacciones de HMGIY con otros FTs

Con el fin de determinar las vías de señalización en las que está involucrado HMGIY y por lo tanto estudiar su rol potencial en cerebro, focalizamos el presente estudio en el análisis de las interacciones de este FT con otros FTs, en extractos nucleares de corteza cerebral de rata control y sometida a isquemia (tMCAO). Los resultados del array de interacciones mostraron que a las 6 horas después de la isquemia (Figura 36 panel A), el número de interacciones de HMGIY con otros FT se incrementa comparado con las interacciones observadas en condiciones control (Figura 36 panel C). A los 14 días post-isquemia el número de interacciones vuelve a disminuir (Figura 36 panel B). Concretamente, en condiciones control se observó que HMGIY interacciona con FTs como AP-1, EGR y NF-1. A las 6 horas post-tMCAO, se mantuvieron las interacciones previamente mencionadas, y se observaron nuevas interacciones con diferentes FTs incluyendo AP-2, ETS, ERE, GRE, Myc-Max, MEF-1, HNF-4, Pax-5, p53, Oct-1, NFκB, NF-E2, NFATC, RXR(DR1), RXR(DR5), STAT3, STAT4, VDR(DR3), USF-1. Además, también se observaron nuevas interacciones con FTs como Brn-3, CREB, GATA, IRF-1, MEF-2, Pbx, SRE, STAT1, a pesar de que fueron detectadas como interacciones débiles. Por otro lado, a los 14 días después de la isquemia, la red de interacciones del FT HMGIY cambió, interaccionando, en este caso, con FTs como AP-1, EGR, E2F1 and SER.

A) 6 hours of reperfusion after tMCAO



B) 14 days of reperfusion after tMCAO



A') New TF interactions at 6 hours

<u>AP-2</u>	Brn-3
CREB	<u>ERE</u> <u>ETS</u> <u>ETS1/PEA3</u>
GATA	<u>GRE</u> <u>HNF-4</u> IRF-1 <u>MEF-1</u> MEF-2 <u>Myc-Max</u>
<u>NFATC</u>	<u>NF-E2</u> <u>NFkB</u> <u>Oct-1</u> <u>p53</u> <u>Pax5</u> Pbx1
	<u>RAR (DRβ)</u> <u>RXR (DR1)</u>
SRE	STAT1 <u>STAT3</u> <u>STAT4</u>
	<u>USF-1</u> <u>VDR(DR3)</u>

C) Healthy control

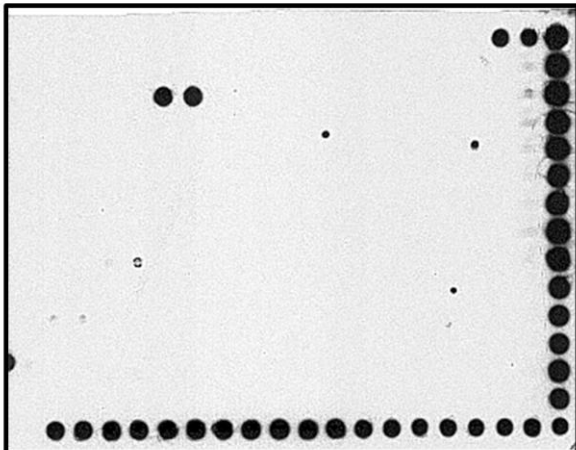


Figura 36. Comparación del patrón de interacción de HMGIY con otros FTs entre muestras de extractos nucleares de cerebro de rata control (panel C) y sometido a isquemia (6 horas y 14 días de reperusión después de la tMCAO, paneles A y B, respectivamente). En el panel A', se muestran los nombres de las interacciones que sólo se observan a las 6 horas después de la isquemia (interacciones nuevas, marcadas en rojo en el panel A), entre las cuales, las interacciones fuertes están señaladas en negrita y subrayadas, mientras que el resto son interacciones débiles.

3.2.3.1 Análisis bibliográfico de la función de los FTs que interactúan con HMGIY

Las interacciones nuevas de HMGIY con otros FTs observadas en condiciones de isquemia (a las 6 horas post-isquemia) su función específica y las referencias correspondientes, se muestran en la Tabla 26. Teniendo en cuenta los resultados del presente análisis podemos concluir que la isquemia induce cambios en las vías de señalización de HMGIY, promoviendo diferencias en su perfil de interacción con otros FTs, entre las diferentes condiciones analizadas.

Tabla 26. Nuevas interacciones de HMGIY con otros FTs, en corteza cerebral de rata sometida a isquemia (6 horas post-isquemia), respecto al control.

FUNCIÓN	FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN		REFERENCIA
Estimulación, adhesión, proliferación, apoptosis y diferenciación de las células endoteliales	ETS	Oncogen 1 homólogo al virus E26 de la eritroblastosis aviar v-ets	<i>Mattot V et al 2000</i>
	USF-1	Factor estimulador <i>upstream1</i>	<i>Olave NC et al 2010</i>
	MYC-MAX	Oncogen myc y factor X asociado a myc	<i>Shichiri M et al 1999</i>
	HNF	Factor nuclear hepatocitario	<i>Osanai M et al 2002, Pierreux Ch et al 2010</i>
	CREB	Proteína de unión al elemento de respuesta a cAMP	<i>Zhao D et al 2011, Zhong Y et al 2012</i>
	MEF2	Factor potenciador de la transcripción mads box 2	<i>Olson EN et al 2004, Chang S et al 2006, Maiti D et al 2008</i>
	GATA	Proteína de unión GATA	<i>Kamei CN et al 2011, Nizamutdinva et al 2012</i>
	PBX	Factor de transcripción de células de leucemia Pre-B	<i>Charboneau A et al 2005</i>
	P53	Proteína tumoral p53	<i>Zhao QT et al 2004</i>
	OCT1	Factor de transcripción octamer-1; dominio POU, clase 2, factor de transcripción 1	<i>Lacal PM et al 2009</i>
	NFATC	Factor nuclear de células T activas, citoplasmático, dependiente de calcineurina	<i>Suehiro J et al 2010, Jang GH et al 2010</i>
STAT1, 3, 4	Transductor de la señal y activador de la transcripción 1, 3, 4	<i>Nielsen SR et al 2013, Goettsch C et al 2012</i>	
ERE	Elemento de respuesta a estrógeno	<i>Buteau-Luzano H et al 2002, Applanat MP et al 2008</i>	
NFκB	Factor nuclear kappa-B	<i>Stone KR et al 2011</i>	
Promoción del proceso angiogénico	ETS	Oncogen 1 homólogo al virus E26 de la eritroblastosis aviar v-ets	<i>Valter MM et al 1999</i>
	MEF2	Factor potenciador de la transcripción mads box 2	<i>Liu G et al 2009</i>
	STAT3	Transductor de la señal y activador de la transcripción 3	<i>Doucette TA et al 2012, Jackson C et al 2012</i>
	NFATC	Factor nuclear de células T activas, citoplasmático, dependiente de calcineurina	<i>Urso K et al 2011</i>
Regulación de factores solubles	ETS	Oncogen 1 homólogo al virus E26 de la eritroblastosis aviar v-ets	<i>Gilles et al 1996</i>
	AP2	Proteína de unión al enhancer activador 2	<i>Huang YW et al 2009</i>
	STAT3	Transductor de la señal y activar de la transcripción 3	<i>Shigekawa M et al 2011</i>
Regulación de genes de expresión temprana	ETS	Oncogen 1 homólogo al virus E26 de la eritroblastosis aviar v-ets	<i>Roskoski R et al 2012, Demir O et al 2012</i>
	IRF1	Factor regulador de interferón	<i>Wang YF et al 1996, Yu-Lee et al 1990</i>
	USF-1	Factor estimulador <i>upstream1</i>	<i>White LA et al 2000</i>
Regulación de receptores de superficie celular	CREB	Proteína de unión al elemento de respuesta a cAMP	<i>Sandoval S et al 2009</i>

4 Estudios funcionales *in vitro* de los factores de transcripción

Una vez realizada la caracterización de los FTs seleccionados en la presente tesis (Oct-2 y HMG1Y) en corteza cerebral de rata en condiciones control e isquémicas, procedimos al análisis de su rol potencial, mediante diferentes estudios funcionales. Estos consistieron principalmente en estudios de silenciamiento génico *in vitro*, para evaluar los efectos provocados por las diferencias en la expresión de los FTS objeto de estudio.

4.1 Silenciamiento de Oct-2 en RN mediante siRNAs: la disminución de Oct-2 *in vitro* promueve la citotoxicidad y daño neuronal

Para continuar estudiando la función de Oct-2 en cerebro, realizamos estudios de silenciamiento génico (*knockdown*) en cultivos primarios de neuronas corticales de rata en condiciones control, con el objetivo de analizar su rol potencial en la supervivencia y el daño neuronal. Se trataron las neuronas corticales de rata con un *pool* de siRNAs contra Oct-2 que reconoce todas las variantes transcripcionales de Oct-2, consiguiéndose una disminución del 30% y el 20% de la expresión proteica a los 4 y 5 días post-transfección, respectivamente, siendo significativa al cuarto día ($p < 0.01$) (Figura 37 A). Esta reducción de la expresión proteica se correlacionó con un incremento significativo de la liberación de LDH del cultivo neuronal tratado con siRNA_Oct-2 (grupo de estudio) de los 4 a los 6 días ($p < 0.05$) post-transfección, comparado con el grupo tratado con non-target siRNA (grupo control) (Figura 37 B). Este experimento demostró que en condiciones control, una disminución en la expresión de Oct-2 igual o menor al 30% en células neuronales en cultivo, se correlaciona con un incremento de la toxicidad neuronal y del daño celular, comparado con las células neuronales con una expresión de Oct-2 inalterada.

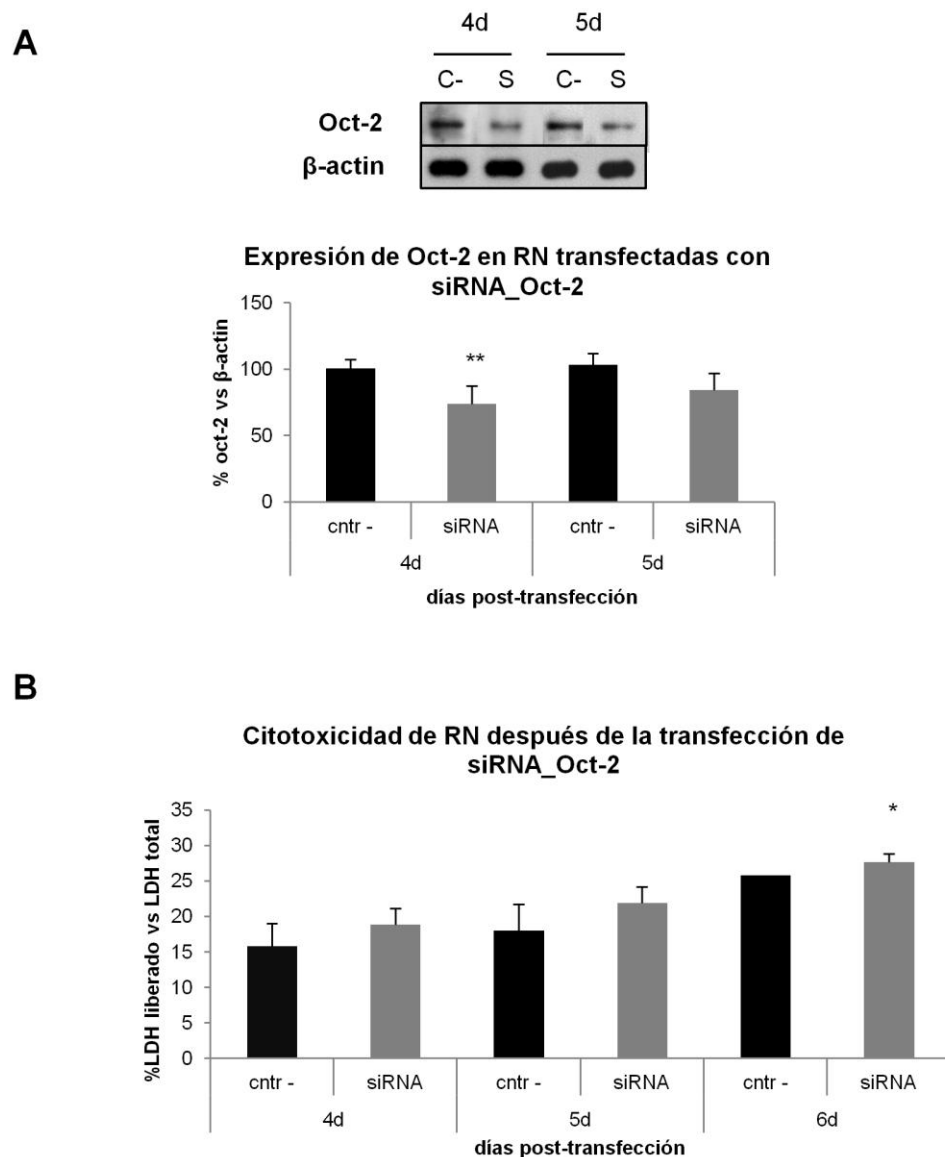


Figura 37. Resultados del silenciamiento de la expresión del FT Oct-2 en cultivo primario de neuronas corticales de rata, mediante la transfección de un *pool* de siRNAs contra Oct-2. La disminución de la expresión proteica de Oct-2 se analizó por WB utilizando el anticuerpo sc-25400. El cultivo neuronal transfectado con el siRNA mostró una reducción de la expresión de Oct-2 del 30% a los 4 días post-transfección ($p < 0,01$) (A). Esta reducción se correlacionó con un aumento significativo de la liberación de LDH del cultivo, de los 4 a los 6 días después de la transfección (B). Los resultados del análisis proteico se normalizaron con β -actina. La citotoxicidad se expresó en función del porcentaje del valor máximo de LDH y se representaron en comparación con el grupo control negativo. *= $p < 0.05$; **= $p < 0.01$; #= $p < 0.001$.

4.2 Silenciamiento de HMGIIY mediante transfección de siRNAs en RBMVEC

Para estudiar la función del FT HMGIIY *in vitro*, concretamente para confirmar su papel en la regulación de procesos angiogénicos (como indicaron los resultados del análisis

bioinformático) silenciamos la expresión del gen HMGIY mediante la transfección de un *pool* de siRNAs en células de microvasculatura cerebral de rata (RBMVEC) en condiciones control.

4.2.1 Optimización de la transfección de siRNA en RBMVEC

Debido a que las condiciones de transfección de siRNA en las RBMVEC no están establecidas, en la presente tesis analizamos y pusimos a punto la transfección con el fin de poder realizar los estudios funcionales del FT HMGIY. Para optimizar la transfección de siRNAs, fue necesario determinar el reactivo de transfección adecuado y su dosis, así como la concentración de siRNA a transfectar, de acuerdo con el modelo experimental utilizado. Se evaluó la eficiencia de transfección de los distintos reactivos de transfección a distintas dosis (apartado 6.1.2.1 de la sección IV) y la toxicidad promovida por estos en las RBMVEC mediante la transfección del *TOX transfection control* (un siRNA tóxico que promueve la muerte celular, una vez transfectado correctamente) y el posterior análisis de la viabilidad celular (ensayo MTT). Para el análisis de la eficiencia de transfección se compararon los grupos transfectados con el siRNA tóxico juntamente con los diferentes reactivos de transfección (grupo siRNA_TOX+DF1/2/3/4). En cambio para el análisis de la toxicidad celular, se analizaron los grupos tratados sólo con los diferentes reactivos de transfección (grupo DF1/2/3/4). En el análisis de la eficiencia de transfección, observamos que con el reactivo DharmaFECT 4 se conseguía una mayor eficiencia comparado con el resto de reactivos, especialmente a la concentración del 0,45% y 0,75% (52,93% y 20,18%, respectivamente) (Figura 38 A). Respecto al estudio de citotoxicidad en RBMVEC en cultivo, se observó que los reactivos DharmaFECT 3 y DharmaFECT 4 mostraron los menores valores de citotoxicidad (3,67%, 30,55%, 61,57% y 6,69%, 29,35%, 62,97%, respectivamente) respecto al resto de reactivos testados a diferentes concentraciones. Valorando y teniendo en cuenta los resultados de ambos experimentos (estudios de citotoxicidad y de la eficiencia de transfección), seleccionamos el reactivo DharmaFECT 4 a la concentración del 0,15% como la condición óptima para la transfección de siRNAs en las RBMVEC, porque promueve una baja citotoxicidad en el cultivo, y a la vez, permite

RESULTADOS

una alta eficiencia de transfección del siRNA en comparación con el resto de reactivos de transfección testados a diferentes dosis. (Figura 38 B).

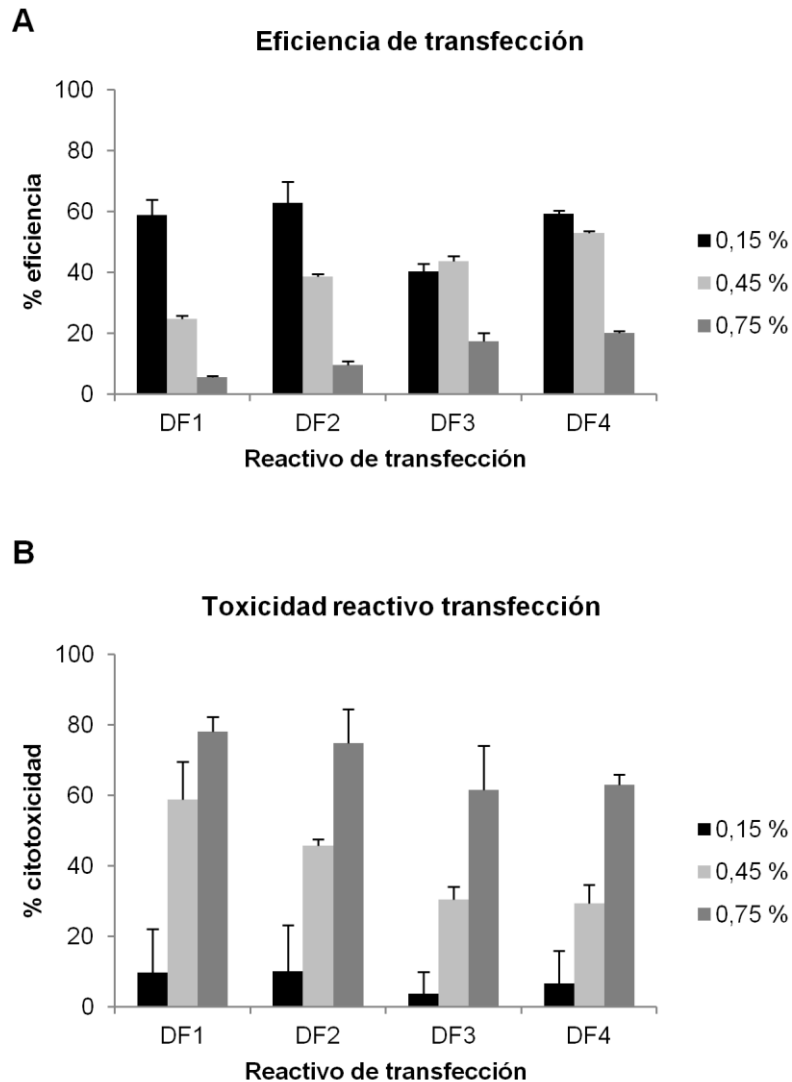


Figura 38. Evaluación de la eficiencia de transfección (A) y la toxicidad (B) de diferentes reactivos de transfección (DF1, 2, 3 y 4: DharmaFECT 1, 2, 3 y 4) utilizados a distintas concentraciones (al 0,15%, al 0,45%, 0,75%) en las RBMVEC en cultivo. La eficiencia de transfección y la citotoxicidad de los diferentes reactivos testados se evaluó mediante la transfección de *TOX* *transfection control* y el posterior ensayo de viabilidad (MTT).

Una vez seleccionados el reactivo de transfección y la dosis óptimos para la transfección en RBMVEC, procedimos a estudiar la concentración óptima de siRNA a transfectar. Por este motivo, realizamos dos experimentos complementarios. Por un lado, comparamos la entrada

de diferentes dosis de siRNA en las RBMVEC monitorizando la localización de un indicador de la transfección verde (siGLO). Por otro lado, transfectamos distintas concentraciones (20, 35 y 50nM) de un siRNA contra el gen endógeno Ciclofilina B (siRNA_PpiB), que actuaba como control positivo para comprobar la eficiencia de silenciamiento y la viabilidad de las RBMVEC tras transfectar las distintas dosis de siRNA. En ambos estudios (experimento con siGLO y con siRNA_PpiB) utilizamos las condiciones de transfección previamente optimizadas.

La monitorización del indicador de transfección verde, mostró que hay co-localización entre las células siGLO-positivas (verde) y las células DAPI-positivas (azul), en las diferentes dosis de siRNA utilizadas (Figura 39), indicando que las condiciones de transfección utilizadas han permitido la entrada del siRNA en el núcleo de las células endoteliales. Además, también se observó una localización citoplasmática del indicador de transfección verde.

Por otro lado, los resultados de la transfección del siRNA_PpiB mostraron valores de viabilidad similares entre las distintas condiciones testadas (153%, 168%, 170%, y 162% a 10, 20, 35 y 50 nM, respectivamente; $p>0.05$), indicando que no existen diferencias en la citotoxicidad celular de las RBMVEC transfectadas con las distintas dosis de siRNA. Además, todas las dosis de siRNA testadas promovieron la inhibición de la expresión del gen Ciclofilina B (Figura 40) (0,33%, 0,23%, 0,24% y 0,24% a 10, 20, 35 y 50 nM, respectivamente), no observándose diferencias entre ellas ($p>0,05$).

Por lo tanto, los resultados de ambos estudios indican que todas las dosis de siRNA estudiadas entran eficientemente en las RBMVEC transfectadas (co-localización del indicador verde siGLO y el DAPI) y ejercen el mismo efecto inhibitorio (todas pueden inhibir el gen endógeno PpiB) y citotóxico (no existen diferencias en la viabilidad celular entre las dosis de siRNA estudiadas) en las RBMVEC en cultivo. Por este motivo, se seleccionó la menor dosis (10 nM) como la concentración óptima de siRNA a transfectar, ya que esta dosis permite, a la vez, optimizar los recursos económicos del experimento.

RESULTADOS

Tras optimizar la transfección de siRNAs en las RBMVEC mediante los estudios previamente comentados, las condiciones de transfección óptimas fueron utilizar 10 nM de siRNA y el 0,15% de reactivo de transfección DharmaFECT 4. Mediante estas condiciones se obtuvo un silenciamiento del 70-75% del gen endógeno Ciclofilina B (control positivo), tras la transfección del siRNA-PpiB en las RBMVEC.

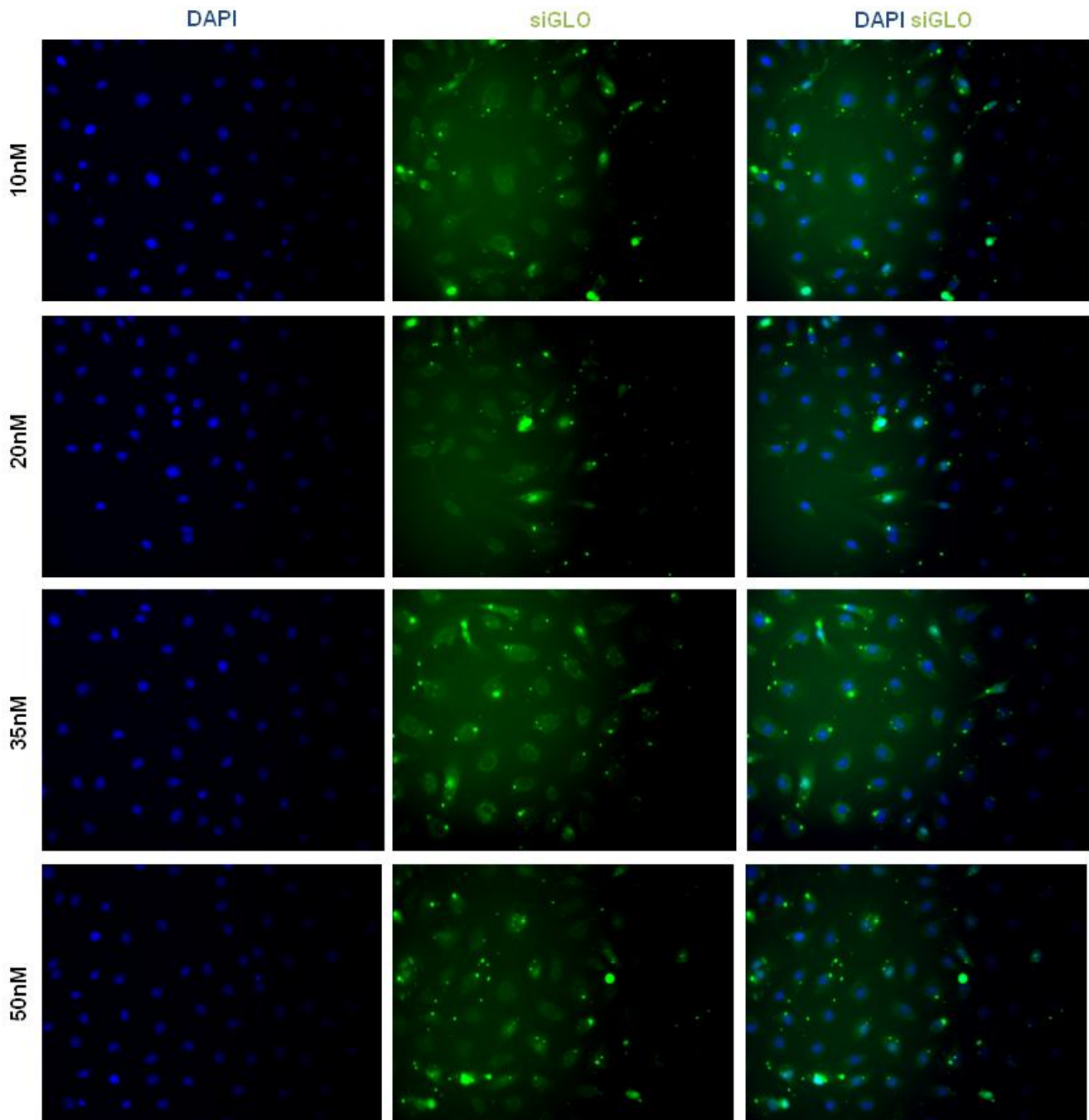


Figura 39. Determinación de la dosis de siRNA óptima a transfectar en las RBMVEC, mediante la monitorización por inmunofluorescencia de la co-localización de células DAPI-positivas (azul) y siGLO-positivas (indicador de transfección verde) en células fijadas. Las dosis de siRNA evaluadas fueron 10, 20, 35 y 50 nM.

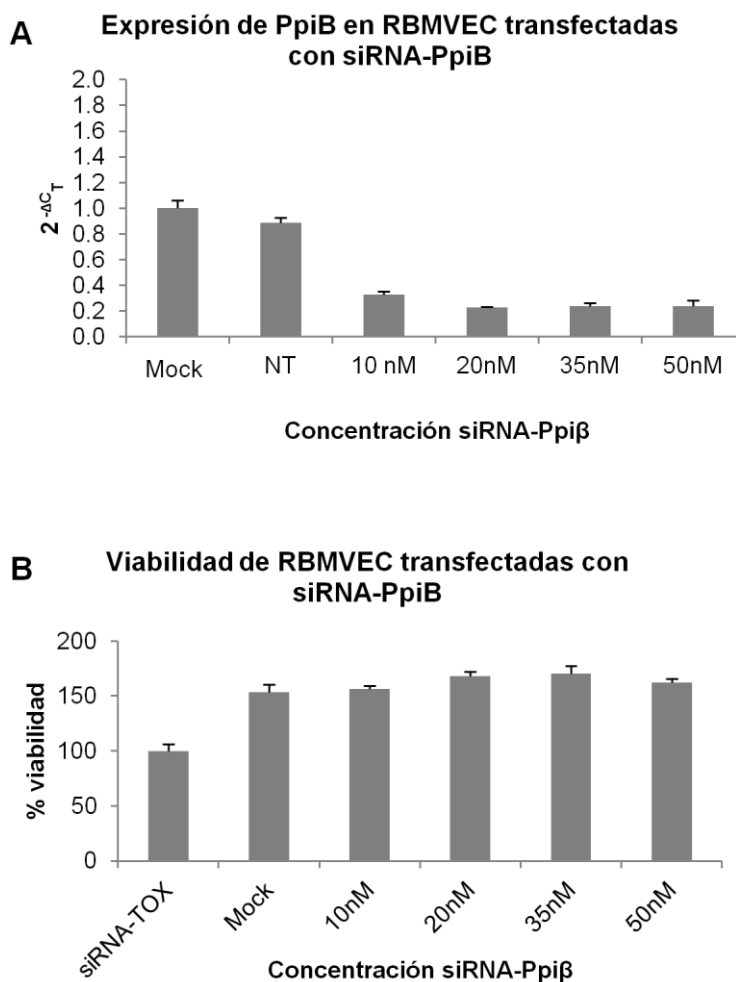


Figura 40. Determinación de la dosis de siRNA óptima a transfectar en RBMVEC, mediante la transfección de distintas concentraciones de siRNA (10, 20, 35 y 50 nM) contra el gen endógeno Ciclofilina B (Ppiβ) y el posterior análisis de su expresión génica mediante qPCR (A) y el método $-2^{\Delta CT}$ y de la viabilidad celular mediante el ensayo MTT (B). siRNA-TOX: TOX transfection control, Mock: reactivo de transfección sólo (sin siRNA), NT: células no tratadas.

4.2.2 Identificación de genes diana de HMG1Y: la inhibición de la expresión de HMG1Y

reduce la expresión de ANGPT-1 y VEGF

Para estudiar el rol de HMG1Y en angiogénesis tratamos las RBMVEC con un *pool* de cuatro siRNAs contra HMG1Y (siRNA_HMG1Y). Los resultados del silenciamiento génico mostraron una reducción significativa ($p < 0,001$) del 30% de la expresión proteica de HMG1Y a los 5 días después de la transfección. Esta reducción de la expresión proteica de HMG1Y promovió una disminución de la expresión de los genes ANGPT-1 y VEGF a los 5 días post-

transfección. Respecto a ANGPT-1, se observó una disminución significativa a nivel de ARNm (disminución del 25% respecto al control; $p < 0.05$) y de proteína (disminución del 50% respecto al control; $p < 0.001$), respectivamente. Por otro lado, la expresión de VEGF también disminuyó a nivel de ARNm (27%) y a nivel proteico (40%), siendo significativo en ambos casos ($p < 0.05$ y $p < 0.01$, respectivamente) (Figura 41). Por lo tanto, estos datos revelan que ANGPT-1 y VEGF son dianas del FT HMGIY y confirman los resultados del análisis bioinformático (apartado 2.1.2 de esta sección).

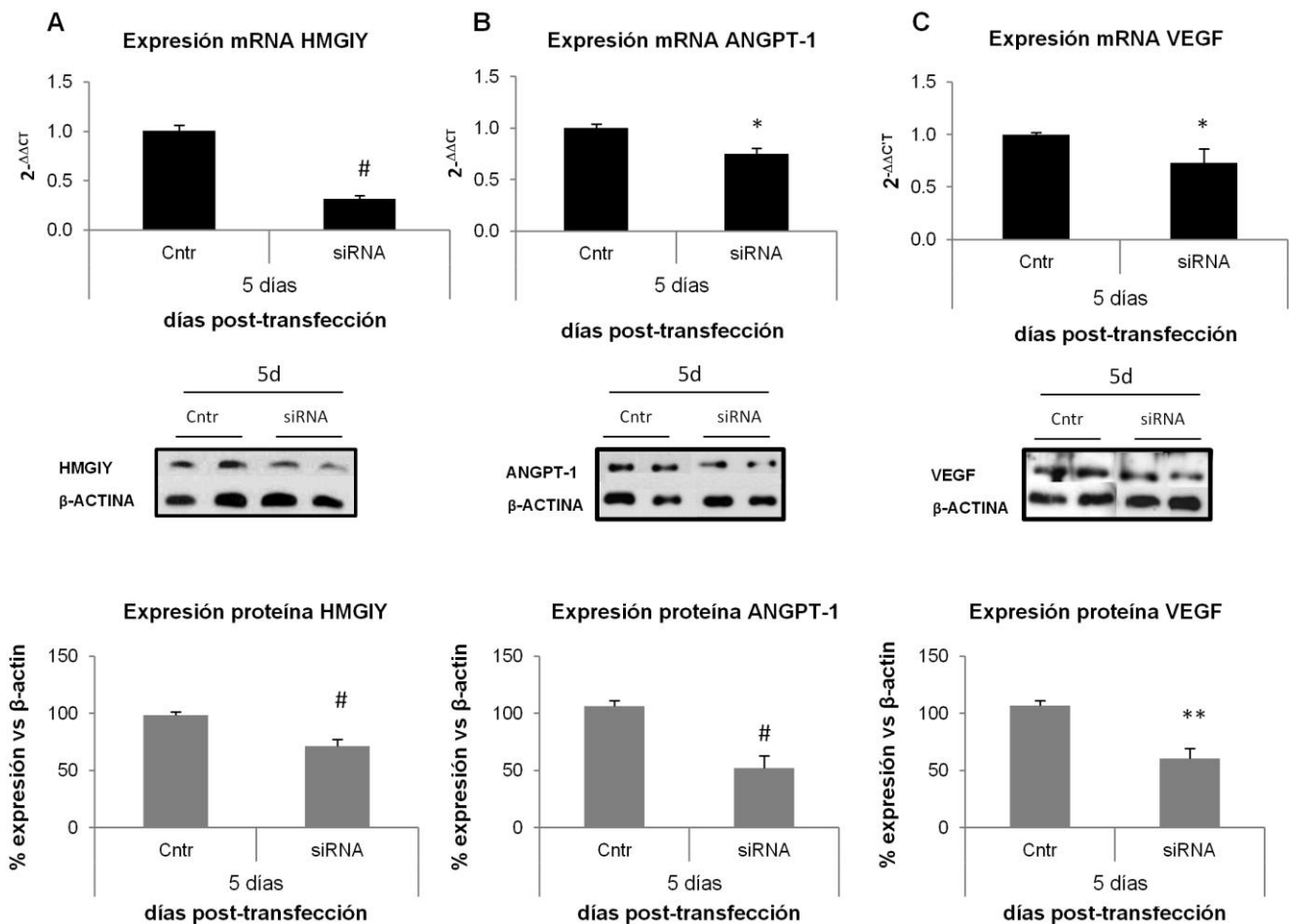


Figura 41. Resultados del análisis de la expresión génica de HMGIY (A), ANGPT-1 (B) y VEGF(C) en las RBMVEC transfectadas con siRNAs contra HMGIY. El estudio se realizó a nivel de ARNm mediante qPCR y a nivel de proteína mediante Western blot, a los 5 días después de la transfección. Los genes *Ywhaz* y *Saha* se utilizaron como genes endógenos para la normalización de la qPCR y la β-actina para Western blot. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, # $p < 0.001$.

4.2.3 La inhibición de la expresión de HMGIY disminuye la viabilidad celular de las RBMVEC

Para evaluar la implicación de HMGIY en procesos angiogénicos se llevaron a cabo ensayos de viabilidad, migración e invasión en las RBMVEC transfectadas con siRNA_HMGIY. Los resultados de estos estudios mostraron que no existen diferencias significativas entre las RBMVEC con una expresión de HMGIY disminuida (42% y 30% de expresión; Figura 42 B' y C', respectivamente) (células tratadas con siRNA contra HMGIY) respecto el grupo de RBMVEC control en los ensayos de migración e invasión (Figuras 42 B y C, respectivamente). Por otro lado se observó que la disminución de la expresión de HMGIY en las RBMVEC (35% de expresión) se correlaciona con una disminución significativa de la proliferación celular (viabilidad) cinco días post-transfección (81,64% de viabilidad vs el control; $p < 0,001$) (Figura 42 A).

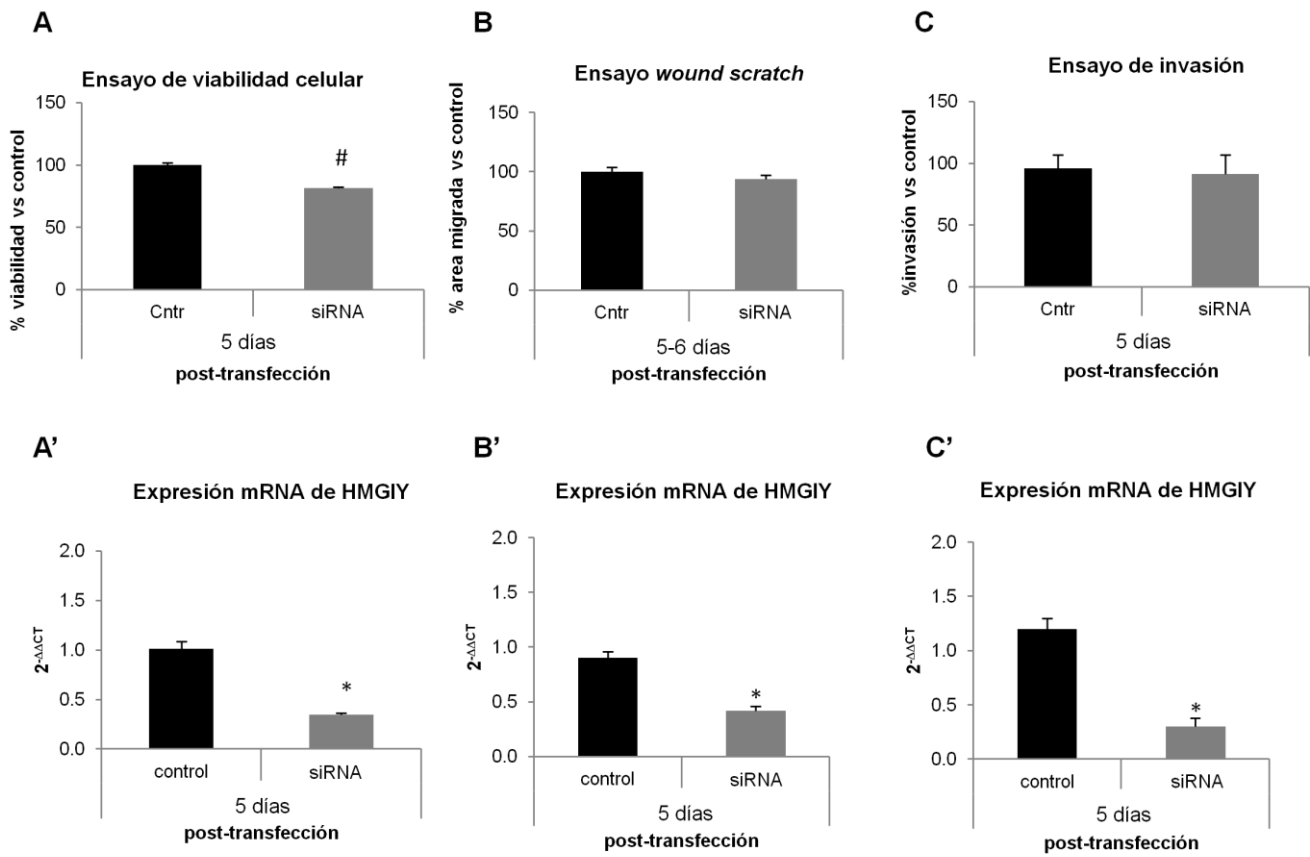


Figura 42. Resultados de la evaluación de la expresión de HMG1Y y del análisis de su función angiogénica *in vitro* en las RBMVEC. La viabilidad celular se estudió mediante MTT (A), la migración celular mediante el ensayo *wound scratch* (B), y la capacidad invasiva mediante el ensayo *BD BioCoat™ Angiogenesis System: Endothelial Cell Invasion* (C), 5 días después de la transfección del siRNA contra HMG1Y en RBMVEC en cultivo. La expresión de HMG1Y se analizó en los tres casos (A', B', C') con la técnica de qPCR. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, # $p < 0.001$.

ORIGINAL PAPER

Oct-2 Transcription Factor Binding Activity and Expression Up-Regulation in Rat Cerebral Ischaemia is Associated with a Diminution of Neuronal Damage In Vitro

Susanna Camo's · Carme Gubern · Mónica Sobrado · Rocío Rodríguez · Víctor G. Romera · María Ángeles Moro · Ignacio Lizasoain · Joaquín Serena · Judith Mallolas · Mar Castellanos

Received: 1 August 2013 / Accepted: 20 November 2013
© Springer Science+Business Media New York 2013

Abstract Brain plasticity provides a mechanism to compensate for lesions produced as a result of stroke. The present study aims to identify new transcription factors (TFs) following focal cerebral ischaemia in rat as potential therapeutic targets. A transient focal cerebral ischaemia model was used for TF-binding activity and TF–TF interaction profile analysis. A permanent focal cerebral ischaemia model was used for the transcript gene analysis and for the protein study. The identification of TF variants, mRNA analysis, and protein study was performed using conventional polymerase chain reaction (PCR), qPCR, and Western blot and immunofluorescence, respectively. Rat

cortical neurons were transfected with small interfering RNA against the TF in order to study its role. The TF-binding analysis revealed a differential binding activity of the octamer family in ischaemic brain in comparison with the control brain samples both in acute and late phases. In this study, we focused on Oct-2 TF. Five of the six putative Oct-2 transcript variants are expressed in both control and ischaemic rat brain, showing a significant increase in the late phase of ischaemia. Oct-2 protein showed neuronal localisation both in control and ischaemic rat brain cortical slices. Functional studies revealed that Oct-2 interacts with TFs involved in important brain processes (neuronal and vascular development) and basic cellular functions and that Oct-2 knockdown promotes neuronal injury. The present study shows that Oct-2 expression and binding activity increase in the late phase of cerebral ischaemia and finds Oct-2 to be involved in reducing ischaemic-mediated neuronal injury.

Senior authors: Judith Mallolas and Mar Castellanos. Corresponding author: Judith Mallolas.

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s12017-013-8279-1) contains supplementary material, which is available to authorized users.

S. Camo's · C. Gubern · R. Rodríguez · J. Serena · J. Mallolas (✉) · M. Castellanos
Servei de Neurologia, Institut d'Investigació Biomèdica de Girona (IdIBGi), Hospital Universitari de Girona Dr. Josep Trueta, Av. França s/n, 17007 Girona, Spain
e-mail: judithmallolas@cofgi.org

M. Castellanos
e-mail: mcastellanos.girona.ics@gencat.cat

M. Sobrado · V. G. Romera · M. A. Moro · I. Lizasoain
Departamento de Farmacología, Facultad de Medicina, Universidad Complutense de Madrid (UCM), Ciudad Universitaria, s/n, 28040 Madrid, Spain

Present Address:
M. Sobrado
Servicio de Neurología, Instituto de Investigación Sanitaria, Hospital Universitario La Princesa, C/Diego de León, 62, 28006 Madrid, Spain

Keywords Oct-2 · Transcription factor · Cerebral ischaemia · Transcript variant · Expression profile · siRNA

Introduction

Ischaemic stroke occurs when the blood supply to the brain is obstructed. Currently, tissue plasminogen activator (t-PA) is the only approved treatment for ischaemic stroke. Unfortunately, t-PA has a limited time window for therapeutic use, and only 3–5 % of stroke patients arriving at the hospital qualify for the treatment (Fisher et al., 2009). Thus, there is a strong need to identify new targets and understand the molecular mechanisms associated with ischaemic stroke so that other treatment approaches can be pursued.

It has previously been demonstrated that distinct patterns of gene expression are seen in tissues from rat and non-human primate ischaemic (MCAO) stroke models (Xu et al., 2005; Ford et al., 2006; Rodriguez-Mercado et al., 2012). Microarray analyses from previous studies have shown that many classes of genes are activated following ischaemia, but inflammation and cell death are primary gene categories that appear to be associated with ischaemic stroke model (Pulliam et al., 2013). Moreover, cerebral ischaemia also promotes the up-regulation of genes that aim to remodel cerebral connections and cause structural and functional changes in all affected structures, including genes involved in brain plasticity processes (Nadareishvili and Hallenbeck 2003; Chopp et al., 2007, 2008). In turn, all these genes can be regulated by transcription factors (TFs) that bind to regulatory elements in their promoters to induce or suppress gene expression (Pulliam et al., 2013). Some examples of these TFs are NF- κ B, Hes, HIF-1, STAT3, AP-1, CREB, Sox2, Pax6, Tcf/Lef, Gli, Olig2, Dlx2, TLX, and Bmi-1, which have all been reported to induce neurogenesis following cerebral ischaemia (Zhang et al., 2011). In the case of HIF-1, this TF has also been found to trigger cell survival mechanisms (Singh et al., 2012) and CREB has been found to play a critical role in synaptic plasticity and neuronal survival after ischaemia (Kitagawa et al., 2012). Previous authors have highlighted the importance of studying TFs due to the role they play in preventing damage in cerebral ischaemia (Baranova et al., 2007; Li et al., 2013). These molecules do not act as unique and direct regulators of gene expression, but most TFs will dimerise or contribute to large multimeric structures involved in RNA transcription (Raivich 2011). Although these factors are involved in plasticity processes, they do not share a common temporal expression profile after cerebral ischaemia. However, it is interesting to note the particular biphasic expression profile of HIF-1 TF, which functions as a pro-apoptotic and as a tissue repair and pro-survival factor, in the acute phase (from 1 to 12 h) and late phase (from 2 to 8 days) of ischaemia, respectively (Baranova et al., 2007; Singh et al., 2012).

The analysis of transcriptional regulators can be useful to understand how large sets of genes can be controlled by a small set of upstream signalling molecules. Moreover, the knowledge of genes and their transcriptional regulators that participate in giving the brain the potential to compensate for ischaemic lesions (plasticity mechanisms) may provide novel substrates for brain repair and are essential in the development of optimal stroke therapeutic strategies (Zhang et al., 2012).

In the present study, with the aim of better understanding brain plasticity mechanisms and of identifying new activated TFs involved in cerebral ischaemic response, a multiplex assay was performed. This assay revealed

important differences in the binding activity of the Octamer TF family.

Octamer-binding proteins (Oct) are a family of five cloned and characterised TFs (Oct-1, Oct-2, Oct-3/4, Oct-6, and Oct-11) that recognise the octamer motif (5'-ATGCA AAT-3'). All members belong to the Pit-Oct-Unc (POU) family of TFs, characterised to contain a POU domain (with a bipartite structure: specific and homeo-subdomain) that mediates the ADN binding of these factors, allowing them to modulate the activity of specific genes with a critical role in normal development (Kristie and Sharp 1990). In this family, we focused on Oct-2 TF, given the structural and functional complexity of the different transcript variants described (Wirth et al., 1991; Lillycrop and Latchman 1992; Annweiler et al., 1994). Oct-2 was initially identified in B lymphocytes (Singh et al., 1986; Staudt et al., 1988) but has been found to be widely expressed throughout the central nervous system during rat embryonic development. Its expression was restricted to the brain in adult rats (He et al., 1989). Specifically, the Oct-2 TF has been reported to be expressed in neuronal cells in the mammalian developing nervous system (He et al., 1989) and in rat and mouse neuronal cell lines (Kemp et al., 1990; Dent et al., 1991; Lillycrop and Latchman 1992; Lillycrop et al., 1994; Deans et al., 1995; Liu et al., 1995) in control conditions. Neuronal Oct-2 differs from Oct-2 in B cells with respect to both sequence specificity and gene activation ability (Dent et al., 1991). Oct-2 is comprised of an N-terminal transactivation domain, the characteristic bipartite ADN-binding domain (Latchman 1996a, b), and a C-terminal transactivation domain (CTD), indispensable for *in vivo* Oct-2 function (Corcoran et al., 2004).

The present study aimed to characterise the Oct-2 TF following focal cerebral ischaemia in rat by (1) searching for the predicted transcript variants of the selected TF and checking their expression in control and ischaemic rat brain, (2) quantifying their temporal pattern expression at mRNA and protein levels, (3) determining the TF cellular localisation in neurons in rat cortex, (4) investigating in which signalling pathways the TF is involved, and, finally, (5) testing whether or not the selected TF is involved in neuronal damage and toxicity.

Results

Ischaemia Modified the Octamer-Binding Activity

We performed an initial screening to identify newly activated TFs involved in cerebral ischaemic response with an overall beneficial role, as potential therapeutic targets. The specific TF-binding activity comparisons between each transient ischaemic brain sample (ipsilesional core,

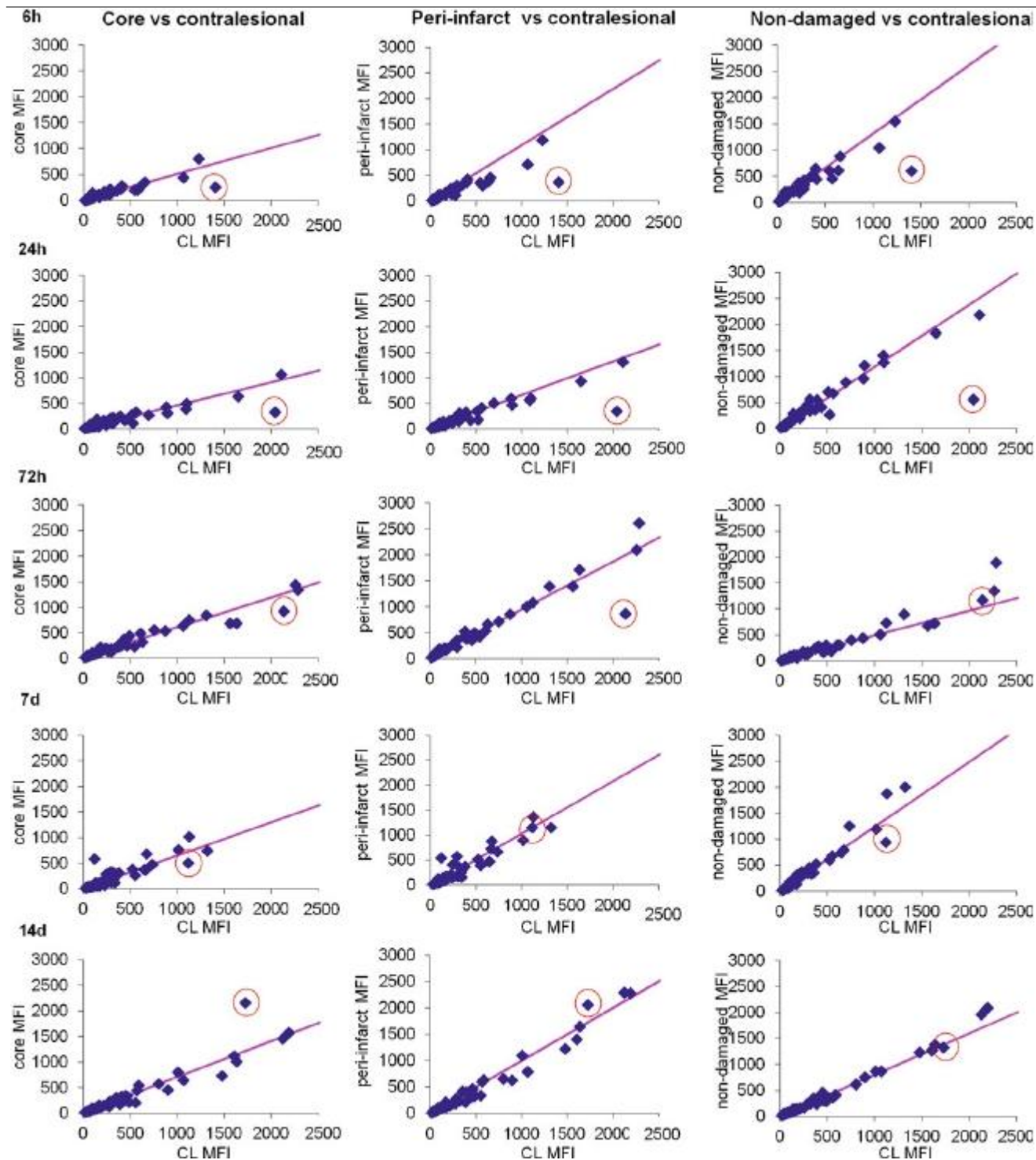


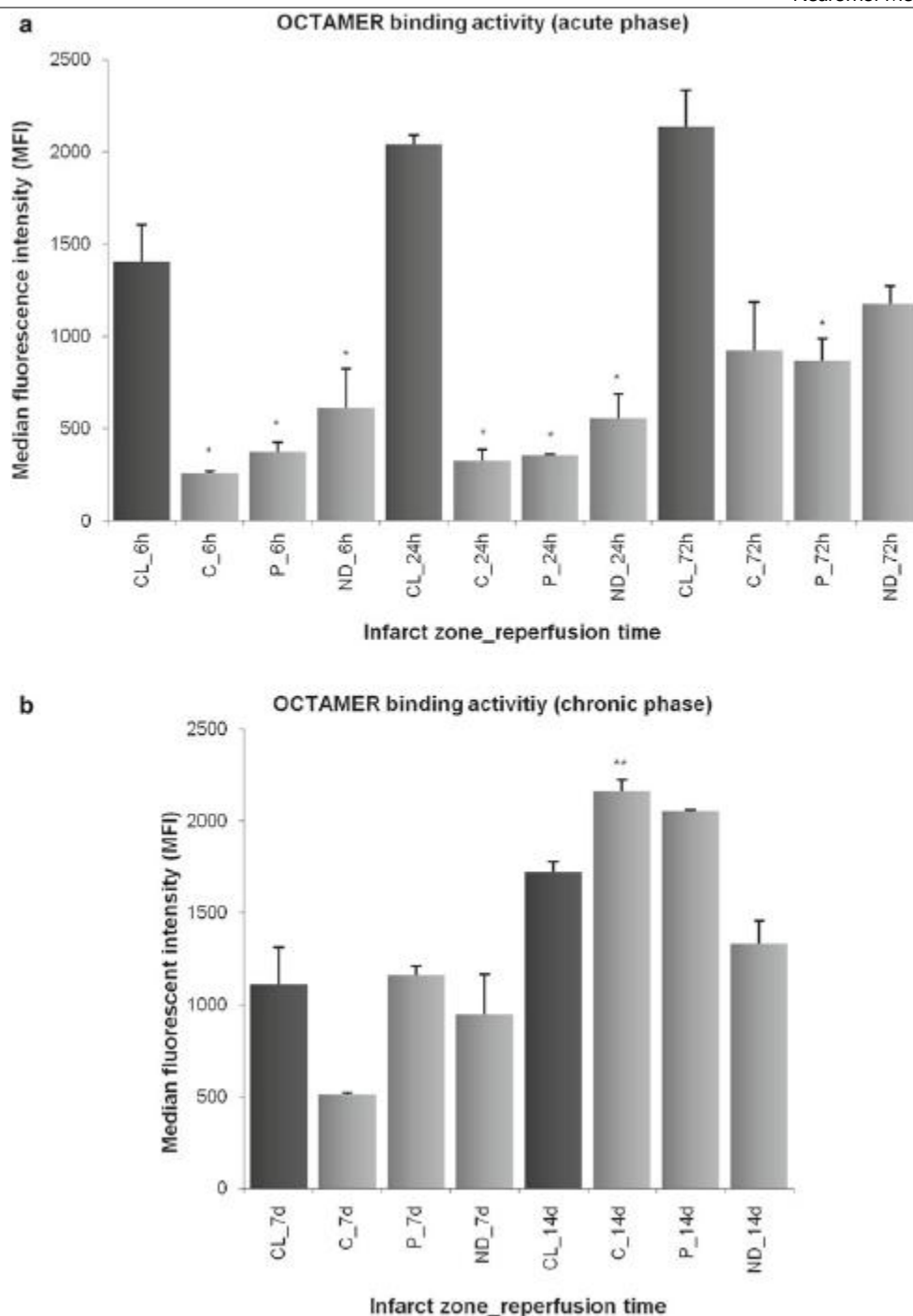
Fig. 1 Multiplex analysis of 50 different TFs from contralesional and ipsilesional rat cortex tissue. Comparison of transcription factor binding activity in cortical ipsilesional core, peri-infarct, and non-damaged tissue samples at 6, 24, and 72 h, and 7 and 14 days of

ipsilesional peri-infarct, and ipsilesional non-damaged tissue) and their respective contralesional tissue at the different times analysed are represented as MFI values in scatter plot graphs (Fig. 1). Each plot represents the

reperfusion versus contralesional tissue (CL). Binding activity is measured as medium fluorescence intensity (MFI). Octamer transcription factor binding activity is ringed in red (Color figure online)

binding activity of a single TF or a specific TF family. Of particular note in this study was the peculiar TF-binding activity profile of the octamer family. The multiplex analysis from contralesional and ipsilesional cortex tissue

Fig. 2 Octamer transcription factor binding activity study in nuclear extracts from rat brain exposed to tMCAO performed with the Luminex assay. Analysis of the octamer-binding activity (measured in MFI, median fluorescent intensity) in different infarct areas in the acute (a) and chronic phase of cerebral ischaemia (b) compared with the corresponding contralateral tissue. CL Contralesional control, C core, P peri-infarct, ND non-damaged. * indicates the reperfusion time when the binding activity differences are significant (changes >25 % and the Dev F ≥ 2.0), and the fold induction is B0.75; ** indicates the reperfusion time when the binding activity differences are significant, and the fold induction is C1.25. The specific MFI values are shown in supporting information (S1)



revealed an inhibition of over 70 % of octamer-binding activity after transient brain ischaemia in comparison with contralesional tissue brain samples in the acute phase (from 6 to 72 h of reperfusion) (Fig. 2a), with the least binding activity being recorded at 24 h of reperfusion (a fold induction of 0.23 in the ipsilesional non-damaged tissue in comparison with the contralesional tissue, Dev F = 9.81). At 7 and 14 days, the binding activity was greater (Fig. 2b), especially at 14 days when ipsilesional core and peri-infarct tissue samples showed much greater binding

activity than in the contralateral tissue (a fold induction of 1.78 in the ipsilesional core versus the contralesional tissue, Dev F = 7.56). The specific fold induction values of the different ischaemic areas versus the corresponding contralesional tissue when octamer TF-binding activity differences were significant (changes >25 % and Dev F ≥ 2.0) are shown in *Supporting material* (Table S1). These results showed a differential binding activity of the octamer TF family in the acute and late phases of ischaemia.

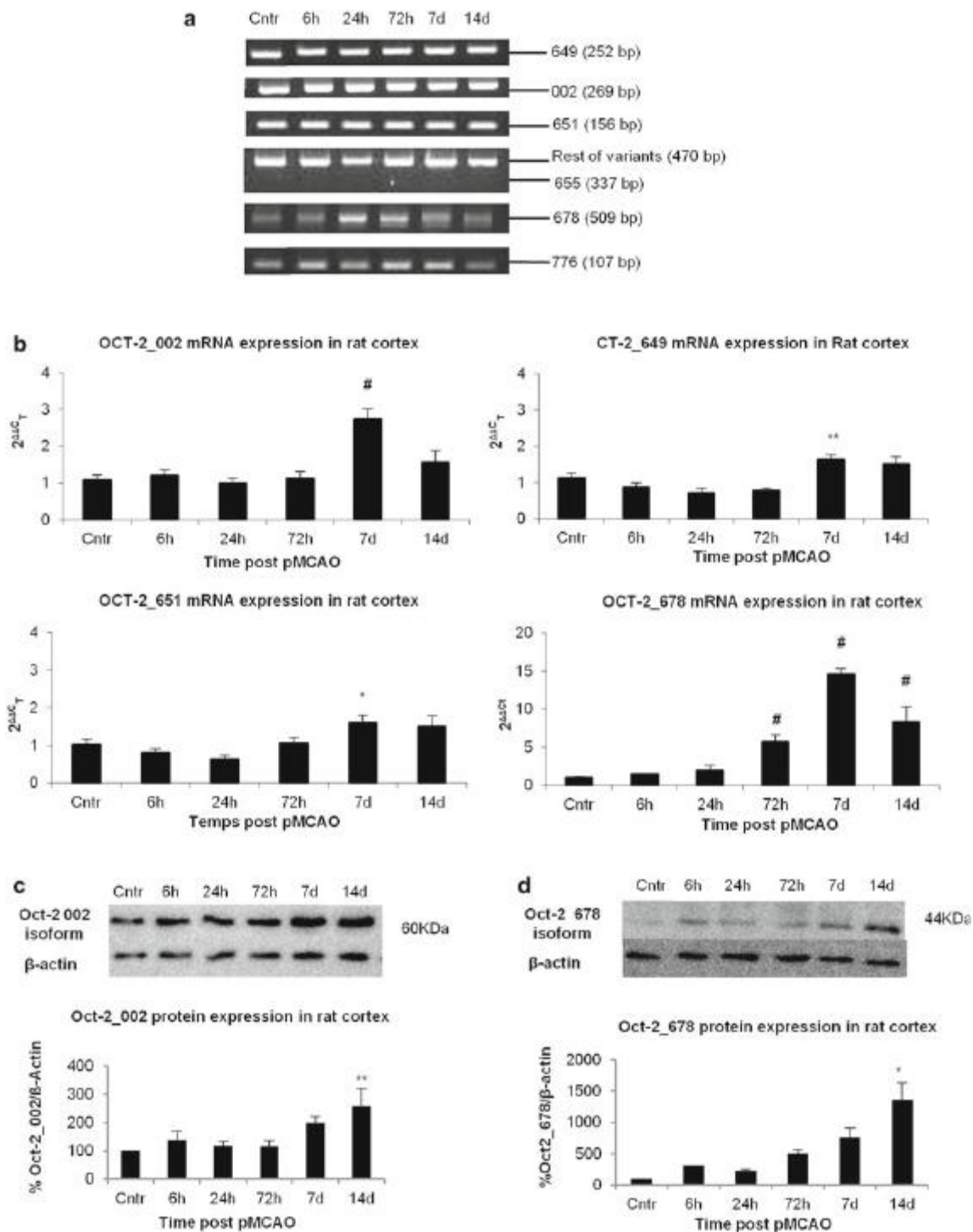


Fig. 3 Octamer-2 transcript analysis, gene expression, and protein study. Conventional PCR (a), quantitative real-time PCR (b), and Western blot (c: Oct-2 002 isoform, 60 kDa; d: Oct-2 678 isoform, 44 kDa) were used in control and permanent ischaemic brain samples at different times post-ischaemia. Ywhaz and Sdha were used as reference genes in quantitative real-time PCR. Results from Western

blot were normalised with β -actin. Oct-2 transcript names are abbreviated with the last three numbers of the Ensembl code. Cntr Sham control, min minutes, h hours, d days, and pMCAO middle cerebral artery permanent occlusion. (* p < 0.05; ** p < 0.01; # p < 0.001)

Octamer-2 Transcription Factor Transcripts are Expressed in Both Control and Ischaemic Rat Brain

In the octamer family, we focused on Octamer-2 (Oct-2) TF given the structural and functional complexity of the different transcript variants described (Wirth et al., 1991; Lillycrop and Latchman 1992; Annweiler et al., 1994). In addition, Oct-2 was the only protein among the different members of this family that was specifically expressed in the brain with an expression profile that varied post-ischaemia (data not shown). In order to characterise Oct-2 in brain ischaemia, we searched for the predicted transcript variants with the Ensembl programme and checked its real expression in control and ischaemic (pMCAO) brain using PCR and specific designed primers. Ensembl prediction revealed six candidate Oct-2 transcripts for *Rattus norvegicus*. Conventional PCRs performed with the specific primers showed that the Oct-2 transcripts described as ENSRNOT00000048002 (Pou2f2-201) (269 bp), ENSRNOT00000027649 (Pou2f2-202) (252 bp), ENSRNOT00000041651 (156 bp), ENSRNOT00000046678 (Pou2f2-203) (509 bp), and ENSRNOT00000068776 (107 bp) are all expressed in both permanent ischaemic and control rat brain (Fig. 3a). The transcript described as ENSRNOT00000027655 (337 bp) was not present in the control or ischaemic brain, as the only fragment obtained in this PCR was a band of 470 bp corresponding to the amplification of the rest of the Oct-2 variants.

Oct-2 mRNA Expression Increases in the Late Phase of Ischaemia

The different transcript variants identified by conventional PCR in control and ischaemic conditions were further analysed by qPCR in order to study their mRNA expression profile at different times post-ischaemia (Fig. 3b). We designed specific probes (TaqMan™ assay) for the five Oct-2 transcripts identified in rat brain to detect each transcript by qPCR except for the ENSRNOT00000068776 variant, which could not be done due to its short sequence. The present study showed that ischaemia induces changes in Oct-2 mRNA expression profile. Oct-2 transcript analysis revealed that ENSRNOT00000048002 (Pou2f2-201) expression in pMCAO cortex is maintained at basal levels from 6 to 72 h post-pMCAO. Expression was more than twice that of the control at 7 days ($p < 0.001$) and diminished at 14 days while still maintaining a higher expression than the control. This transcript is the most predominant one in the analysed samples, showing the lowest CT values (27–28) in the qPCR experiments. ENSRNOT00000027649 (Pou2f2-202) expression remained lower than in the control during the acute phase of ischaemia (from 6 to 72 h post-pMCAO). At 7 days, the expression was significantly higher than in the control ($p < 0.01$), and it diminished

slightly at 14 days while maintaining a higher level of expression than in the control. ENSRNOT00000041651 expression progressively diminished from 6 to 24 h post-ischaemia, increasing progressively at 72 h post-pMCAO and reaching the maximum expression at 7 days, when it was 60 % higher than the control ($p < 0.05$). Finally, the ENSRNOT00000046678 (Pou2f2-203) transcript profile was characterised by progressive increasing between 6 h and 7 days, when it showed its highest expression at almost 15-fold greater than the control. Statistical analysis indicated that this increased expression was significant at 72 h ($p < 0.001$), 7 days ($p < 0.001$), and 14 days ($p < 0.001$) post-ischaemia (Fig. 3b). This analysis demonstrated that all Oct-2 transcript variants identified showed a common mRNA up-regulation 7 days after pMCAO.

Oct-2 Protein Expression Progressively Increases After Cerebral Ischaemia

In order to analyse the protein expression profile of Oct-2 after cerebral ischaemia, we used two different commercially available antibodies. One of these antibodies was able to detect all the transcripts (Fig. 3c) (although only one band, representing the main transcript 002, was observed in the membranes), whereas the other is specific for the 678 transcript variant (Fig. 3d). Octamer-2 protein (60 kDa) quantified by Western blot showed a progressive increase, especially from 72 h to 14 days after permanent ischaemia in comparison with the control, and was significant at 14 days post-pMCAO ($p < 0.01$). The ENSRNOT00000048002 (Pou2f2-201) isoform (abbreviated as 002), with a theoretical molecular weight of 59 kDa, was the only Oct-2 transcript detected in the Western blot shown in Fig. 3c.

The ENSRNOT00000046678 (Pou2f2-203) isoform (44 kDa), abbreviated as 678 isoform, showed a progressive increase from 24 h to 14 days post-pMCAO, which was significant at 14 days post-ischaemia ($p < 0.05$) (Fig. 3d) when the protein expression was more than tenfold greater than in the control. The other transcript variants could not be analysed separately by Western blot as there were no specific antibodies. We therefore concluded that ischaemia induced an up-regulation of Oct-2, which reached its maximum expression 14 days after pMCAO.

Oct-2 Protein is Expressed in Neuronal Cells in Rat Cortical Brain

To further characterise the Oct-2 TF in control and ischaemic rat brain, we determined the neuronal localisation of Oct-2 TF in rat cortex. The immunofluorescence results in rat cortex slices showed Oct-2 protein expression

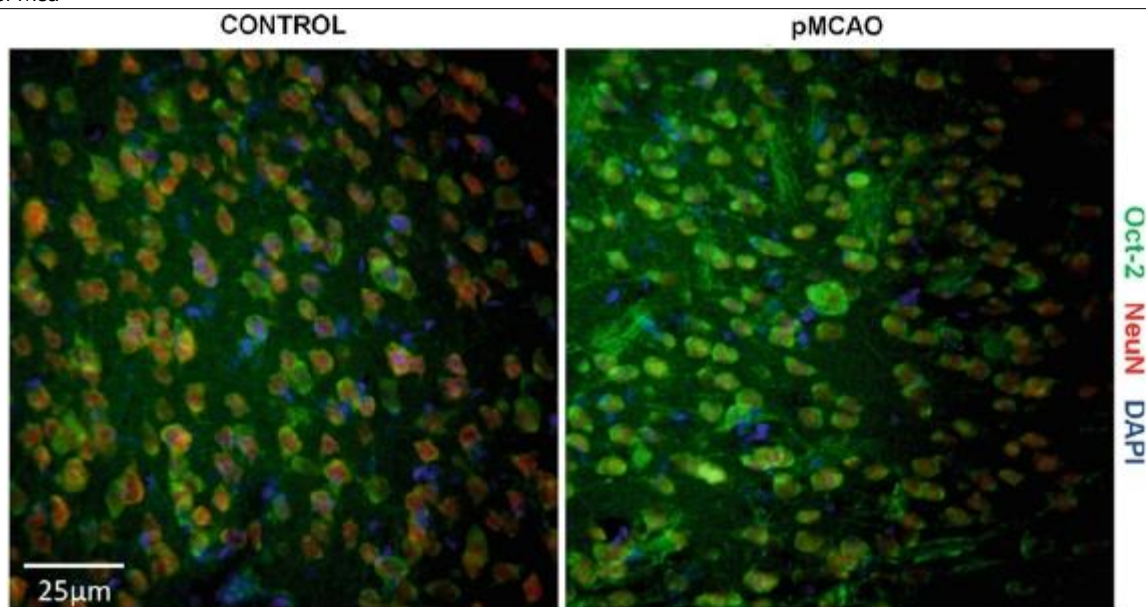


Fig. 4 The Oct-2 transcription factor protein is expressed in neuronal cells in control and ischaemic rat cortical brain. The presence and localisation of Oct-2 protein in brain cortex slices were analysed by immunofluorescence using antibodies against: Oct-2 (green), the cell

marker NeuN (red), and DAPI (blue), in control and pMCAO (24 h) conditions. The images were obtained with a X20 objective and merged on BD Pathway 855 Bioimager System using BD Attovision software (original magnification, X200) (Color figure online)

to be localised in NeuN-positive cells both in control and MCAO conditions (Fig. 4) and that it was slightly increased in ischaemic conditions. Oct-2 was found to be expressed both in the nucleus (co-localising with DAPI and the neuron-specific nuclear protein (Neun) staining) and the cytoplasm in control and ischaemic conditions, which was slightly greater in the nucleus of neurons from the infarct border zone (left of the pMCAO image) in ischaemic conditions.

Octamer-2 Protein Interacts with Transcription Factors involved in Neuronal and Vascular Development and Basic Cellular Functions

In order to elucidate in which signalling pathways Oct-2 is involved, we analysed the interaction profile of the Oct-2 TF in rat cortical brain slices. The TF–TF array showed that the Oct-2 protein in control conditions interacts with a variety of TFs, including ERE, MEF, ETS, MYC-MAX, OCT-1, NF κ B, RXR(DR1), SIE, Smad SBE, and VDR(DR3). Other TFs including NF-E1, NF-E2, STAT4, USF-1, HSE, and RAR(DR5) were found with lesser intensity, meaning that they are weak interactions (Fig. 5b). Nevertheless, the previously mentioned TF interactions with Oct-2 changed in transient ischaemic conditions in comparison with the control tissue sample. On the one hand, ERE, OCT-1, NF κ B, MYC-MAX, and VDR(DR3) interactions were maintained. On the other hand, ETS, MEF, NF-E2, NF-E1, RAR(DR5), RXR(DR1),

SIE, Smad SBE, STAT4, USF-1, and HSE interactions disappeared. In contrast, new TF interactions with NF-1 and SRE were observed, although they were detected as weak interactions (Fig. 5c). All the different Oct-2 TF interactions showed in control and ischaemic condition panels of the array are summarised in Fig. 5d. The Oct-2 TF interactions found are involved in important brain processes, including neuronal and vascular development, neuronal survival, and basic cellular functions (growth, apoptosis, differentiation, and homeostasis). The present analysis demonstrated that ischaemia induced changes in the Oct-2 signalling pathways, promoting different TF interactions in comparison with the Oct-2 profile in control conditions.

In Vitro Oct-2 Knockdown Promotes Neuronal Cytotoxicity

Finally, in order to further elucidate the Oct-2 function in brain, we performed a knockdown study in rat neuronal culture and analysed the potential role of Oct-2 in neuronal injury. The treatment of rat cortical neurons in culture with Oct-2 siRNA, which recognises all Oct-2 transcript variants, showed a diminution of Oct-2 protein expression at 4 and 5 days post-transfection (a reduction of 30 and 20 %, respectively) which was significant ($p < 0.01$) at the fourth day (Fig. 6a). Moreover, the Oct-2 siRNA-treated RN group presented a slight increase in LDH release compared to the non-target siRNA-treated RN group, from 4 to

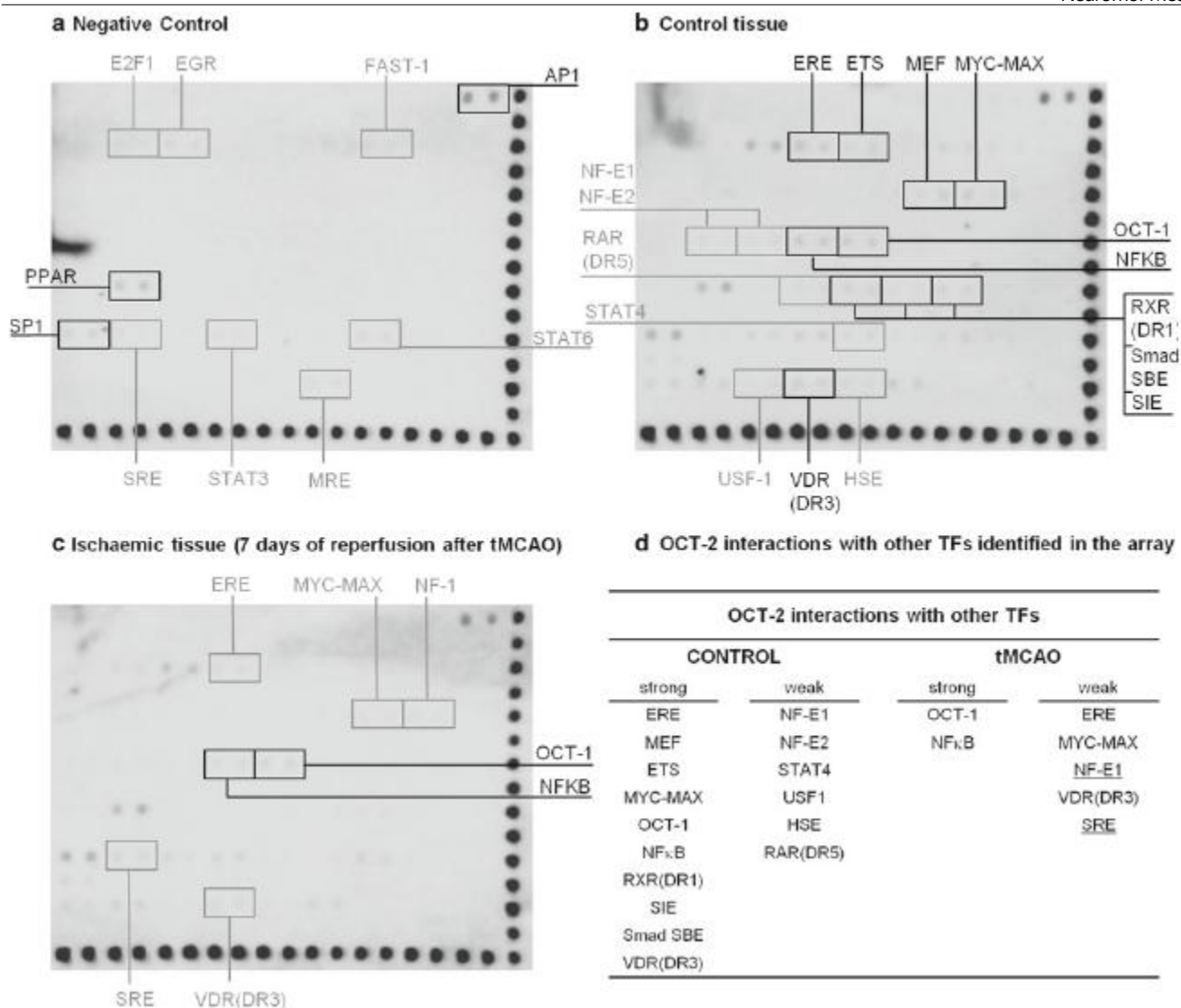


Fig. 5 Oct-2 TF-TF interaction profile analysis. Comparison of the Oct-2 interaction profile performed with the TranSignal™ TF-TF Array Kit version I between negative control (a), control tissue (b), and ischaemic (c) rat brain nuclear extract samples (7 days of reperfusion after tMCAO, ipsilesional core). The main Oct-2 interactions with other TFs in control and tMCAO conditions, found

in the array, are listed in d. A negative control (normal goat IgG antibody) was used to elucidate false-positive interactions. Strong interactions of Oct-2 are shown in black, weak interactions are indicated in grey (a-c), and new interactions are showed underlined (d)

6 days post-transfection, being significant at 6 days ($p < 0.05$) (Fig. 6b). These experiments showed that RN cultures with a decreased Oct-2 expression of 30 % or less correlated with an increase in neuronal toxicity and cell injury compared with neurons with unaltered Oct-2 expression, in control conditions.

Discussion

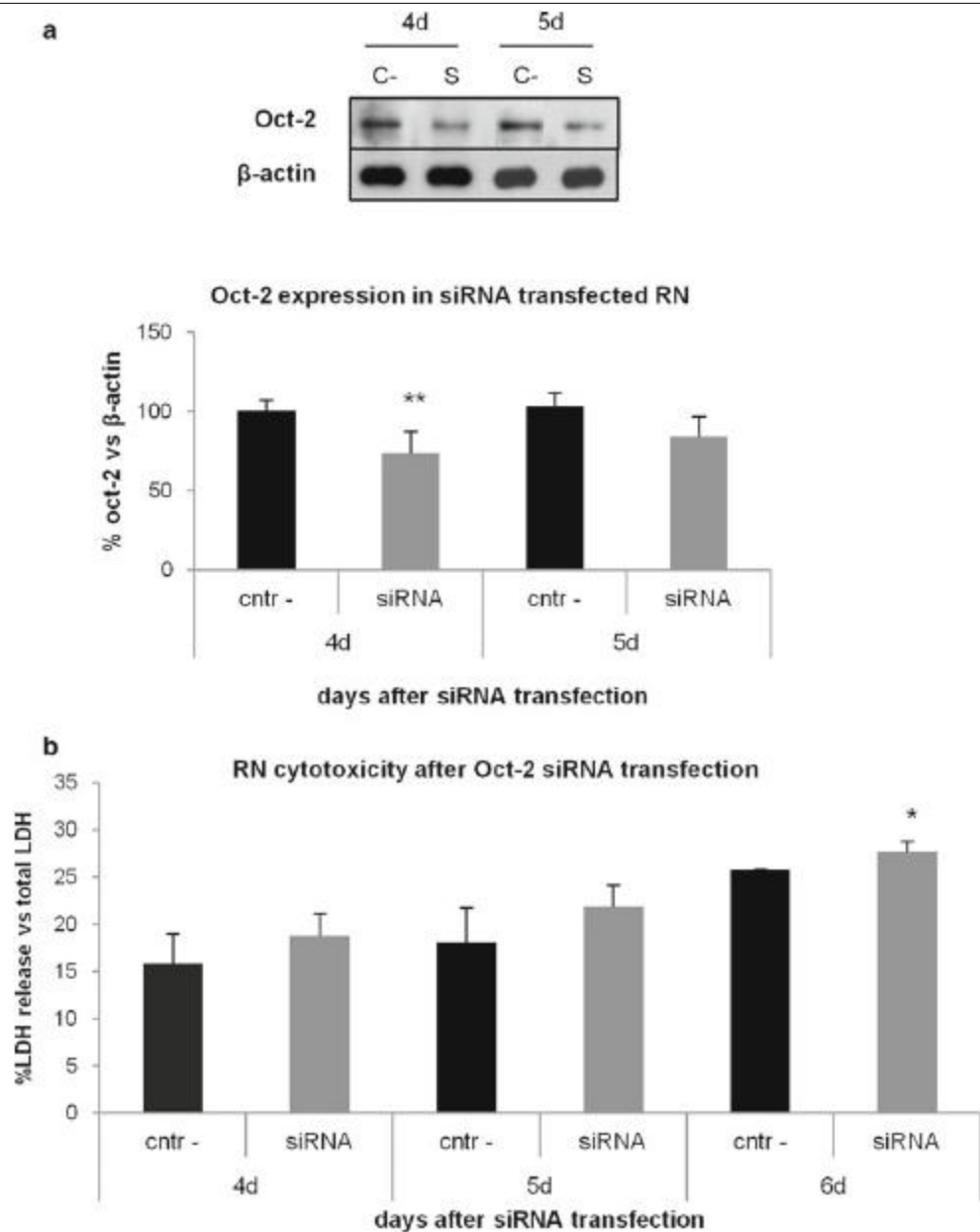
In the present study, we found a differential binding activity of the Oct TFs family after cerebral ischaemia which led to the performance of an extensive

characterisation of the Oct-2 TF in control and ischaemic rat brain cortex in order to investigate its putative role in stroke. A neuronal localisation of the TF was found in control and ischaemic rat brain and a progressive increase in mRNA and protein expression in the late phase of ischaemia. We found that Oct-2 interacts with other TFs involved in important brain processes including neuronal and vascular development, neuronal survival, and basic cellular functions and describe Oct-2 as being involved in preventing cytotoxicity and neuronal injury in vitro.

Two in vivo models of focal ischaemia have been used in the present study. tMCAO was selected for the TF-binding activity and TF-TF interaction array, in which the

Fig. 6 The Oct-2 TF protein knockdown by siRNA treatment in rat cortical neurons (at 4 and 5 days after transfection)

(a) promotes an increase in LDH release of the culture from 4 to 6 days post-transfection (b). Results from Western blot were normalised with β -actin. Cytotoxicity was expressed as a percentage of the mean maximal LDH value (0.1 % Triton X-100 treated cells) and represented in comparison with the negative control group (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; # $p < 0.001$)



aim was to identify differences among the different affected brain zones along the time of post-ischaemia. This model shows a slow extension of the infarct core into the penumbra, thus allowing a more prolonged and consistent peri-infarct area (Hossmann and Traystman 2009). In contrast, for the study of transcript gene expression and sub-cellular localisation, a pMCAO was chosen, since in this model, the core expands into the penumbra much faster (Hossmann and Traystman 2009) and the infarct volume shows greater reproducibility.

In order to identify new TFs and elucidate novel regulatory mechanisms implicated in cerebral ischaemia, a multiplex TF-binding activity analysis was performed. For this analysis, we used the Marligen Multiplex Transcription

Factor Profiling Assay, which is compatible with Luminex xMAP™ technology, to simultaneously analyse the binding activity of different TFs in a quantitative and reproducible format. This technique is faster and easier than EMSAs, fivefold to tenfold more sensitive than colorimetric ELISAs, and the multiple binding site analysis mimics in vivo conditions.

Among the 50 TFs analysed, the octamer family showed a dramatic change in its binding activity profile during the acute and late phases after MCAO. Among octamer family, we focused on Oct-2 TF given that it is the only member of this family that was specifically expressed in the brain with an expression profile that varied post-ischaemia and due to the structural and functional complexity of the different

transcript variants described (Wirth et al, 1991; Lillycrop and Latchman 1992; Annweiler et al, 1994).

Although Oct-2 expression has also been described in astrocytes (Schreiber et al, 1990) and in microvascular endothelial cells (Boutet et al, 2001), we focused the present study on determining the localisation of the Oct-2 protein in neuronal cells in control and ischaemic rat brain given that this has been reported by numerous laboratories as being expressed in the neuronal cells of different mammal species in control conditions (He et al, 1989; Scholer et al, 1989; Kemp et al, 1990; Hatzopoulos et al, 1990; Lillycrop et al, 1991; Stoykova et al, 1992). Immunofluorescence in rat cortical slices revealed a nuclear and cytoplasm localisation of Oct-2 in neuronal cells, which was slightly greater in the nucleus in ischaemic conditions (24 h post-pMCAO). The nuclear increase in Oct-2 was observed as limited to the infarct border. In contrast, Oct-2 protein up-regulation in the Western blot analysis was observed in the late phase after ischaemia. These differences between the two experiments may be due to the fact that the small differences observed in specific regions of the cortical slices by immunofluorescence overlapped in the Western blot analysis, where brain tissue homogenates were used.

In mouse, it has been described that the primary RNA transcript of the Oct-2 gene is subject to alternative splicing to yield different transcripts of the mRNA with distinct effects on gene expression in B lymphocytes (Oct-2.1 and Oct-2.3 isoforms) compared to neuronal cells (Oct-2.4 and Oct-2.5 isoforms). The inclusion (in Oct-2.1) or exclusion (in Oct-2.4 and Oct-2.5) of the full length CTD and the presence of a negative regulatory domain (NRD) (in Oct-2.3) in the Oct-2 protein determine the transcriptional function and its transactivation potential (Latchman 1996a). Thus, the identification and individual analysis of the different Oct-2 transcript variants in rat brain were essential in order to avoid misinterpretations whether due to analysis of all the transcripts together or the study of a specific reference variant. This study showed that five of the six predicted rat variants are expressed in control as well as in ischaemic rat cortex. According to Ensembl sequences and the nomenclature previously used for Oct-2 mouse transcripts (Wirth et al, 1991), rat transcripts should correspond to Oct-2.5 (ENSRNOT00000048002 or Pou2f2-201), Oct-2.3 (ENSRNOT00000027649 or Pou2f2-202), and Oct-2.6 (ENSRNOT00000046678 or Pou2f2-203). The ENSRNOT00000041651 and the ENSRNOT00000068776 did not match any of the transcripts previously described in mice, although ENSRNOT00000041651 showed a certain structural similarity with the Oct-2.3 (the NRD motif) and the Oct-2.5 transcript (a truncated C-terminus domain). All the transcripts analysed contained the ADN-binding motif necessary for the TF function with the exception of ENSRNOT00000068776. This transcript variant was found

to consist only of the minimum structure (the specific POU and homeo-subdomains) for it to bind to its target sequence, without the presence of any transactivation domain. According to previous studies in mouse (Annweiler et al, 1994; Corcoran et al, 2004), the ENSRNOT00000046678 (Oct-2.6) and ENSRNOT00000027649 (Oct-2.3) transcripts identified in rat brain samples could have an activating transcriptional activity, as they present the full C-terminus activation domain. In this domain, the nine amino acids shown to be critical for the CTD function can be identified (Fig. S5). On the other hand, the ENSRNOT00000048002 (Oct-2.5) and ENSRNOT00000041651 transcripts that lack the full CTD domain containing the nine critical amino acids might perform an inhibitory transcriptional activity.

The results of the different experiments performed were found to agree with each other: (a) the mRNA expression profiles of the analysed Oct-2 transcripts tended to be similar, increasing progressively in the late phase of ischaemia (around 7 days); (b) the Oct-2 protein was shown to increase at 14 days post-pMCAO; and (c) the Oct-2 TF-binding activity induction (versus the control) was observed at 14 days after ischaemia. In addition, the mRNA and protein expression patterns followed a concordant profile, showing an mRNA increase 7 days after pMCAO which could lead to a peak in protein expression observed at 14 days after ischaemia. The ENSRNOT00000046678 (Pou2f2-203) transcript particularly stands out as it shows a huge increase in its expression at 7 days post-pMCAO. However, the ENSRNOT00000048002 (Pou2f2-201) transcript variant is found to be the predominant variant in the samples studied here.

With regards to the function of Oct-2, it has been suggested that it may play a critical role in the normal development of the central nervous system of mammals (Latchman 1996a) and, particularly, for post-natal survival (Phillips and Luisi 2000; Corcoran et al, 2004). In order to better understand this function, a TF-TF interaction array was performed. This analysis showed that Oct-2 interacts with several TFs which principally modulate neuronal and vascular development processes and basic cellular functions (surveillance, apoptosis, growth, differentiation, and homeostasis). Specifically, the present study showed that Oct-2 could participate in the regulation of the angiogenesis and vascular development (through ETS interaction) (Lelievre et al, 2001; Sato et al, 2001); the survival of newly differentiated neurons and the cardiovascular development (through MEF) (Ikeshima et al, 1995; Naya et al, 1999; Agarwal et al, 2011); neuronal cell death and inflammation (through NF κ B) (Qin et al, 1998; Crack and Taylor 2005); cellular proliferation, differentiation, and apoptosis (through Myc-Max) (Chen et al, 1995; Tencheva and Panov 2008); and growth, differentiation, development, and homeostasis processes [through ERE (Lee and

Mouradian 1999) and RXR(DR1) (Collino et al., 2008; Giaginis et al., 2011; Mathisen et al., 2011)]. These results agree with earlier studies in humans (Andersen and Rosenfeld 2001) in which some of the previous Oct-2 interactions with other ADN-binding proteins, such as MEF, NF1, and nuclear hormone receptors (RXR and VDR), are described. In addition, as previously reported (Andersen and Rosenfeld 2001), we can conclude that Oct-2 can heterodimerise with other factors as the interaction with the Oct-1 TF observed in the present study demonstrates. Moreover, the present study has shown that ischaemia induced changes in the Oct-2 interaction profile, promoting new as well as the disappearance of some interactions. However, this does not imply a decrease in Oct-2 transcription activity. The cooperative assembly among different TFs may act as a repressor (not allowing the TF to bind to its target sequences) or as a promoter (acting as a co-activator), which is necessary for target promoter binding (Martinez 2002). Therefore, depending on the function of these interactions in the Oct-2 interaction profile, disruption may lead to inhibition or activation of the different target promoter sequences. Further investigations will be required to elucidate the role of these specific multi-protein interactions.

Finally, in order to investigate the Oct-2 potential function in the brain, we performed knockdown experiments with rat cortical neurons in culture to test its possible involvement in neuronal survival and damage, as it seems to point the results from the TF–TF interaction array. The culture was treated with Oct-2 siRNA, and the neuronal cytotoxicity was analysed by LDH release measurement over time post-siRNA transfection. These experiments showed a correlation between Oct-2 knockdown and an increase in the LDH leakage from rat cortical neuron culture. Previous studies have shown that the efflux of LDH occurring from either necrotic or apoptotic neurons is proportional to the number of damaged or destroyed cells (Koh and Choi 1987; Gwag et al., 1995), being a parameter of cellular injury (Arce et al., 2012; Thoresen et al., 2012). Our results show that a reduction in Oct-2 expression in neuronal cells leads to a slight increase in neuronal injury in vitro, suggesting that Oct-2 seems to be involved in preventing neuronal cytotoxicity. We have observed a trend of increasing neuronal damage in Oct-2 siRNA-treated neurons from 4 to 6 days after transfection, showing non-markedly differences compared with the control neurons. Surely, this slight increase, we observed, is proportional to the percentage of Oct-2 protein knockdown obtained, which was of 20–30 % compared to the control. Some previous studies have already showed the Oct-2 TF role in promoting neuronal surveillance. It has been described that Oct-2 is being up-regulated 3–4 times by NGF (neuronal growth factor) in sensory rat neurons, thus

suggesting that Oct-2 plays a role in mediating the transcriptional effects (promotion of neuronal survival and preventing neuronal death) induced by this growth factor (Wood et al., 1992; Kim et al., 2004). Moreover, it has also been reported that Oct-2 TF is involved in the regulation of genes encoding different synaptic proteins (SNAP-25 and synapsin I) in neuronal cells (Deans et al., 1997). In the present study, we have found that the inhibitory Pou2f2-201 isoform is the predominant one in the rat ischaemic brain, so we hypothesise that this variant could prevent neuronal injury directly inhibiting cellular death signalling pathways as described for Oct-4 and miR-125b/BAK1 pathway (Wang et al., 2013). On the other hand, we have also demonstrated that the transcripts variants Pou2f2-202 and Pou2f2-203 that are characterised for an activating transcriptional activity are up-regulated by ischaemia. These transcript variants could reduce neuronal injury by promoting pro-survival signalling pathways (by directly regulating bcl-2 expression) (Heckman et al., 2006). Thus, the present study is the first one to demonstrate the Oct-2 potential to prevent neuronal toxicity. Further experiments are necessary to fully understand how the TF perform this role: directly (inhibiting neuronal cell death or activating the neuronal pro-survival signalling pathways) or through the interaction with other TFs (found in the TF–TF array) involved in the activation of homeostasis processes which promote the restoration of neuronal functions.

Therefore, the results from the present functional studies (TF–TF interaction array and knockdown studies) suggest that Oct-2 is involved in counteracting the mechanisms that cause neuronal injury, which could lessen the infarct progression in the late phase when the maximum expression is observed. Hence, it seems likely that the up-regulation of Oct-2 TF could play a role in functional pathophysiological recuperation after ischaemia. In the acute phase, the induction of Oct-2 TF expression may be effective in reducing the ischaemic-mediated neuronal death and so could be an effective brain protector therapy to be used in the first hours after stroke.

Conclusion

To the best of our knowledge, this is the first study in which the octamer family, specifically the Oct-2 TF, has been studied in cerebral ischaemia. Here, we show that differences in Oct-2 binding activity and gene expression are observed in the acute and late phase of ischaemia. We also describe Oct-2 neuronal localisation and its interactions with other TFs in control and ischaemic rat brain. Finally, our findings provide evidence for Oct-2-mediated responses having an overall beneficial role in neuronal physiological

functions, suggesting that it could be involved in reducing neuronal injury in the context of cerebral ischaemia. Further studies are necessary to validate the role of Oct-2 in stroke and determine whether Oct-2 TF promotes these effects directly or indirectly, forming a multi-protein complex through interaction with other TFs.

Materials and Methods

All procedures were approved by the Committee of Animal Care of the Universidad Complutense of Madrid in accordance with European Union regulations (86/609/CEE) and Spanish legislation (RD223/88).

Bioinformatics

Octamer-2 rat transcript variant identification was performed using Ensembl gene predictions and related sequences of Entrez Gen at the NCBI (National Center for Biotechnology Information). Ensembl release 69—October 2012, and Ensembl release 70—January 2013, were used (Hubbard et al., 2009, b). While the present manuscript was being prepared, the Ensembl database was updated with the result that Ensembl release 69 became Ensembl release 70 and that the original six transcript variants became only three (Pou2f2-201, Pou2f2-202, and Pou2f2-203) for the rat Oct-2 gene. Therefore, in the present study, all of the original six transcript variants were considered in characterising Oct-2 in ischaemic rat brain. Homology between transcript sequences was determined using Clustalw2. Sequence data were also aligned using this software (Chenna et al., 2003). The theoretical molecular weights of the different Oct-2 isoforms were obtained using the Compute pI/Mw tool of the Expert Protein Analysis System (ExPASy) on the Swiss Institute of Bioinformatics website (2006). Primer3 software was used for PCR primer design (2009c), and 7,000 System software v1.2.3 (Applied Biosystems) was used to perform qPCR and to further analyse the data obtained.

In Vivo Cerebral Ischaemia Models

Experiments were performed on adult male Fischer rats (250–300 g body weight; Harlan). Animals were housed individually under standard conditions of temperature and humidity and with a 12-h light/dark cycle (lights on at 08:00) with free access to food and water. Rats were anaesthetised with isoflurane 1.5–2 % with a mixture of 70 % nitrogen and 30 % oxygen. Body temperature was maintained at physiological levels with a heating pad during the surgical procedure and anaesthesia recovery.

Transient Middle Cerebral Artery Occlusion in Rats

The transitory cerebral ischaemia model was performed according to a previously reported 3-vessel occlusion model (Chen et al., 1986; Liu et al., 1989; Sobrado et al., 2003). After 90 min of distal occlusion of the left MCA and both common carotid arteries (CCA), the three arteries were opened and complete reperfusion was observed under an operating microscope. Transient MCAO rats were killed at 6, 24, and 72 h and 7 and 14 days after reperfusion ($n = 3$ rats in each group). Brains were removed, and cortical ipsilesional core, ipsilesional peri-infarct, and ipsilesional non-damaged tissue, as well as contralesional cortex tissue [as shown in Fig. 7, adapted from (Sobrado et al., 2011)], were collected at each period of time. The ischaemic core was defined as the cortical tissue surrounding the occluded MCA, which differed from adjacent tissue consistency and according to Sobrado et al., (2011). The peri-infarct tissue was identified as the cortical tissue immediately adjacent to the core and based on the average images (apparent diffusion coefficient, ADC; and cerebral blood flow, CBF) according to Sobrado et al., (2011).

Samples were immediately frozen at -80°C until nuclear extract isolation. Contralesional tissue was used as a control to conduct the TF-binding activity assay.

Permanent Middle Cerebral Artery Occlusion in Rats

The permanent cerebral ischaemia model was induced following a previously described method (Hurtado et al.,

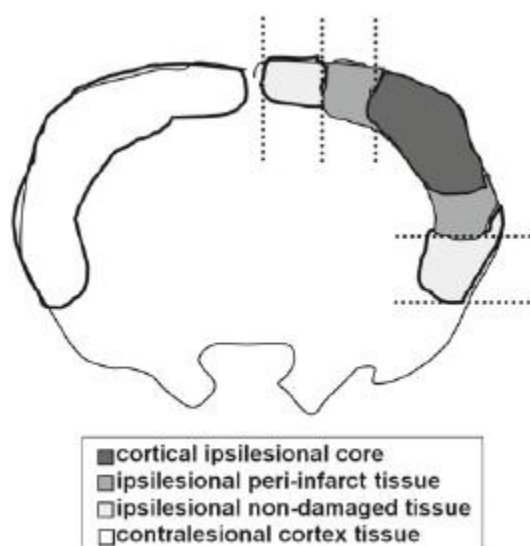


Fig. 7 Scheme of the sample collection after rat tMCAO. The brain was sliced in coronal sections corresponding to the territory of the MCA. The cortical ipsilesional tissue was identified by the different consistency of the tissue, and for the rest of the regions, we proceeded as shown in the picture [adapted from (Sobrado et al., 2011)]

2005; Mallolas et al., 2006). Briefly, permanent focal cerebral ischaemia was induced by ligation of the left common carotid artery and occlusion of the ipsilateral distal MCA. Brains were removed, and cortical infarcted and peri-infarcted tissue were collected from the pMCAO animals at 6, 24, and 72 h and 7 and 14 days after occlusion ($n = 6$ rats in each group). Samples were divided into two and frozen at -80°C until RNA, and protein isolation were undertaken.

Likewise, control samples from healthy animals were also collected following the same protocol in order to perform the gene expression analysis, the protein study, and the TF–TF interaction array.

Transcription Factor Binding Activity Assay

A Luminex bead-based system was used to simultaneously assess the binding activity of 50 different TFs (Table S2) in nuclear extracts from rat brain after tMCAO. The nuclear extracts were obtained from control and transient ischaemic rat brain samples using a Nuclear Extraction kit (Marligen Biosciences) in accordance with the manufacturer's instructions. TFs were analysed with a Luminex[®] 200[™] instrument using Marligen Multiplex Transcription Factor Profiling Assay (Marligen Biosciences) and StarStation[™] software for data acquisition. This assay is based on the specific binding of TFs to cognate ADN sequences on labelled beads (polystyrene microspheres internally dyed with fluorophores) (xMAP[®] technology). The sequences are mined from protein binding sequences in the TRANSFAC database (<http://www.gene-regulation.com/pub/databases.html>). Within the analyser, lasers excite the internal dyes that identify each microsphere particle and also capture any reporter dye during the assay. In this way, the technology allows multiplexing of up to 100 unique assays within a single sample. The assay is more sensitive than enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) or gel shift assay (Shurin et al., 2005; Hansmann et al., 2008). The ipsilesional core, the ipsilesional peri-infarct, and the ipsilesional non-damaged tissue, as well as the contralesional cortex tissue from each rat brain, were analysed separately following the manufacturer's recommendations. About 10 μg of nuclear extracts was used to perform the activation profile analysis of the 50 TFs. Positive and negative (background) controls and HL-60 cells treated and untreated with PMA/Ionomycin for 24 h were used as the assay control and nuclear extract control, respectively.

The binding activity was measured in mean fluorescence intensity (MFI) in accordance with the manufacturer's instructions. In order to quantitatively measure the magnitude of the changes, an algorithm based on least median squares (LMS) to estimate the slope and intercept of the line that best fits the collinear points) was used. The

significance of change was represented by Dev F, which is the ratio of the difference between the MFI of the treated sample and the expected value to the sum of the standard deviations of the treated and untreated sample. A Dev F value of two or greater is considered significant. MFI values in control and ischaemic samples are compared in a scatter plot graph (Fig. 1). Each point in Fig. 1 represents a single TF. Data points on the scatter plot that are co-linear or nearly co-linear represent TFs with unchanged binding activity. Data points that are significantly distant from the co-linear points represent TFs that have changed their binding activity due to the treatment, which in this case is the induced ischaemia (tMCAO).

Oct-2 Expression Study in Rat Brain

RNA Extraction, Quantification, and Retrotranscription

RNA extraction was undertaken from rat brain tissue submitted to pMCAO. Qiazol lysis reagent (Qiagen) was immediately transferred to frozen samples of cerebral cortex and then homogenised using an Ultra-Turrax T25 homogeniser. The protocol for the use of the RNeasy[®] Lipid Tissue Mini Kit (Qiagen) for RNA quantification and purity estimation (GeneQuant, Biochrom) and reverse transcription (High Capacity ADNc Reverse Transcription Kit, Applied Biosystems) was followed as previously described (Gubern et al., 2009). Two independent retrotranscription reactions were performed for all samples.

Identification of Oct-2 Transcript Variants

Rat Oct-2 transcript variants were predicted using Ensembl software (Hubbard et al., 2009; 2009b). The identification of the Oct-2 transcripts in control and ischaemic cortex was performed by conventional polymerase chain reaction (PCR) using retrotranscribed ADNc and a pair of primers specifically designed, except in the case of ENSRNOT00000027655, to amplify each transcript variant separately (Table S3). In the case of ENSRNOT00000027655, amplification was undertaken by designing a pair of oligonucleotides that amplify both this specific transcript and the rest of the transcript variants.

Analysis of Oct-2 Transcripts Expression in Rat Cortex

Gene expression analysis of Oct-2 transcripts in each sample (control and permanent ischaemic samples) was conducted using quantitative real-time PCR (qPCR) (with the 2-DDCT method). Specific TaqMan[®] Gene Expression Assays were designed to study the individual transcripts. To correctly perform ENSRNOT00000046678 (Pou2f2-203) transcript variant quantification, it was necessary to

preamplify all samples for this transcript and the reference genes using TaqMan™ PreAmp Master Mix following the manufacturer's instructions. The assay design was performed with the Custom TaqMan™ Assay Design Tool on the Applied Biosystems website (2009a). The gene expression conditions have been previously described (Gubern et al., 2009). Reactions were run in an ABI PRISM 7000 Instrument (Applied Biosystems), and TaqMan^o Universal PCR Master Mix was used. Ywhaz and Sdha were used as reference genes for expression data normalisation as has been previously described (Gubern et al., 2009).

Protein Extraction and Quantification

Frozen cerebral cortex samples from permanent ischaemia were homogenised by sonication during 10–12 s and using a homogenisation buffer containing a protease inhibitor cocktail (serine, cysteine, and metalloproteases) and 0.1 % Nonidet P40 (Roche). Rat cortical neuronal culture (RN) samples (transfected Oct-2 and non-target siRNA) were homogenised using a lysis buffer (Cell Signalling) with PMSF (1 %), mixed with vortex every 5 min for 30 min while maintained in ice. Cortex and RN homogenised samples were then centrifuged, and the supernatant (protein) was collected. Protein quantification was performed using a Protein Assay Kit (Bio-Rad) based on the Bradford method in accordance with the manufacturer's instructions.

Western blot

Brain tissue homogenates from control and permanent ischaemic (pMCAO) rats containing 60 µg of protein and lysates from siRNA transfected RN containing 10 µg of protein were loaded, and the proteins were size-separated in 10 % SDS-PAGE (90 mA) (Romera et al., 2004; Mallolas et al., 2006). The proteins were blotted onto a PVDF membrane (GE Healthcare) and incubated with the specific primary antibody against Oct-2 (sc-25400; 1:200; Santa Cruz Biotechnology), which binds to 360–479 amino acids of Oct-2 so as to recognise all the different transcript variants. Another primary antibody against Oct-2 was used (sc-233; 1:200; Santa Cruz Biotechnology), which only recognises one of the transcript variants (ENSRNOT00000046678). Proteins recognised by the antibodies were revealed with SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate (Thermo Scientific) used in accordance with the manufacturer's instructions. b-actin was used as the loading control. Specific signals were quantified with densitometry analysis software (Kodak MI 5.0 SE version).

Immunofluorescence

Twenty-four hours after MCAO, rats (n = 2 for each group) were anaesthetised, fixed, and cryopreserved as previously reported (Sobrado et al., 2009). Brains were frozen and serials of 40-µm-thick coronal sections were cut with a sliding microtome (Leica SM200R) and mounted on glass slides. Adjacent sections were then processed to perform immunohistochemistry. Primary antibodies rabbit polyclonal anti-Oct-2 (1:50; Sta Cruz Biotechnology, sc-25400) and the respective cell marker mouse monoclonal anti-NeuN (1:100; Chemicon, MAB377) were used. Secondary antibody staining using Alexa Fluor 488/594 goat anti-rabbit/mouse IgGs (Invitrogen) and counterstaining using DAPI (Invitrogen) were performed following BD Biosciences protocols. Images were captured by different channels for Alexa Fluor 488 (pseudo-coloured green), Alexa Fluor 594 (pseudo-coloured red), and DAPI (pseudo-coloured blue) on a BD Pathway™ 855 Bioimager System (Becton–Dickinson Biosciences) with 920 objective (NA 075 Olympus). The z-stack application was used to obtain the images using BD Attovision™ software. Both acquisition and merging of images were carried out according to the recommended assay procedure using BDAttovision™ software.

Oct-2 Interaction Analysis in Rat Brain

In order to assess the interactions of Oct-2 and determine the cellular processes it is involved in, a TranSignal™ TF–TF Array Kit version I (Panomics) was used in accordance with the manufacturer's instructions. This kit consists of a ChIP–Array method based on a combination of the chromatin immunoprecipitation (ChIP) and a high-throughput technique (array). These two coupled techniques allow the active transcription factor binding sites (TFBS) of a specific TF to be mapped efficiently. Moreover, combining array profiling and ChIP data permits a more effective TFBS analysis for the study of the function of a TF (Qin et al., 2011).

About 30 µg of nuclear extracts was incubated with a cocktail of biotin-labelled double-strand ADN oligonucleotide probes (known TF-binding consensus sequences). About 2 µg of Oct-2 antibody (Santa Cruz Biotechnology) was used to immunoprecipitate Oct-2-associated TFs and their corresponding cis-elements. A control antibody (normal IgG; Santa Cruz Biotechnology) was used as a negative control. Different washing steps were then performed to eliminate free cis-elements and non-specific binding proteins. Finally, the bounded cis-elements were eluted and hybridised to the TranSignal™ Protein/ADN Array membranes, spotted with 54 different consensus ADN sequences, which are complementary to the known

TF target sequences, TFBS. The symbols and complete names of the TFs which were studied are shown in Table S4 (supplementary information). The membranes were revealed with the detection compounds from the kit, which was used in accordance with the manufacturer's instructions. This array is a qualitative assay in which the spots indicate the presence or absence of the TF interaction. Therefore, the signal intensity of the array spots is not proportional to the amount of interaction, but rather is proportional to the quality of these interactions (strong or weak).

Treatment of Cortical Neurons with Oct-2 siRNA

In order to study and elucidate the role of Oct-2 in cerebral ischaemia, pure rat cortical neuronal cultures (RN) were prepared as previously described (Romera et al., 2004) for use in gene knockdown experiments. Cells were seeded (1.5×10^6 per well) in six-well plates (Cultek) previously coated with poly-lysine (Sigma), and the Oct-2 siRNA transfection was performed at 10–12 days in vitro (DIV). The RN cells were transfected with a mixture containing basal medium, 16.7 μ l/well HiperFect Transfection Reagent (Qiagen), and 50 nM/well of ON-TARGETplus SMARTpool Oct-2 siRNA (a mixture of four Oct-2 siRNAs) (Dharmacon) or 50 nM/well of non-targeting siRNA (Dharmacon) as the negative control of siRNA transfection. Twenty hours after siRNA transfection, the medium was replaced by complete RN growth medium. For this study, we used non-target siRNA-treated RN culture as control group, as in the optimisation study, the different control groups tested (non-treated cells, transfection reactive only treated cells (mock), and non-target siRNA-treated cells) showed no significant differences ($p < 0.05$) in viability and cytotoxicity. From 4 to 6 days after transfection, culture cytotoxicity was assessed by lactate dehydrogenase (LDH) assay (Fig. 6b). As a marker of cell injury (necrotic damage), LDH release from damaged cells was determined using the CytoTox 96[®] Non-Radioactive Cytotoxicity Assay (Promega) and measured spectrophotometrically at 490 nm using a microplate reader (Tecan). LDH was measured in at least three different wells per experiment. The results were normalised to the mean maximal LDH value, corresponding to cells exposed to 0, 1 % Triton X-100, which causes near complete neuronal cell death (100 %). The results are expressed as a percentage of the maximal LDH level and represented in comparison with the negative control group (Lobner 2000; Pan et al., 2012; Xie et al., 2012). At 4 and 5 days post-transfection, the cells were collected and frozen at -80°C until protein isolation was undertaken (Fig. 6a).

Statistical Analysis

Results are expressed as mean \pm standard error of the mean (SEM). A one-way analysis of variance (ANOVA) test (or the Kruskal–Wallis test when data were not normally distributed) was conducted, followed by Dunnett's post hoc analysis (or the Mann–Whitney test when data were not normally distributed) to compare each of the time points analysed post-pMCAO with the control group mean. Comparison between groups of the siRNA transfection experiment was made by the Student's unpaired t test. A p value < 0.05 was considered statistically significant (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, # $p < 0.001$). Statistical analysis was performed using the 11.5.0 version of SPSS software (SPSS Inc).

Acknowledgments This work was partially supported by the Centre d'Innovació i Desenvolupament Empresarial (CIDEM) of the Generalitat de Catalunya (Grant No. RDITSCON07-1-0006), Grupo Ferrer Internacional SA, Spanish Ministry of Science and Innovation and the European Regional Development Fund (ERDF) (PROFIT Grant No. CIT 090000-20008-11), Institut de Salut Carlos III (ISCIII) Grant Nos. FIS-PI070322, and ISCIII retics-RENEVAS-RD06/0026/0005 and RD07/0026/2002. Finally, thanks to Andrew Hughes for the linguistic revision of the manuscript.

Conflict of interest The authors (Susanna Camo's, Carme Gubern, Mónica Sobrado, Rocío Rodríguez, Víctor G Romera, María Ángeles Moro, Ignacio Lizasoain, Joaquín Serena, Judith Mallolas, and Mar Castellanos) declare that they have no conflict of interest.

References

- Agarwal, P., Verzi, M. P., Nguyen, T., Hu, J., Ehlers, M. L., McCulley, D. J., et al. (2011). The MADS box transcription factor MEF2C regulates melanocyte development and is a direct transcriptional target and partner of SOX10. *Development*, 138, 2555–2565.
- Andersen, B., & Rosenfeld, M. G. (2001). POU domain factors in the neuroendocrine system: Lessons from developmental biology provide insights into human disease. *Endocrine Reviews*, 22, 2–35.
- Annweiler, A., Zwilling, S., & Wirth, T. (1994). Functional differences between the Oct2 transactivation domains determine the transactivation potential of individual Oct2 isoforms. *Nucleic Acids Research*, 22, 4250–4258.
- Arce, C., Diaz-Castroverde, S., Canales, M. J., Marco-Contelles, J., Samadi, A., Oset-Gasque, M. J., et al. (2012). Drugs for stroke: action of nitron (Z)-N-(2-bromo-5-hydroxy-4-methoxybenzylidene)-2-methylpropan-2-amine oxide on rat cortical neurons in culture subjected to oxygen-glucose-deprivation. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 55, 475–479.
- Baranova, O., Miranda, L. F., Pichiule, P., Dragatsis, I., Johnson, R. S., & Chavez, J. C. (2007). Neuron-specific inactivation of the hypoxia inducible factor 1 alpha increases brain injury in a mouse model of transient focal cerebral ischemia. *Journal of Neuroscience*, 27, 6320–6332.

- Boutet, S. C., Quertermous, T., & Fadel, B. M. (2001). Identification of an octamer element required for in vivo expression of the TIE1 gene in endothelial cells. *Biochemistry Journal*, 360, 23–29.
- Chen, S. T., Hsu, C. Y., Hogan, E. L., Maricq, H., & Balentine, J. D. (1986). A model of focal ischemic stroke in the rat: Reproducible extensive cortical infarction. *Stroke*, 17, 738–743.
- Chen, J., Willingham, T., Margraf, L. R., Schreiber-Agus, N., DePinho, R. A., & Nisen, P. D. (1995). Effects of the MYC oncogene antagonist, MAD, on proliferation, cell cycling and the malignant phenotype of human brain tumour cells. *Nature Medicine*, 1, 638–643.
- Chenna, R., Sugawara, H., Koike, T., Lopez, R., Gibson, T. J., Higgins, D. G., et al. (2003). Multiple sequence alignment with the Clustal series of programs. *Nucleic Acids Research*, 31, 3497–3500.
- Chopp, M., Zhang, Z. G., & Jiang, Q. (2007). Neurogenesis, angiogenesis, and MRI indices of functional recovery from stroke. *Stroke*, 38, 827–831.
- Chopp, M., Li, Y., & Zhang, J. (2008). Plasticity and remodeling of brain. *Journal of the Neurological Sciences*, 265, 97–101.
- ClustalW2. <http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>. 2010.
- Collino, M., Patel, N. S., & Thiemermann, C. (2008). PPARs as new therapeutic targets for the treatment of cerebral ischemia/reperfusion injury. *Therapeutic Advances in Cardiovascular Disease*, 2, 179–197.
- Corcoran, L. M., Koentgen, F., Dietrich, W., Veale, M., & Humbert, P. O. (2004). All known in vivo functions of the Oct-2 transcription factor require the C-terminal protein domain. *The Journal of Immunology*, 172, 2962–2969.
- Crack, P. J., & Taylor, J. M. (2005). Reactive oxygen species and the modulation of stroke. *Free Radical Biology & Medicine*, 38, 1433–1444.
- Custom TaqMan[®] Assay Design Tool. <https://www5.appliedbiosystems.com/tools/cadt/>. 13-10-2009a.
- Deans, Z., Dawson, S. J., Buttery, L., Polak, J. M., Wallace, D., & Latchman, D. S. (1995). Direct evidence that the POU family transcription factor Oct-2 represses the cellular tyrosine hydroxylase gene in neuronal cells. *Journal of Molecular Neuroscience*, 6, 159–167.
- Deans, Z. C., Dawson, S. J., Kilimann, M. W., Wallace, D., Wilson, M. C., & Latchman, D. S. (1997). Differential regulation of genes encoding synaptic proteins by the Oct-2 transcription factor. *Molecular Brain Research*, 51, 1–7.
- Dent, C. L., Lillycrop, K. A., Estridge, J. K., Thomas, N. S., & Latchman, D. S. (1991). The B-cell and neuronal forms of the octamer-binding protein Oct-2 differ in ADN-binding specificity and functional activity. *Molecular and Cellular Biology*, 11, 3925–3930.
- Expert Protein Analysis System, Swiss Institute of Bioinformatics. http://www.expasy.ch/tools/pi_tool.html. 9-1-2006.
- Ensembl. <http://www.ensembl.org/index.html>. 2009b.
- Fisher, M., Feuerstein, G., Howells, D. W., Hurn, P. D., Kent, T. A., Savitz, S. I., et al. (2009). Update of the stroke therapy academic industry roundtable preclinical recommendations. *Stroke*, 40, 2244–2250.
- Ford, G., Xu, Z., Gates, A., Jiang, J., & Ford, B. D. (2006). Expression Analysis Systematic Explorer (EASE) analysis reveals differential gene expression in permanent and transient focal stroke rat models. *Brain Research*, 1071, 226–236.
- Giaginis, C., Klonaris, C., Katsargyris, A., Kouraklis, G., Spiliopoulou, C., & Theocharis, S. (2011). Correlation of peroxisome proliferator-Activated Receptor-gamma (PPAR-gamma) and Retinoid X Receptor-alpha (RXR-alpha) expression with clinical risk factors in patients with advanced carotid atherosclerosis. *Medical Science Monitor*, 17, CR381–CR391.
- Gubern, C., Hurtado, O., Rodriguez, R., Morales, J. R., Romera, V. G., Moro, M. A., et al. (2009). Validation of housekeeping genes for quantitative real-time PCR in vivo and in vitro models of cerebral ischaemia. *BMC Molecular Biology*, 10, 57.
- Gwag, B. J., Lobner, D., Koh, J. Y., Wie, M. B., & Choi, D. W. (1995). Blockade of glutamate receptors unmasks neuronal apoptosis after oxygen-glucose deprivation in vitro. *Neuroscience*, 68, 615–619.
- Hansmann, G., de, J. P., V, Alastalo, T. P., Alvira, C. M., Guignabert, C., Bekker, J. M., Schellong, S., Urashima, T., Wang, L., Morrell, N. W., Rabinovitch, M. (2008). An antiproliferative BMP-2/PPARgamma/apoE axis in human and murine SMCs and its role in pulmonary hypertension. *The Journal of Clinical Investigation*, 118, 1846–1857.
- Hatzopoulos, A. K., Stoykova, A. S., Erselius, J. R., Goulding, M., Neuman, T., & Gruss, P. (1990). Structure and expression of the mouse Oct2a and Oct2b, two differentially spliced products of the same gene. *Development*, 109, 349–362.
- He, X., Treacy, M. N., Simmons, D. M., Ingraham, H. A., Swanson, L. W., & Rosenfeld, M. G. (1989). Expression of a large family of POU-domain regulatory genes in mammalian brain development. *Nature*, 340, 35–41.
- Heckman, C. A., Duan, H., Garcia, P. B., & Boxer, L. M. (2006). Oct transcription factors mediate t(14; 18) lymphoma cell survival by directly regulating bcl-2 expression. *Oncogene*, 25, 888–898.
- Hossmann, K. A. & Traystman, R. J. (2009). Cerebral blood flow and the ischemic penumbra. In M. Fisher (Ed.), *Stroke, Part I* (pp. 67–92).
- Hubbard, T. J., Aken, B. L., Ayling, S., Ballester, B., Beal, K., Bragin, E., et al. (2009). Ensembl 2009. *Nucleic Acids Research*, 37, D690–D697.
- Hurtado, O., Moro, M. A., Cardenas, A., Sanchez, V., Fernandez-Tome, P., Leza, J. C., et al. (2005). Neuroprotection afforded by prior citicoline administration in experimental brain ischemia: effects on glutamate transport. *Neurobiology of Diseases*, 18, 336–345.
- Ikeshima, H., Imai, S., Shimoda, K., Hata, J., & Takano, T. (1995). Expression of a MADS box gene, MEF2D, in neurons of the mouse central nervous system: implication of its binary function in myogenic and neurogenic cell lineages. *Neuroscience Letters*, 200, 117–120.
- Kemp, L. M., Dent, C. L., & Latchman, D. S. (1990). Octamer motif mediates transcriptional repression of HSV immediate-early genes and octamer-containing cellular promoters in neuronal cells. *Neuron*, 4, 215–222.
- Kim, D. H., Zhao, X., Tu, C. H., Casaccia-Bonneli, P., & Chao, M. V. (2004). Prevention of apoptotic but not necrotic cell death following neuronal injury by neurotrophins signaling through the tyrosine kinase receptor. *Journal of Neurosurgery*, 100, 79–87.
- Kitagawa, K., Sasaki, T., Terasaki, Y., Yagita, Y., & Mochizuki, H. (2012). CREB activation is a key player for ischemic tolerance in the brain. *Rinsho Shinkeigaku*, 52, 904–907.
- Koh, J. Y., & Choi, D. W. (1987). Quantitative determination of glutamate mediated cortical neuronal injury in cell culture by lactate dehydrogenase efflux assay 1. *Journal of Neuroscience Methods*, 20, 83–90.
- Kristie, T. M., & Sharp, P. A. (1990). Interactions of the Oct-1 POU subdomains with specific ADN sequences and with the HSV alpha-trans-activator protein. *Genes & Development*, 4, 2383–2396.
- Latchman, D. S. (1996a). Activation and repression of gene expression by POU family transcription factors. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 351, 511–515.
- Latchman, D. S. (1996b). The Oct-2 transcription factor. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 28, 1081–1083.

- Lee, S. H., & Mouradian, M. M. (1999). Up-regulation of D1A dopamine receptor gene transcription by estrogen. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 156, 151–157.
- Lelievre, E., Lionneton, F., Soncin, F., & Vandenbunder, B. (2001). The Ets family contains transcriptional activators and repressors involved in angiogenesis. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 33, 391–407.
- Li, L., Zhang, X., Cui, L., Wang, L., Liu, H., Ji, H., et al. (2013). Ursolic acid promotes the neuroprotection by activating Nrf2 pathway after cerebral ischemia in mice. *Brain Research*, 1497, 32–39.
- Lillycrop, K. A., & Latchman, D. S. (1992). Alternative splicing of the Oct-2 transcription factor RNA is differentially regulated in neuronal cells and B cells and results in protein isoforms with opposite effects on the activity of octamer/TAATGARAT-containing promoters. *Journal of Biological Chemistry*, 267, 24960–24965.
- Lillycrop, K. A., Dent, C. L., Wheatley, S. C., Beech, M. N., Ninkina, N. N., Wood, J. N., et al. (1991). The octamer-binding protein Oct-2 represses HSV immediate-early genes in cell lines derived from latently infectable sensory neurons. *Neuron*, 7, 381–390.
- Lillycrop, K. A., Estridge, J. K., & Latchman, D. S. (1994). Functional interaction between different isoforms of the Oct-2 transcription factor expressed in neuronal cells. *Biochemistry Journal*, 298(Pt 1), 245–248.
- Liu, T. H., Beckman, J. S., Freeman, B. A., Hogan, E. L., & Hsu, C. Y. (1989). Polyethylene glycol-conjugated superoxide dismutase and catalase reduce ischemic brain injury. *American Journal of Physiology*, 256, H589–H593.
- Liu, Y. Z., Lillycrop, K. A., & Latchman, D. S. (1995). Regulated splicing of the Oct-2 transcription factor RNA in neuronal cells. *Neuroscience Letters*, 183, 8–12.
- Lobner, D. (2000). Comparison of the LDH and MTT assays for quantifying cell death: validity for neuronal apoptosis? *Journal of Neuroscience Methods*, 96, 147–152.
- Mallolas, J., Hurtado, O., Castellanos, M., Blanco, M., Sobrino, T., Serena, J., et al. (2006). A polymorphism in the EAAT2 promoter is associated with higher glutamate concentrations and higher frequency of progressing stroke. *Journal of Experimental Medicine*, 203, 711–717.
- Martinez, E. (2002). Multi-protein complexes in eukaryotic gene transcription. *Plant Molecular Biology*, 50, 925–947.
- Mathisen, G. H., Fallgren, A. B., Strom, B. O., Boldingh Debernard, K. A., Mohebi, B. U., & Paulsen, R. E. (2011). Delayed translocation of NGFI-B/RXR in glutamate stimulated neurons allows late protection by 9-cis retinoic acid. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 414, 90–95.
- Nadareishvili, Z., & Hallenbeck, J. (2003). Neuronal regeneration after stroke. *The New England Journal of Medicine*, 348, 2355–2356.
- Naya, F. J., Wu, C., Richardson, J. A., Overbeek, P., & Olson, E. N. (1999). Transcriptional activity of MEF2 during mouse embryogenesis monitored with a MEF2-dependent transgene. *Development*, 126, 2045–2052.
- Pan, L. N., Zhu, W., Li, C., Xu, X. L., Guo, L. J., & Lu, Q. (2012). Toll-like receptor 3 agonist Poly I: C protects against simulated cerebral ischemia in vitro and in vivo. *Acta Pharmacologica Sinica*, 33, 1246–1253.
- Phillips, K., & Luisi, B. (2000). The virtuoso of versatility: POU proteins that flex to fit. *Journal of Molecular Biology*, 302, 1023–1039.
- Pulliam, J. V., Xu, Z., Ford, G. D., Liu, C., Li, Y., Stovall, K. C., et al. (2013). Computational identification of conserved transcription factor binding sites upstream of genes induced in rat brain by transient focal ischemic stroke. *Brain Research*, 1495, 76–85. Primer3. <http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>. 22-7-2009c.
- Qin, Z. H., Wang, Y., Nakai, M., & Chase, T. N. (1998). Nuclear factor-kappa B contributes to excitotoxin-induced apoptosis in rat striatum. *Molecular Pharmacology*, 53, 33–42.
- Qin, J., Li, M. J., Wang, P., Zhang, M. Q., & Wang, J. (2011). ChIP-Array: combinatory analysis of ChIP-seq/chip and microarray gene expression data to discover direct/indirect targets of a transcription factor. *Nucleic Acids Research*, 39, W430–W436.
- Raivich, G. (2011). Transcribing the path to neurological recovery—From early signals through transcription factors to downstream effectors of successful regeneration. *Annals of Anatomy-Anatomischer Anzeiger*, 193, 248–258.
- Rodriguez-Mercado, R., Ford, G. D., Xu, Z., Kraiselburd, E. N., Martinez, M. I., Eterovic, V. A., et al. (2012). Acute neuronal injury and blood genomic profiles in a nonhuman primate model for ischemic stroke. *Comparative Medicine*, 62, 427–438.
- Romera, C., Hurtado, O., Botella, S. H., Lizasoain, I., Cardenas, A., Fernandez-Tome, P., et al. (2004). In vitro ischemic tolerance involves upregulation of glutamate transport partly mediated by the TACE/ADAM17-tumor necrosis factor-alpha pathway. *Journal of Neuroscience*, 24, 1350–1357.
- Sato, Y., Teruyama, K., Nakano, T., Oda, N., Abe, M., Tanaka, K., et al. (2001). Role of transcription factors in angiogenesis: Ets-1 promotes angiogenesis as well as endothelial apoptosis. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 947, 117–123.
- Scholer, H. R., Hatzopoulos, A. K., Balling, R., Suzuki, N., & Gruss, P. (1989). A family of octamer-specific proteins present during mouse embryogenesis: evidence for germline-specific expression of an Oct factor. *EMBO Journal*, 8, 2543–2550.
- Schreiber, E., Harshman, K., Kemler, I., Malipiero, U., Schaffner, W., & Fontana, A. (1990). Astrocytes and glioblastoma cells express novel octamer-ADN binding proteins distinct from the ubiquitous Oct-1 and B cell type Oct-2 proteins. *Nucleic Acids Research*, 18, 5495–5503.
- Shurin, G. V., Ferris, R. L., Tourkova, I. L., Perez, L., Lokshin, A., Balkir, L., et al. (2005). Loss of new chemokine CXCL14 in tumor tissue is associated with low infiltration by dendritic cells (DC), while restoration of human CXCL14 expression in tumor cells causes attraction of DC both in vitro and in vivo. *The Journal of Immunology*, 174, 5490–5498.
- Singh, H., Sen, R., Baltimore, D., & Sharp, P. A. (1986). A nuclear factor that binds to a conserved sequence motif in transcriptional control elements of immunoglobulin genes. *Nature*, 319, 154–158.
- Singh, N., Sharma, G., & Mishra, V. (2012). Hypoxia inducible factor-1: Its potential role in cerebral ischemia. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 32, 491–507.
- Sobrado, M., Lopez, M. G., Carceller, F., Garcia, A. G., & Roda, J. M. (2003). Combined nimodipine and citicoline reduce infarct size, attenuate apoptosis and increase bcl-2 expression after focal cerebral ischemia. *Neuroscience*, 118, 107–113.
- Sobrado, M., Pereira, M. P., Ballesteros, I., Hurtado, O., Fernandez-Lopez, D., Pradillo, J. M., et al. (2009). Synthesis of lipoxin A4 by 5-lipoxygenase mediates PPARgamma-dependent, neuroprotective effects of rosiglitazone in experimental stroke. *Journal of Neuroscience*, 29, 3875–3884.
- Sobrado, M., Delgado, M., Fernandez-Valle, E., Garcia-Garcia, L., Torres, M., Sanchez-Prieto, J., et al. (2011). Longitudinal studies of ischemic penumbra by using 18F-FDG PET and MRI techniques in permanent and transient focal cerebral ischemia in rats. *Neuroimage*, 57, 45–54.
- Staudt, L. M., Clerc, R. G., Singh, H., LeBowitz, J. H., Sharp, P. A., & Baltimore, D. (1988). Cloning of a lymphoid-specific ADNc encoding a protein binding the regulatory octamer ADN motif. *Science*, 241, 577–580.
- Stoykova, A. S., Sterrer, S., Erselius, J. R., Hatzopoulos, A. K., & Gruss, P. (1992). Mini-Oct and Oct-2c: two novel, functionally

- diverse murine Oct-2 gene products are differentially expressed in the CNS. *Neuron*, 8, 541–558.
- Tancheva, T., & Panov, I. R. (2008). Intracerebral development of transplanted glioblastoma C6 cells in rats after preliminary exposure to neuropeptides and an MAPK inhibitor. *Neuroscience and Behavioral Physiology*, 38, 913–916.
- Thoresen, M., Liu, X., Jary, S., Brown, E., Sabir, H., Stone, J., et al., (2012). Lactate dehydrogenase in hypothermia-treated newborn infants with hypoxic-ischaemic encephalopathy. *Acta Paediatrica*, 101, 1038–1044.
- Wang, Y. D., Cai, N., Wu, X. L., Cao, H. Z., Xie, L. L., & Zheng, P. S. (2013). OCT4 promotes tumorigenesis and inhibits apoptosis of cervical cancer cells by miR-125b/BAK1 pathway. *Cell Death & Disease*, 4, e760.
- Wirth, T., Priess, A., Annweiler, A., Zwilling, S., & Oeler, B. (1991). Multiple Oct2 isoforms are generated by alternative splicing. *Nucleic Acids Research*, 19, 43–51.
- Wood, J. N., Lillycrop, K. A., Dent, C. L., Ninkina, N. N., Beech, M. M., Willoughby, J. J., et al., (1992). Regulation of expression of the neuronal POU protein Oct-2 by nerve growth factor. *Journal of Biological Chemistry*, 267, 17787–17791.
- Xie, R., Li, X., Ling, Y., Shen, C., Wu, X., Xu, W., et al., (2012). Alpha-lipoic acid pre- and post-treatments provide protection against in vitro ischemia-reperfusion injury in cerebral endothelial cells via Akt/mTOR signaling. *Brain Research*, 1482, 81–90.
- Xu, Z., Ford, G. D., Croslan, D. R., Jiang, J., Gates, A., Allen, R., et al., (2005). Neuroprotection by neuregulin-1 following focal stroke is associated with the attenuation of ischemia-induced pro-inflammatory and stress gene expression. *Neurobiology of Diseases*, 19, 461–470.
- Zhang, C., Wu, H., Zhu, X., Wang, Y., & Guo, J. (2011). Role of transcription factors in neurogenesis after cerebral ischemia. *Reviews in the Neurosciences*, 22, 457–465.
- Zhang, Y., Huang, S., Wang, B., Sun, B., Li, W., Lu, X., et al., (2012). Atorvastatin and whisker stimulation synergistically enhance angiogenesis in the barrel cortex of rats following focal ischemia. *Neuroscience Letters*, 525, 135–139.

THE HIGH-MOBILITY GROUP I-Y TRANSCRIPTION FACTOR IS INVOLVED IN CEREBRAL ISCHEMIA AND MODULATES THE EXPRESSION OF ANGIOGENIC PROTEINS

S. CAMÓS,^{a,*} C. GUBERN,^a M. SOBRADO,^b
R. RODRÍGUEZ,^a V. G. ROMERA,^b M. A. MORO,^b
I. LIZASOAIN,^b J. SERENA,^a J. MALLOLAS^{a,*} AND
M. CASTELLANOS^a

^a Institut d'Investigació Biomèdica de Girona (IdIBGi), Grup Cerebrovascular – Servei de Neurologia, Hospital Universitari de Girona Dr. Josep Trueta, Av. França s/n. 17007, Girona, Spain

^b Unidad Neurovascular, Departamento de Farmacología, Facultad de Medicina, Universidad Complutense de Madrid (UCM), and Instituto de Investigación Hospital 12 de Octubre (i+12), Avenida Complutense s/n, 28040 Madrid, Spain

Abstract—The present study aims to identify transcription factors (TFs) contributing to angiogenesis, a mechanism involved in giving plasticity to the brain, as potential therapeutic targets after cerebral ischemia. The promoter sequences from candidate genes involved in angiogenesis were submitted to a comparative analysis by bioinformatics software. High-mobility group I-Y protein (HMGIY) TF characterization in a rat permanent focal cerebral ischemia model was performed by quantitative real time polymerase chain reaction and Western blot for the TF expression profile study. The TF functional study was carried out using a TF–TF interaction array and gene silencing by siRNA in rat brain microvascular endothelial cells. The results showed that the promoters shared a common TF binding site for HMGIY. The expression profile analysis in ischemic rat brain showed an increase in HMGIY mRNA in the acute phase and a progressive overexpression of protein over time post-ischemia. The interaction array analysis revealed that ischemia promotes the interaction of HMGIY with TFs involved in different cerebral plasticity processes. In vitro knockdown studies showed that angiopoietin 1 and vascular endothelial growth factor expression is controlled by HMGIY and that this TF is involved in cell survival in brain endothelial cells.

*Corresponding authors. Tel: +34-972-94-02-00x2262.

E-mail addresses: su.camosbadia@gmail.com (S. Camós), judithmallolas@cofigi.org (J. Mallolas).

Present address: Servicio de Neurología, Instituto de Investigación Sanitaria, Hospital Universitario La Princesa, C/ Diego de León, 62, 28006 Madrid, Spain.

^a Senior authors.

Abbreviations: ANGPT-1, angiopoietin 1; CCA, common carotid arteries; ChIP, chromatin immunoprecipitation; DAPI, 4',6-diamidino-2-phenylindole; GFAP, glial fibrillary acidic protein; HMGIY/HMGA1, high-mobility group I-Y protein; MTT, 3-(4,5-dimethylthiazol)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide; NeuN, neuronal nuclei; PBS, phosphate-buffered saline; pMCAO, permanent middle cerebral artery occlusion; RBMVEC, rat brain microvascular endothelial cells; RECA-1, rat endothelial cell antigen 1; TF, transcription factor; TFBS, transcription factor binding site; tMCAO, transient middle cerebral artery occlusion; VEGF, vascular endothelial growth factor.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroscience.2014.03.036>

0306-4522/Ó 2014 IBRO. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

These findings suggest that HMGIY is a potential therapeutic target that could promote brain repair functions after stroke. Ó 2014 IBRO. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

Key words: HMGIY, transcription factor, angiogenesis, cerebral ischemia, brain plasticity, brain microvascular endothelial cells.

INTRODUCTION

Despite the discovery of several promising neuroprotective therapies in rodent models of stroke, no therapy other than fibrinolytics has been found to be effective in human clinical trials (Durukan and Tatlisumak, 2007). To address this shortfall in our knowledge, the therapeutic strategy of stroke research has recently been focused on the study of molecular processes involved in brain plasticity in order to reveal the underlying biological bases. Knowledge of these mechanisms could suggest useful therapeutic tools to promote endogenous cerebral repair after brain ischemic damage.

Angiogenesis is a key restorative mechanism in response to ischemia in several non-central nervous system tissues. Autopsy studies have revealed that angiogenesis is partially stimulated in brain ischemia via the hypoxia-inducible factor (HIF) pathways (Krupinski et al., 1994). Although it might seem obvious that a pro-angiogenic therapy in stroke would be beneficial the consequences of such a therapeutic orientation is still unclear. Krupinski et al., demonstrated that the number of new vessels in ischemic penumbral regions correlated with longer survival in ischemic stroke patients, suggesting that active angiogenesis might be beneficial for the ischemic brain (Krupinski et al., 1993). Manoonkittiwongsa et al., found that microvessel density only increased in the ischemic margin adjacent to areas of pan-necrosis and that it was always associated with increased numbers of macrophages. Ischemic brain areas without macrophages displayed no vascular changes, suggesting that ischemia-induced microvessels are formed to facilitate macrophage infiltration and the removal of necrotic brain (Manoonkittiwongsa et al., 2001). Neurovascular remodeling is a key component of recovery after stroke. It is increasingly recognized that neuronal plasticity is

dependent on vascular support. Over the past few years, complex mechanisms underlying these endogenous responses in damaged brain parenchyma have increasingly been identified (Navaratna et al., 2009).

Different signaling pathways are initiated in response to ischemia, leading to inflammation, apoptosis, angiogenesis and surveillance (Torregrosa, 2012), which are tightly regulated by a network of different molecules, usually proteins, called transcription factors (TFs). These gene expression modulators do not function in a vacuum but rather interact and cooperate with other transcriptional regulators, components of the general transcriptional machinery, and chromatin-modifying factors (Wu et al., 2010). Detailed study of the transcriptional network will facilitate a more complete understanding of how specific factors regulate the complex angiogenic process in conditions of cerebral ischemia, and better understanding of these pathways should lead to the design of therapies that are specifically aimed at promoting angiogenesis (Navaratna et al., 2009). The present study aims to identify TFs involved in this endogenous therapeutic mechanism in the context of cerebral ischemia. After performing a bioinformatics analysis, we focused the study on the high-mobility group I-Y (HMG1Y or HMGA1) TF.

The HMG1Y protein belongs to family A (characterized for containing basic ADN-binding domains termed “AT-hooks”), which comprizes four members coded by two genes (HMGA1 and HMGA2) (Fedele et al., 2001; Reeves, 2001; Hock et al., 2007; Catez and Hock, 2010; Maasch et al., 2010). HMGAs are ubiquitous nuclear proteins that bind to ADN and induce structural changes in the chromatin fibers and nucleosome, which regulate the expression of numerous genes *in vivo* (Reeves, 2001; Hock et al., 2007). They function in the cell as highly connected ‘nodes’ of protein–ADN and protein–protein interactions that influence a diverse array of normal biological processes including growth, proliferation, differentiation, and death (Reeves, 2001; Gerlitz et al., 2009). HMGA are relatively abundant proteins in undifferentiated and proliferating cells of early embryos and undetectable in fully differentiated cells (Hock et al., 2007). Likewise, they participate in pathological processes acting as regulators of viral gene transcription and promoting tumor progression and metastasis when overexpressed in cells. High constitutive HMGA protein levels are among the most consistent features observed in all types of cancers and greater concentrations correlate with increased malignancy (Reeves, 2001; Gerlitz et al., 2009). In the present study we characterize for the first time the HMG1Y TF in rat cerebral ischemia and explore its potential angiogenic function *in vitro*.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Bioinformatics analysis

In order to detect TFs involved in angiogenesis, several genes involved in different processes that promote or inhibit the angiogenic response were selected using the PubMed database as candidate genes. The promoter

sequence from the candidate genes was obtained and submitted to bioinformatics analysis in order to find common TF binding sites (TFBS) to identify transcriptional regulatory signals shared among the different co-expressed candidate genes. GenBank, Reference Sequence (RefSeq) and Protein Data Bank (PDB) were used to obtain the promoter nucleotide sequence of the candidate genes. PROMO software (version 3.0.2, Evolutionary Research Group from Universitat Pompeu Fabra and Universitat Politècnica de Catalunya) and TRANSFAC database (release 8.3, sponsored by BIOBASE, Beverly, Massachusetts, USA) were used to identify putative TFBS in the promoter of the candidate genes (Messeguer et al., 2002; Farre et al., 2003). PROMO is a virtual laboratory for the identification of putative TFBS in ADN sequences from a species or groups of species. The TRANSFAC database contains the largest available collection of eukaryotic factor-specific weight matrices, which can be used to search for potential matches in a ADN sequence of interest (Messeguer et al., 2002). A new version of the PROMO software, which allows two or more promoter sequences to be compared, and Mpromodb bioinformatics software have been used to find common TFBS among the selected genes and identify common transcriptional regulation signals among the co-expressed candidate genes (Chenna et al., 2003).

In vivo cerebral ischemia models

All procedures were approved by the Committee of Animal Care of the Universidad Complutense of Madrid in accordance with European Union regulations (86/609/CEE) and Spanish legislation (RD223/88).

The experiments were performed on adult male Fischer rats (250–300 g body weight; Harlan). Animals were housed individually under standard conditions of temperature and humidity and a 12-h light/dark cycle (lights on at 08:00) with free access to food and water. Rats were anesthetized with isoflurane 1.5–2% with a mixture of 70% nitrogen/30% oxygen. Body temperature was maintained at physiological levels with a heating pad during the surgical procedure and recovery from anesthesia.

Two cerebral ischemia models were used in the present study. The transient middle cerebral artery occlusion (tMCAO) model was performed according to a previously reported three-vessel occlusion model (Chen et al., 1986; Liu et al., 1989; Sobrado et al., 2003). After 90 min of distal occlusion of the left MCA and both common carotid arteries (CCA), the three arteries were opened and complete reperfusion was observed under an operating microscope. Transient MCAO rats were sacrificed at 6 h and 14 days after reperfusion ($n = 3$ in each group). Brains were removed and cortical ipsilesional core, ipsilesional peri-infarct and ipsilesional non-damaged tissue, as well as contralesional cortex tissue were collected at each period of time. The ischemic core was defined as the cortical tissue surrounding the occluded MCA that differed from the adjacent tissue consistency and by the conditions

described by Sobrado et al., (2011). The peri-infarct tissue was identified as the cortical tissue immediately adjacent to the core and based on average images (apparent diffusion coefficient, ADC; and cerebral blood flow, CBF) according to Sobrado et al., (2011). Samples were immediately frozen at -80°C until nuclear extract isolation.

Permanent middle cerebral artery occlusion (pMCAO) was induced following a previously described method (Hurtado et al., 2005; Mallolas et al., 2006). Briefly, permanent focal cerebral ischemia was induced by ligation of the left CCA and occlusion of the ipsilateral distal MCA. Brains were removed and cortical ischemic tissue around the MCA territory was collected from the pMCAO animals at 30 min, 2, 6, 24 and 72 h and 7 and 14 days after occlusion ($n = 6$ in each group). Samples were divided into two and frozen at -80°C until RNA and protein isolation was undertaken.

Likewise, control samples from healthy animals were also collected in order to perform the gene expression analysis, the protein study and the TF–TF interaction array.

Rat brain microvascular endothelial cells (RBMVEC) culture

RBMVEC (Cell Applications, San Diego, California, USA) from passage 6 to 8 were used in the different experiments and conventionally cultured with Rat Brain Endothelial Cell Growth medium (Cell Applications) supplemented with Rat Brain Endothelial Cell Growth supplement (Cell Applications) and 2% penicillin/streptomycin (5000 UI/ml; 5000 $\mu\text{g}/\text{ml}$) (Invitrogen, Life Technologies, Grand Island, New York, USA). RBMVEC were seeded in six-well plates (Cultek, Madrid, Spain) previously coated with Cell Attachment (Cell Applications) at 200,000 cells/well for the mRNA and protein expression study, for the migration and invasion assay after HMG1Y siRNA transfection. For the analysis of cell viability by 3-(4,5-dimethylthiazol)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) after knockdown experiments, RBMVEC were seeded in 96-well plates (Cultek) at a density of 6000 cells/well previously coated with Cell Attachment.

HMG1Y expression analysis

HMG1Y expression analysis of mRNA and protein was performed in pMCAO rat brain and RBMVEC samples.

RNA extraction, quantification and retrotranscription. RNA extraction was undertaken from rat brain tissue (submitted to pMCAO) and from RBMVEC (siRNA transfected). Qiazol lysis reagent (Qiagen, Hilden, Germany) was immediately transferred to cerebral cortex frozen samples and then homogenized using an Ultra-Turrax T25 homogeniser. Qiazol lysis reagent was directly transferred to the wells of cultures previously seeded in six-well plates and cells were lysed with the help of a scraper (Cultek). RNA extraction from rat brain tissue and cell culture was performed with the RNeasy^o Lipid Tissue Mini Kit (Qiagen) and miRNeasy

Mini kit (Qiagen), respectively. Total RNA was quantified using a spectrophotometer (BioNova Científica, Barcelona, Spain) at 260 nm (A_{260}) and purity was estimated by an A_{260}/A_{280} ratio >1.8 . The integrity and amount of RNA were verified by visualization of rRNAs after electrophoresis in agarose gel. After RNA quantification and purity estimation, reverse transcription using a High-Capacity ADNc Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Life Technologies, Grand Island, New York, USA) was performed as previously described (Gubern et al., 2009). Two independent retrotranscription reactions were performed for all samples.

Quantitative real time polymerase chain reaction (qPCR). Expression analysis of HMG1Y, angiopoietin 1 (ANGPT-1) and vascular endothelial growth factor (VEGF) transcripts and reference genes was conducted in pMCAO rat brain tissue and siRNA-transfected RBMVEC samples, using qPCR and the $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ and $2^{-\Delta\text{Ct}}$ methods (Livak and Schmittgen, 2001). Specific TaqMan[™] Gene Expression Assays and TaqMan[™] Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems) were used to analyse the different genes and housekeeping genes. Ywhaz, Sdha and Hprt were used as reference genes for expression data normalization of rat brain tissue and RBMVEC samples as previously described (Gubern et al., 2009). Reactions were run ($n = 3$) in an ABI PRISM 7000 Instrument (Applied Biosystems). 7000 System Software v1.2.3 (Applied Biosystems) was used to perform qPCR and for further analysis of the data obtained.

Protein extraction and quantification. Frozen cerebral cortex samples from pMCAO rats were homogenized by sonication during 10–12 s and using a homogenization buffer containing 0.1% Nonidet P40, a protease inhibitor cocktail (Roche, Basel, Swiss). RBMVEC transfected with HMG1Y siRNA and non-target siRNA were homogenized using a lysis buffer (Cell Signalling, Danvers, Massachusetts, USA) with phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) (1%), mixed with vortex every 5 min for 30 min while maintained in ice. Cortex and RBMVEC homogenized samples were then centrifuged (13,000g for 10 min at 4°C) and the supernatants (protein) were collected. Protein quantification was performed using a Protein Assay Kit (Bio-Rad, Hercules, California, USA) based on the Bradford's method in accordance with the manufacturer's instructions.

Western blot. Brain tissue homogenates from control and permanent ischemic (pMCAO) rats containing 60 μg of protein and lysates from siRNA-transfected RBMVEC containing 10 μg of protein were loaded and then size-separated in 10% sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis (SDS–PAGE) (90 mA) (Romera et al., 2004; Mallolas et al., 2006). The proteins were blotted onto a PVDF membrane (GE Healthcare, Little Chalfont, United Kingdom) and incubated with the specific rabbit polyclonal anti-HMG1Y antibody (Abcam, Cambridge, United Kingdom; ab4078;

1:1000), which can detect the HMG1a and HMG1b splice variants; the rabbit polyclonal anti-ANGPT-1 antibody (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, California, USA; sc-8357; 1:200) and the rabbit polyclonal anti-VEGF antibody (Santa Cruz Biotechnology, sc-507; 1:200). Proteins recognized by the antibodies were revealed with SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) or Immobilon Western (Millipore, Darmstadt, Germany) used in accordance with the manufacturer's instructions. b-Actin was used as the loading control.

HMG1Y brain localization study

Twenty-four hours after MCAO, rats ($n = 2$ for each group) were anesthetized, fixed and cryopreserved as previously reported. Brains were frozen and serials of 40- μ m-thick coronal sections were cut with a sliding microtome (Leica SM200R, Leica Biosystems, Wetzlar, Germany) and mounted on glass slides. Adjacent sections were then processed to perform immunofluorescence. The following primary antibodies were used: rabbit polyclonal anti-HMG1Y (Abcam; sc-4078; 1:250), mouse monoclonal anti-neuronal nuclei (NeuN) (Millipore, Darmstadt, Germany; MAB377; 1:100), mouse monoclonal anti-glial fibrillary acidic protein (GFAP) (Millipore; MAB3402; 1:500), and mouse monoclonal anti-rat endothelial cell antigen-1 (RECA-1) (Santa Cruz Biotechnology; sc-52665; 1:20;). Secondary antibody staining using Alexa Fluor 488/594 goat anti-rabbit/mouse IgGs (Invitrogen) and counterstaining using 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (Invitrogen) were performed following BD Biosciences protocols. Images were captured by different channels for Alexa Fluor 488 (pseudo-colored green), Alexa Fluor 594 (pseudo-colored red) and DAPI (pseudo-colored blue) on a BD Pathway 855 Bioimager System (BD Biosciences, Franklin Lakes, New Jersey, USA) with $\times 20$ objective (NA 075 Olympus). The z-stack application was used to obtain the images using BD Attovision software. Both acquisition and merging of images were carried out according to the recommended assay procedure using BD Attovision software.

HMG1Y interaction analysis

In order to assess the interactions of HMG1Y and determine the cellular processes it is involved in, a TranSignal TF–TF Array Kit version I (Panomics, Redwood City, California, USA) was used in accordance

with the manufacturer's instructions. This kit consists of a chromatin immunoprecipitation (ChIP)-array method, based on a combination of the ChIP and a high-throughput technique (array). These two techniques coupled together allow the active TFBS of a specific TF to be mapped efficiently. Moreover, combining array profiling and ChIP data allows more effective TFBS analysis for the study of the function of a TF (Qin et al., 2011).

Nuclear extracts were obtained from control and tMCAO (6 h and 14 days of reperfusion) rat brain samples ($n = 3$) using a Nuclear Extraction kit (Marligen Biosciences) in accordance with the manufacturer's instructions. 30 μ g of nuclear extracts were incubated with a cocktail of biotin-labeled double-strand ADN oligonucleotide probes (known TF-binding consensus sequences). Two micrograms of HMG1Y antibody (Abcam) was used to immunoprecipitate HMG1Y-associated TFs and their corresponding cis-elements. A control antibody (normal IgG; Santa Cruz Biotechnology) was used as a negative control. Different washing steps were then performed to eliminate free cis-elements and non-specific binding proteins. Finally, the bounded cis-elements were eluted and hybridized to the TranSignal Protein/ADN Array membranes, spotted with 54 different consensus ADN sequences, which are complementary to the known TF target sequences, TFBS. The symbols and complete name of the studied TFs are shown in Table 2. The membranes were revealed with the detection compounds from the kit and were used in accordance with the manufacturer's instructions. This array is a qualitative assay in which the spots indicate the presence or absence of the TF interaction. Therefore, the signal intensity of the array spots is not proportional to the amount of interaction, but it is proportional to the quality of the interactions (strong or weak). The experiment was performed in duplicate.

In vitro HMG1Y knockdown using small interfering RNA (siRNA)

RBMVEC were seeded (200,000 cells per well) in six-well plates (Cultek) previously coated with Cell Attachment (Cell Applications) and maintained in antibiotic-free medium for 24 h (RBMVEC growth basal medium supplemented with 5% FBS). RBMVEC were then transfected with a mixture containing basal medium, 3 μ l/well Dharmafect 4 (Dharmacon, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) and either

Table 1. Summary about the candidate genes that share a common TFBS for HMG1Y in their promoters, according to the bioinformatic analysis (results from the complete analysis are shown in Tables 4–9)

TFBS	Genes	Function
V\$HMG1Y	VEGF, ANGPT1, FGF2 RUNX2, HOXA9, MLLT7, HDAC1, EGR1 MEOX2, PPARG, EGR1 SMAD2, ID1, ID3, HOXA9, EGR1, GTF2I, HAND2, TAL1, HEY1	Endothelial cell surveillance Surveillance/cellular proliferation, endothelial cell differentiation and maturation Inflammatory genes modulation Cell surface receptors

Table 2. The symbol and complete name of the consensus ADN sequences (known TF target sequences, TFBS) analyzed by the TF-TF interaction array

TF symbol	TF name	TF symbol	TF name	TF symbol	TF name
AP-1, -2	Activator protein 1, 2	GRE	Growth response element	RAR(DR5)	Retinoid A receptor
ARE	AU-rich element	HMF-4	Hepatocyte nuclear factor 4	RXR(DR1)	Retinoid X receptor
Brn-3	Brain 3	IRF-1	Interferon regulatory factor 1	SIE	Sis-inducible element
C/EBP	CCAAT/enhancer binding protein	MEF-1,-2	Mads box transcription enhancer factor-1, -2	Smad3, 4	Smad transcription factor 3,4
CBF	Core binding factor	Myc-Max	Oncogene MYC and MYC-associated factor X	Smad SBE	Smad-binding element
CDP	CCAAT-displacement protein	NF-1	Neurofibromin	Sp1	Transcription factor Sp1
c-Myb	Avian myeloblastosis viral oncogene homolog	NFATC	Nuclear factor of activated T cells, cytoplasmic, calcineurin-dependent 1	SRE	Serum response element
CREB	cAMP response element-binding protein 1	NF-E1, -E2	Nuclear factor erythroid 1, 2	Stat1,3,4,5,6	Signal transducer and activator of transcription 1, 3, 4, 5, 6
E2F1	E2F transcription factor 1	NFKB	Nuclear factor kappa-B	TFIID	Transcription factor II D
EGR	Early growth response 1	Oct-1	Octamer 1	TR	Tomoregulin
ERE	Estrogen-responsive element	p53	Tumor protein p53	TR(DR4)	Tomoregulin (death receptor 4)
Ets	V-Ets avian erythroblastosis virus E26 oncogene homolog 1	Pax5	Paired box gene 5	USF-1	Upstream stimulatory factor 1
Ets/PEA3	Polyomavirus enhancer activator-3 (subfamily of Ets)	Pbx1	Pre-B-cell leukemia transcription factor	VDR(DR3)	Vitamin D receptor
FAST-1	Troponin c	Pit1	Pituitary-specific transcription factor 1	HSE	3-alpha-hydroxysteroid epimerase
GAS/ISRE	Gastrin/interferon-stimulated response element	PPAR	Peroxisome proliferator-activated receptor	MRE	Metal-responsive promoter elements
GATA	GATA-binding protein	PRE	Progesterone response element		

50 nM/well of non-targeting siRNA (Dharmacon) (negative control) or of ON-TARGETplus SMARTpool HMGIY siRNA (a mixture of four siRNA) (L-096760-02, Dharmacon). Twenty-four hours after siRNA transfection the medium was replaced by complete RBMVEC growth medium (supplemented with RBMVEC supplement and 2% P/S). The RBMVEC were maintained in culture until 4 and 5 days after transfection when the cells were collected and frozen at -80°C until protein isolation was undertaken. HMGIY knockdown in RBMVEC was expressed as a percentage of the value in the control cultures (non-target siRNA).

In vitro evaluation of HMGIY angiogenic function. The angiogenesis is a complex process which involves a variety of coordinated events, including degradation of the extracellular matrix surrounding the parent vessel (invasion ability), migration and proliferation of the endothelial and mural cells to assemble the new vessel, lumen formation, and construction of the mural cell layer of the vessel wall with associated pericytes and/or smooth muscle cells (Conway et al., 2001). In order to evaluate the HMGIY angiogenic function in vitro, cell viability, wound scratch (migration) and invasion assays were performed in RBMVEC.

Cell viability assay. As previously described, the viability of RBMVEC in proliferation was assessed with MTT assay (Sylvester, 2011) in order to compare control (non-target siRNA) and HMGIY siRNA-treated

cells. Five and six days after siRNA transfection, the medium was aspirated, 100 μl of fresh medium and 10 μl of MTT (5 mg/ml) (Sigma, St Louis, Missouri, USA) were added to each cell culture well. The 96-well plates were incubated at 37°C for 2.5 h. The medium was then carefully removed and formazan crystals were lysed in 100 μl DMSO by gently shaking the plate. Absorbance was measured at 570 nm using a plate reader (Spectra Max 340PC, BioNova Científica). Cell viability was expressed as a percentage of the value in the control cultures.

Wound scratch assay. Four days after siRNA treatment, RBMVEC were rinsed with phosphate-buffered saline (PBS) and starved in low-serum media (0.1% BSA) overnight. On the day of the assay (5 days after knockdown), the medium was aspirated and a red line was drawn with a marker on the bottom of the dish. Three separated wounds were scratched through the cells (moving perpendicularly to the line drawn) using a sterile 200 μl pipette tip. The removed cells were rinsed with PBS and replaced with media containing 5% FBS in order to promote cell migration. Twelve images were obtained from different plate zones for each group (HMGIY siRNA and non-target siRNA-treated cells) using a digital camera (Power Shot G6, Canon, Barcelona, España) to measure the wound width at different times (0, 24 and 72 h after the assay). Diminution in wound width over time was extrapolated to a migration phenomenon. Cell migration was expressed

Table 3. Candidate genes involved in brain angiogenesis processes, used for the bioinformatic study

Function	Candidate gene	Function	Candidate gene
Genes overexpressed in subventricular zone with angiogenic function after stroke	Akt1	Thymoma viral proto-oncogene 1	Inhibitors of angiogenesis PF4 Platelet factor 4
	Angpt2	Angiopoietin 2	TSP1 Cysteine-rich secretory protein 2
	Ctgf	Connective tissue growth factor	TGF-b1 Transforming growth factor beta 1
	Fgf1	Fibroblast growth factor 1	PAI-1 Plasminogen activator inhibitor, type 1
	Hgf	Hepatocyte growth factor	A2M Alpha-2-macroglobulin
	Notch4	Notch gene homolog	
	Ptgs1	Prostaglandin-endoperoxidase synthase 1	Transcription factors TAL1 T-cell acute lymphocytic leukemia 1
	TGFb3	Transforming growth factor, beta 3	involved in angiogenesis
	Vegfb	Vascular endothelial growth factor b	HAND1, 2 Heart- and neural crest derivatives-expressed 1
	Regulation of endothelial cells stimulation, apoptosis and surveillance	PAR 1	Protease-activated receptor-1
Birc5a		Survivin	HEY1, 2 Hairy/enhancer of split-related with YRPW
XIAP		X-linked inhibitor of apoptosis	SREBF1 Sterol regulatory element-binding motif 1,2
EPO		Erythropoietin	CREB1 cAMP response element-binding protein 1
VEGF		Vascular endothelial growth factor	FOSL1 Fos-like antigen 1
Angpt1		Angiopoietin 1	JUND Oncogene jun-D
PDGF		Platelet-derived growth factor	MEF2C Mads box transcription enhancer factor 2, polypeptide C
bFGF		Fibroblast growth factor, basic	SMAD5,4,3,2 Mothers against decapentaplegic, drosophila, homolog
TGFa, b		Transforming growth factor alfa, beta	STAT3 Signal transducer and activator of transcription 3
TNFa		Tumor necrosis factor alfa	
Endothelial cell adhesion and surveillance. Extracellular matrix proteins	HGF	Hepatocyte growth factor	NFATC2 Nuclear factor of activated T cells, cytoplasmic, calcineurin-dependent 2
	TIMP-2	Tissue inhibitor of metalloproteinase 2	
	IL-10	Interleukin 10	KLF2, 5 Kruppel-like factor 2, 5
	BCL-2	B-Cell CLL/Lymphoma-2	VEZF1 Vascular endothelial zinc finger 1
	BCLxL	Bcl2-related protein	EGR1 Early growth response 1
	COL4A3	Collagen, type IV, alpha-3	NR2F2 Nuclear receptor subfamily 2, group F, member 2
	LAMA4	Lamin, alpha 4	
	FN1	Fibronectin 1	PPARG Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma
	ELN	Elastin	HOXD3, B3, D10, A3, A9 MEOX2 Homeobox D3, B3, D10, A3, A9
	NID	Nidogen 1	D10, A3, A9 MEOX2 Mesenchyme homeobox 2
Hspg2	Heparan sulfate proteoglycan 2	MEOX2	
SDC	Syndecan	ETS1,2 V-ets avian erythroblastosis virus E26 oncogene homolog 1,2	
THBS	Thrombospondin 1	ELF1,3 E74-like factor 1, 3	
COL18A1	Collagen, Type XVIII, alpha-1	ELK3 ELK3, ETS domain protein	
HAS1, 2, 3	Hyaluronan synthase 1, 2, 3		

(continued on next page)

Table 3(continued)

Function	Candidate gene	Function	Candidate gene
	HABP2	Immediate early genes	BDNF
	HMMR	Hyaluronan-binding protein 2	
	CD44	Hyaluronan-mediated motility receptor	
	ADAMTS	CD44 antigen	Nrn1
		Adisintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs	Arc
			Neuritin1
			Activity-regulated cytoskeleton-associated protein
			Brain-derived neurotrophic factor

as a percentage of the value in the control cultures (Denker and Barber, 2002; Walsh et al., 2012).

Endothelial cell invasion assay: BD BioCoat Angiogenesis System. Five days after siRNA transfection, the RBMVEC were starved for 4–5 h and a cell suspension was prepared with enzyme-free Accutase solution (BD Biosciences). Two hundred and fifty microliters of cell suspension (40,000 cells/well) from each treated group (control and siRNA) were seeded to the top chambers of a BD Falcon FluoroBlok 24-Multiwell insert plate and 750 µl of culture medium containing 5% FBS (as a chemoattractant) was added to each of the bottom wells through sample ports. The multiwell insert plate was placed in the incubator for 22–23 h at 37 °C and with 5% CO₂ atmosphere. Quantification of cell invasion was achieved by post-cell invasion labeling (90 min) with Calcein AM fluorophor (4 µg/ml) (BD Biosciences) and by measuring the fluorescence of the invading cells in accordance with the instructions of the manufacturer and recommendations given on consulting the Application Specialist of BD Biosciences. Images were captured on a BD Pathway 855 Bioimager System (BD Biosciences) with X4 objective (NA 075 Olympus). Human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) were used as a positive control of the invasion assay.

Statistical analysis

Results are expressed as mean ± standard error of the mean (SEM). A one-way analysis of variance (ANOVA) test or the Kruskal–Wallis test when data were not normally distributed was conducted, followed by the Dunnett’s post hoc analysis to compare each time set against the control group mean. Comparison between groups of the siRNA transfection experiment was made by Student’s unpaired t-test or the Mann–Whitney test when data were not normally distributed. p < 0.05 was considered to be statistically significant (*p < 0.05, ** p < 0.01, #p < 0.001). Statistical analysis was performed using the SPSS Statistics software package v.21.0.0 (IBM Corporation, Armonk, New York, USA).

RESULTS

Candidate co-expressed genes involved in angiogenesis shared TFBS for HMG1Y

Eighty-four genes were selected as candidate genes involved in brain angiogenesis processes (Table 3). The bioinformatics analysis of their promoter sequences revealed common TFBS shared by the different co-expressed candidate genes (Tables 4–9). The candidate genes found to share common TFBSs are shown according to the function and the processes in which they are involved: genes overexpressed in the subventricular zone after ischemia and with angiogenic function (Table 4); genes involved in the regulation of endothelial cell stimulation and apoptosis/surveillance functions (Table 5); genes involved in the regulation of endothelial cell adhesion and surveillance (Table 6); genes involved in the inhibition of angiogenesis

Table 4. Common TFBSs shared among candidate genes overexpressed in the subventricular zone after ischemia and with angiogenic function

TFBS	Genes	Function
V\$MZFI_01	Akt1, ANGPT2, Ctgf, FGF1, HGF, Notch4, Ptgs1, TGFb3, VEGFb	Genes overexpressed in subventricular zone with angiogenic function after stroke
V\$NFI_Q6_01	Akt1, ANGPT2, Ctgf, FGF1, HGF, Notch4, TGFb3, VEGFb	
V\$LYFI_01	ANGPT2, Ctgf, FGF1, HGF, Notch4, Ptgs1, TGFb3, VEGFb	
V\$LFA1_Q6	Akt1, ANGPT2, Ctgf, HGF, Notch4, Ptgs1, TGFb3, VEGFb	
V\$ETS_Q4	ANGPT2, Ctgf, HGF, Notch4, Ptgs1, TGFb3, VEGFb3	
V\$SRF_Q5_01	ANGPT2, Ctgf, FGF1, HGF, TGFb3, VEGFb	
V\$PU1_Q6	ANGPT2, FGF1, HGF, Notch4, Ptgs1, TGFb3	
V\$AP1FJ_Q2	Akt1, ANGPT2, Ctgf, Notch4, Ptgs1	
V\$AP1_01	Ctgf, FGF1, Notch4, TGFb3	
V\$MYOGNF1_01	Ctgf, HGF, TGFb3	
V\$MTATA_B	ANGPT2, Ctgf, TGFb3	
V\$HEB_Q6	Notch4, TGFb3, VEGFb	
V\$HAND1E47_01	ANGPT2, Ctgf, Hgf	
V\$ETS1_B	Ctgf, Ptgs1, TGFb3	
V\$ELF1_Q6	ANGPT2, HGF, Ptgs1	
V\$AP1_Q6	Ctgf, Notch4, Ptgs1	

Table 5. Common TFBSs shared among candidate genes involved in the regulation of endothelial cell stimulation and apoptosis/surveillance functions

TFBS	Genes	Function
V\$AP1_Q4	SURVIVIN, PAR-1, XIAP	Endothelial cell stimulation, apoptosis/surveillance
V\$E2_Q6	XIAP, EPO	
V\$FOXHJ2_01		
V\$HFN3_01		Anti-apoptotic genes
V\$AP1FJ_Q2	IL-10, BCL2, BCLxL	
V\$CEBPB_01		
V\$CREB_Q3		
V\$ETS_Q4		
V\$MYOD_01		
V\$NFAT_Q6		
V\$PBX_Q3		
V\$TCF4_Q5		
V\$LMO2COM_01	BCL2, BCLxL	
V\$NRF2_01		
V\$PITX2_Q2		
V\$WHN_B		
V\$AP1_01	IL-10, BCL2	
V\$AP1_Q2		
V\$CRECATF_Q6		
V\$CREB_Q2_01		
V\$CREB_Q4_01		
V\$ER_Q6		
V\$GATA3_Q3		
V\$HES1_Q2		
V\$MMEF2_Q6		
V\$VMAF_01		
V\$STAT_Q6	VEGF, ANGPT1, FGF2	Endothelial cell surveillance
V\$SMAD_Q6_01	VEGF, ANGPT1, FGF2	
V\$HMG1Y_Q6	VEGF, ANGPT1, FGF2	
V\$ZTA_Q2	ANGPT1, FGF2	
V\$MYC_MAX_B	VEGF, ANGPT1	
V\$MYOD_Q6_01	VEGF, VEGFB, TGFb1, HGF	
V\$USF_Q6		
V\$TCF1P_Q6	VEGFC, VEGFB, TGFb1, FGF2	

The HMG1Y TFBS (marked in bold) was selected as the candidate TF to be analyzed and characterised in cerebral ischaemia.

(Table 7); genes which codify for TFs involved in angiogenesis (Table 8) and genes which are immediate-

early genes (Table 9). The database nomenclature has been conserved where V\$ indicates the biological

Table 6. Common TFBSs shared among candidate genes involved in the regulation of endothelial cell adhesion and surveillance

TFBS	GENES	FUNCTION
V\$SP1_Q2_01 V\$HELIOSA_01 V\$EGR_Q6 V\$MAZ_Q6 V\$COMP1 V\$OCT1_06 V\$AREB6_04 V\$AREB6_02 V\$CDPCR3HD_01 V\$SMAD_Q6_01 V\$HNF4_DR1_Q3 V\$ZF5_01 V\$Z5F_B V\$E2A_Q6 V\$MYOD_Q6_01 V\$MYOGFNIN_Q6	COL4A3, LAMA4, FN1, ELN, NID, hspg2, SDC COL4A3, LAMA4, FN1, ELN, NID, hspg2 THBS1, THBS2 HYAL2, HMMR, HABP2 HYAL2, HABP2 HMMR, HAS1 CD44, HABP2 HYAL2, CD44 HYAL2, CD44 ADAMTS1, ADAMTS2, ADAMTS4, ADAMTS5, ADAMTS7, ADAMTS8, ADAMTS12, ADAMTS13, ADAMTS16, ADAMTS17, ADAMTS18, ADAMTS19, ADAMTS20 ADAMTS2, ADAMTS4, ADAMTS5, ADAMTS16, ADAMTS17, ADAMTS18	Endothelial cell adhesion and surveillance

Table 7. Common TFBSs shared among candidate genes involved in the inhibition of angiogenesis

TFBS	Genes	Function
V\$NFAT_Q4_01 V\$NFAT_Q6 V\$AP1_Q4 V\$E2F_Q3 V\$E2F_Q4 V\$AML1_Q6	THBS1, TGFB1, PAI-1, A2M THBS1, PAI-1, A2M THBS1, TGFB1 TGFB1, PAI-1	Inhibition of angiogenesis

species group (vertebrates) and the “Q” value indicates the TFBS matrix quality. These results allowed us to select HMGIY as a candidate TF to be analyzed and characterized in cerebral ischemia. We found that genes involved in the regulation of the endothelial cell surveillance, proliferation, differentiation and maturation as well as in the modulation of inflammatory genes and cell surface receptors shared TFBS for HMGIY (Table 1). These associations suggested that HMGIY might be a putative modulator of genes involved in the angiogenic process.

HMGIY expression is up-regulated during ischemia

The temporal expression profile of HMGIY TF in cerebral ischemia was obtained at mRNA and protein levels in control and pMCAO rat brain tissue samples. HMGIY transcript analysis revealed that the mRNA expression in pMCAO rat cortex was significantly increased ($p < 0.05$) between 6 and 24 h post-pMCAO (Fig. 1A). On the other hand, HMGIY protein (50–60 kDa) progressively increased from 6 h ($p < 0.05$) until 14 days ($p < 0.001$), showing the peak of the expression at 72 h after pMCAO (nearly fivefold). HMGIY protein expression was higher than the control at all times analyzed (Fig. 1B). These experiments allowed a complete mRNA and protein expression profile of the HMGIY TF after pMCAO to be obtained in the temporal pattern studied.

HMGIY is expressed in neuronal and endothelial cells in rat brain

To further characterize the HMGIY TF in control and ischemic rat brain, we determined the TF localization in rat cortex. The results of immunofluorescence in rat cortex slices showed HMGIY protein expression to be mainly localized in NeuN-positive cells (Fig. 2A) and in RECA-1-positive cells (Fig. 2C) both in control and MCAO conditions, and that it increased in ischemic conditions. On the other hand, the experiment also showed that HMGIY protein was not found to be localized in GFAP-positive cells either in control or ischemic conditions. Therefore, the results from the present study revealed that the TF HMGIY is expressed in neuronal and endothelial cells in the control and ischemic rat brain, while it is not detected in astrocytes, in the studied conditions.

Ischemia induces changes in the HMGIY interaction profile

In order to determine the potential role for HMGIY, we analyzed the interaction profile of this TF in control and ischemic conditions to elucidate the signaling pathways involved. The TF–TF array showed that the number of HMGIY protein interactions at 6 h after tMCAO was increased versus those found in the healthy control and the 14-day post-ischemia panels (Fig. 3). Specifically, in control conditions HMGIY was found to interact with TFs such as AP-1, EGR and NF-1. At 6 h after tMCAO the previously mentioned interactions with HMGIY were maintained, and new interactions with different TFs were observed including AP-2, Ets, ERE, GRE, Myc-Max, MEF-1, HNF-4, Pax-5, p53, Oct-1, NF κ B, NF-E2, NFATC, RXR(DR1), RXR(DR5), STAT3, STAT4, VDR(DR3), USF-1. Moreover, new TF interactions with Brn-3, CREB, GATA, IRF-1, MEF-2, Pbx, SRE, STAT1 were also observed, although they were detected as weak interactions. In contrast, at 14 days after ischemia, the HMGIY TF interaction network changed, interacting with TFs like AP-1, EGR, E2F1 and SRE. The new

Table 8. Common TFBSs shared among candidate genes which codify for transcription factors involved in angiogenesis, according to the bioinformatics analysis, classified according to their specific function

TFBS	Genes	Function	TFBS	Genes	Function
V\$EGR_Q6 V\$MAZ_Q6 V\$MEF2_Q6_01 V\$TFIII_Q6 V\$HMGYI_Q6	RUNX2, HOXA9, FOXO3A, MLLT7, HDAC1, EGR1	Surveillance/cellular proliferation, endothelial cell differentiation and maturation	V\$DR4_Q2 V\$HMGYI_Q6 V\$TFIIA_Q6 V\$ZF5 V\$SP1 V\$TFIII_Q6	MEOX2, PPARG, EGR1 ELF1, SMAD2, ID1, ID3, HOXA9, KLF2, EGR1, GTF21, HAND2, CREB1, TAL1, HEY1, HEY2 ELF1, SMAD2, ID1, ID3, HOXA9, KLF2, EGR1, GTF21, HAND2, CREB1, TAL1, HEY2	Inflammatory genes modulation Cell surface receptors
V\$NFAT_Q4_01			V\$NF1_Q6_01	ELF1, SMAD2, ID3, HOXA9, KLF2, EGR1, GTF21, HAND2, TAL1, HEY1	Soluble factors
V\$AP2GAMMA_01	NET1, ETS1, MLLT7, MEF2C, ELF1, NR2F2, ELF3, SMAD3, SMAD4, PPARG, MEOX2, KLF2, FOSL1, ID1, ID3, IGR1, KLF5, STAT3, ZNF161, HAND1, HEY1, HEY2		V\$CRX_Q4	SMAD2, ID3, HOXA9, KLF2, EGR1, GTF21, HAND2, CREB1, TAL1, HEY1	
V\$GC_01			V\$CP2_02	ID1, ID3, HOXA9, KLF2, EGR1, GTF21, HAND2, CREB1, TAL1, HEY1	
V\$SP1_Q6			V\$MAZ_Q6	ELF1, ID1, ID3, HOXA9, EGR1, CREB1, TAL1, HEY1, HEY2	
V\$TBP_Q6			V\$HMGYI_Q6	SMAD2, ID1, ID3, HOXA9, EGR1, GTF21, HAND2, TAL1, HEY1	
V\$ZF5_01			V\$HELIOA_02	ELF1, SMAD2, ID1, ID3, HOXA9, GTF21, HAND2, CREB1, TAL1	PI3K-Akt pathway and other signaling pathways
V\$EGR_Q6	FOXO1A, FOXO3A, MLLT7, SERBP1, NOTCH1, PPARG		V\$ELK1_02	SMAD1, ID3, HOXA9, KLF2, EGR1, GTF21, CREB1, TAL1, HEY1	
V\$LFA1_Q6			V\$XPF1_Q6	ID3, HOXA9, EGR1, GTF21, CREB1, TAL1, HEY1, HEY2	
V\$MUSCLE_INI_B			V\$E2F_Q6	ELF1, SMAD2, ID3, GTF21, HAND2, CREB1, HEY1, HEY2	
V\$CETS168_Q6	FOXO3A, MLLT7, SERBP1		V\$MAZR_01	ELF1, GTF21, HAND2, CREB1, TAL1, HEY2	
V\$SMAD4_Q6			V\$AHRIF_Q6	SMAD2, HOXA9, GTF21, HAND2, HEY1, HEY2	
V\$E2F1_Q4_01	FOXO3A, MLLT7, SERBP1		V\$MEIS1_01	KLF2, GTF21, CREB1, TAL1, HEY1	
V\$YY1_02					

The HMGYI TFBS (marked in bold) was selected as the candidate TF to be analyzed and characterised in cerebral ischaemia.

Table 9. Common TFBSs shared among candidate genes which are immediate-early genes

TFBS	Genes	Function
V\$AP1 V\$KROX V\$USF	BDNF, NRN1, ARC	Immediate-early genes
V\$HAND1 V\$SREBP1	BDNF, ARC	
V\$COMP1 V\$E2F1 V\$ELK V\$ETS1 V\$IK1 V\$IRF1 V\$IRF7 V\$IRF V\$MTATA	BDNF, NRN1	

found TF interactions with HMGIY TF in ischemic conditions (6 h) and their specific function with references are shown in Table 10. Specifically, the present experiment revealed that in the acute phase HMGIY interacts with other TFs involved in the endothelial cell stimulation, adhesion, proliferation, apoptosis and differentiation; in the promotion of the angiogenic process; in the regulation of soluble factors, immediate-early genes and cellular surface receptors. Thus, from this analysis we showed that ischemia induced changes in the HMGIY signaling pathways, promoting different TF interactions between the different post-ischemia phases analyzed.

HMGIY knockdown reduces ANGPT-1 and VEGF expression and endothelial cell viability in RBMVEC

In order to deepen our understanding of the role of HMGIY in angiogenesis, RBMVEC were used to transfect HMGIY siRNA. On one hand the ANGPT-1 and VEGF expression were analyzed as potential HMGIY TF targets at mRNA and protein levels in the control and HMGIY siRNA-transfected RBMVEC. On the other hand, the endothelial cell viability, migration and invasion capacity of HMGIY siRNA-transfected RBMVEC were also explored. HMGIY protein expression was confirmed by immunocytofluorescence in RBMVEC (data not shown), before proceeding with the analysis of the potential function of this TF.

HMGIY TF targets analysis: ANGPT-1 and VEGF expression. The knockdown experiments in RBMVEC showed a significant reduction of 30% of HMGIY protein at 5 days after HMGIY siRNA transfection ($p < 0.001$) compared with the control cells. This decrease in the HMGIY protein expression runs in parallel with reduced ANGPT-1 and VEGF mRNA and protein expression. Specifically, we observed a significant reduction in ANGPT-1 and VEGF proteins (50%; $p < 0.001$ and 40%; $p < 0.01$, respectively) 5 days after siRNA transfection (Fig. 4). Therefore, the data from the

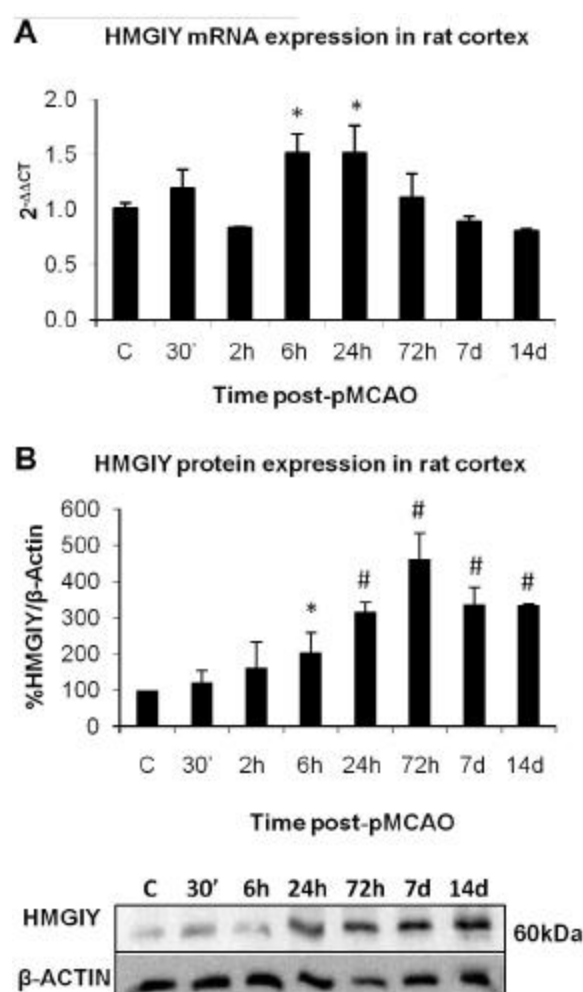


Fig. 1. HMGIY gene expression study by quantitative real time PCR (A) and Western blot (B) in control and permanent ischemic rat brain samples. This study reveals that HMGIY expression is up-regulated during ischemia. On the one hand, HMGIY mRNA expression was significantly increased in the acute phase of ischemia, specifically between 6 and 24 h after pMCAO. On the other hand, HMGIY protein expression progressively increased from the acute to the late phase of ischemia, reaching highest expression at 72 h after pMCAO. Ywhaz, Sdha and Hprt were used as reference genes in qPCR. Results from Western blot were normalized with β -actin. C: Control, $^{\circ}$: min, h: hours, d: days and pMCAO; permanent middle cerebral artery occlusion. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, # $p < 0.001$.

present analysis reveal that ANGPT-1 and VEGF are HMGIY TF targets and confirm the results from the bioinformatics analysis performed in the present study.

Functional studies: endothelial cell viability, migration and invasion assays. The results from the evaluation of the TF involvement in processes participating in angiogenesis using endothelial cell proliferation, migration and invasion assays are shown in Fig. 5. No significant differences have been found in the invasion and migration assays among the RBMVEC with a decreased HMGIY expression (HMGIY siRNA-treated cells) and the RBMVEC control group (Fig. 5B, C,

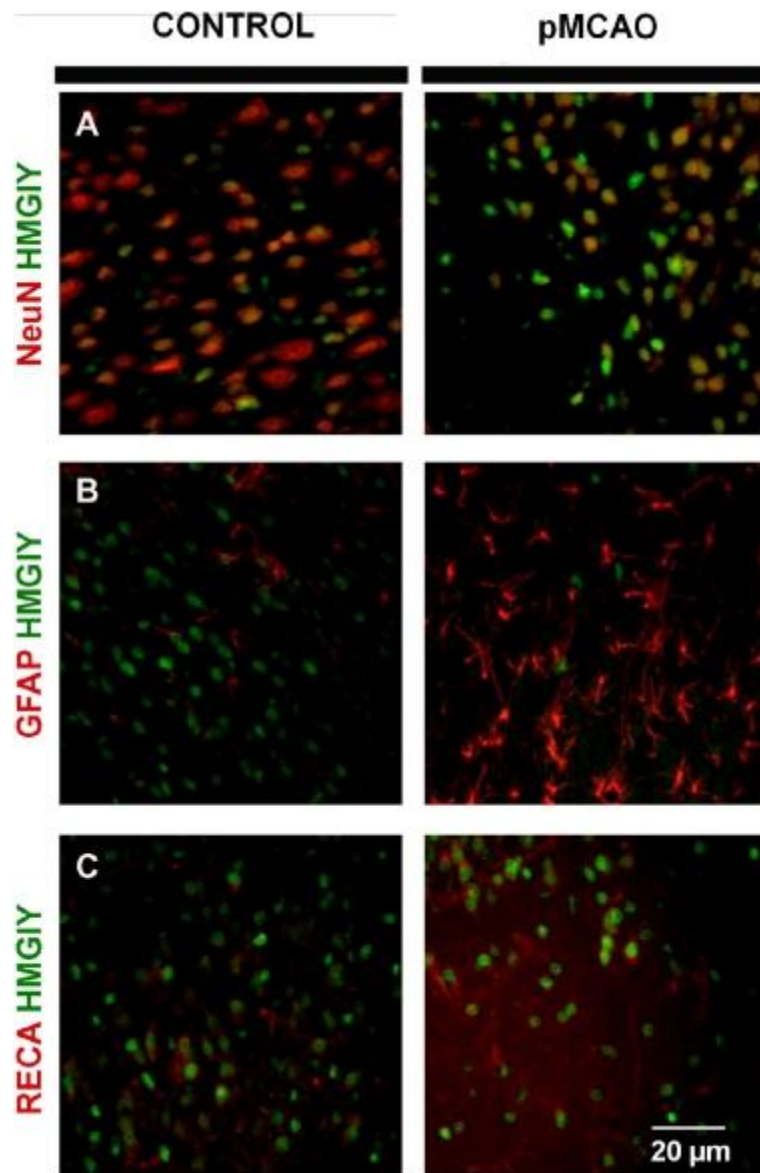


Fig. 2. The HMG1Y TF protein expression is localized in neuronal and endothelial cells in control and ischemic rat cortical brain. The localization of HMG1Y protein in brain cortex slices was analyzed by immunofluorescence using antibodies against HMG1Y (green), the cell markers (red) NeuN (A), GFAP (B), and RECA-1 (C) in control and pMCAO (24 h) conditions. The images were obtained with an Å20 objective and merged on a BD Pathway 855 Bioimager System using BD Attovision software. RECA-1: rat endothelial cells antigen; NeuN: neuronal nuclei; GFAP: glial fibrillary acidic protein. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

respectively). On the other hand, it was observed that HMG1Y knockdown correlates with a significant diminution of cell proliferation (viability) five days post-transfection (81.64% of viability versus control; $p < 0.001$) (Fig. 5A). Thus, the present experiments reveal that HMG1Y diminution expression in RBMVEC does not promote changes in the endothelial cell degradation of the extracellular matrix surrounding the parent vessel (invasion ability), or in the mobility process directionally regulated by chemotactic stimuli (migration ability). Elsewhere, our results demonstrate that HMG1Y TF is involved in the proliferation of endothelial cells, which is necessarily to assemble the new vessel and for the lumen formation, during the angiogenic process.

DISCUSSION

In the present study we have identified and characterized HMG1Y as a TF regulated in cerebral ischemia. We show that ischemia induces HMG1Y interactions with other TFs that modulate brain repair functions and report a new association between HMG1Y and the angiogenic proteins VEGF and ANGPT-1 as well as its involvement in the proliferation of endothelial cells.

The knowledge of genes and their transcriptional regulators that participate in giving the brain the potential to compensate for ischemic lesions may provide novel substrates for brain repair and is essential in the development of optimal stroke therapeutic strategies (Zhang et al., 2012). In the search for

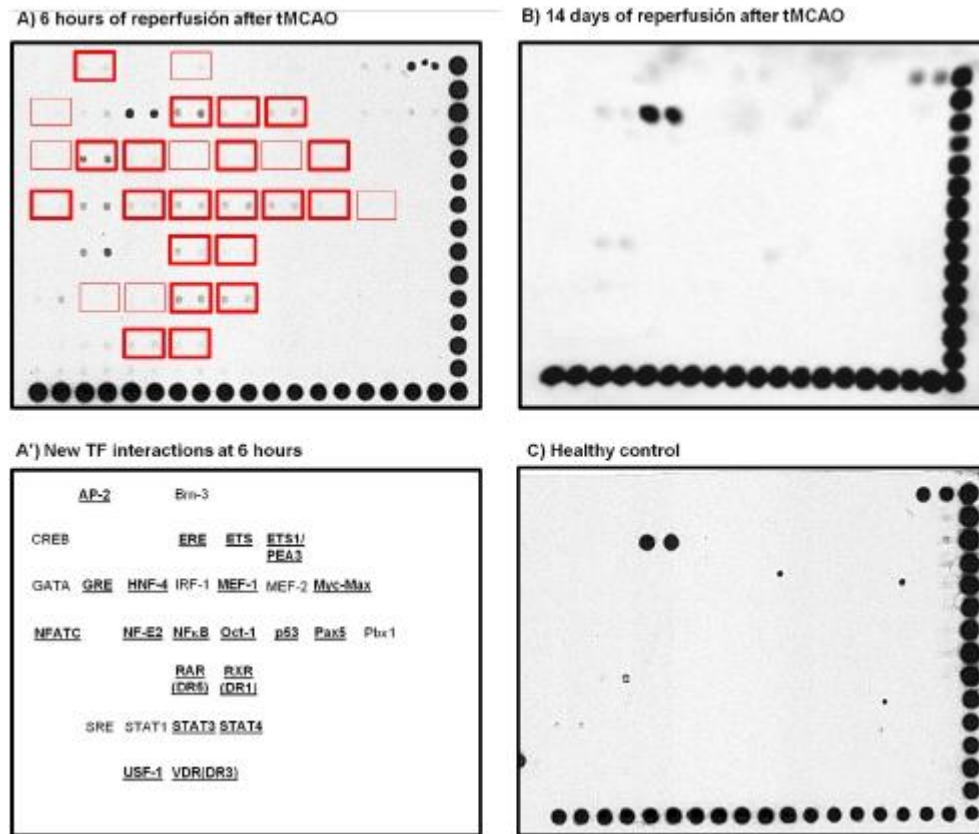


Fig. 3. Comparison of the HMGIY TF interaction profile among ischemic (A, B) and control (healthy) (C) rat brain nuclear extract samples by a TF–TF interaction array (Panomics). Two different reperfusion times after tMCAO were analyzed (6 h and 14 days) given that the HMGIY protein expression at these times were significantly different. This analysis showed that ischemia promotes changes in the HMGIY interaction profile. Specifically, the number of HMGIY protein interactions at 6 h after tMCAO (A) was increased versus those found in the healthy control group (C) and 14 days post-ischemia (B). Panel A' shows the names of the TF interactions only observed at 6 h of reperfusion (new interactions, marked in red in panel A): the bold and underlined TF are strong interactions, while the others are weak. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

putative TFs involved in angiogenesis after stroke, we performed a bioinformatics analysis searching for common transcriptional regulatory signals among the promoters of candidate genes involved in different angiogenic processes. From this study we selected HMGIY, a structural TF belonging to the high-mobility group family A (HMGA) involved in normal cellular processes including growth, proliferation, differentiation and death (Reeves, 2001; Gerlitz et al., 2009). HMGIY TFBS were shared by the promoters of several candidate genes involved in angiogenesis, thus indicating that HMGIY could bind and modulate those target genes by activating or inhibiting their expression. HMGIY binding sites were present in genes involved in (1) the regulation of endothelial cell stimulation and surveillance, (2) genes that codify for TFs that modulate angiogenic functions (regulation of endothelial cell proliferation, surveillance, differentiation and maturation), (3) inflammatory genes, and (4) cell surface receptors.

Given the characteristics and functions of HMGIY TF (controlling many aspects of normal nuclear activity) and the results from the bioinformatics analysis, we proceeded to its characterization in rat cerebral ischemia. To the best of our knowledge, this is the first

study to characterize HMGIY in the context of cerebral ischemia.

Two *in vivo* models of focal ischemia were used. Transient MCAO was selected for the TF–TF interaction array aimed at identifying differences among the different affected brain zones at different times post-ischemia. This model showed a slow extension of the infarct core into the penumbra, thus allowing a more prolonged and consistent peri-infarct area (Hossmann and Traystman, 2009). For the study of transcript gene expression and sub-cellular localization, pMCAO was chosen given that the core expands into the penumbra much faster in this model (Hossmann and Traystman, 2009) and the infarct volume shows greater reproducibility.

Our results reveal for the first time that HMGIY is regulated by cerebral ischemia. HMGIY expression is seen to be up-regulated from the acute to late phases of ischemia and persists at least up to 14 days – the latest time studied – supporting the idea that this TF may be an important modulator of brain damage and repair mechanisms. Protein expression was found to be greater at all the times analyzed post-pMCAO compared with the control. Moreover, the immunofluorescence

Table 10. New transcription factor interactions of HMGIY in ischemic conditions (6 h post-ischemia)

Function	Transcription factor	References
Endothelial cell stimulation, adhesion, proliferation, apoptosis and differentiation	ETS V-ets avian erythroblastosis virus E26 oncogene homolog	Mattot et al., (2000)
	USF-1 Upstream stimulatory factor 1	Olave et al., (2010)
	MYC-MAX V-Myc avian myelocytomatosis viral oncogene homolog - MAX protein	Shichiri et al., (1999)
	HNF Hepatocyte nuclear factor	Osanai et al., (2002) and Pierreux et al., (2010)
	CREB cAMP response element-binding protein	Zhao et al., (2011) and Zhong et al., (2012)
	MEF2 Mads box transcription enhancer factor 2	Olson (2004), Chang et al., (2006) and Maiti et al., (2008)
	GATA GATA-binding protein	Kamei et al., (2011) and Nizamutdinova et al., (2012)
	PBX Pre-B-cell leukemia transcription factor	Charboneau et al., (2005)
	P53 Tumor protein p53	Zhao et al., (2004)
	OCT1 POU domain, class 2, transcription factor 1	Lacal et al., (2009)
	NFATC Nuclear factor of activated T cells, cytoplasmic, calcineurin-dependent	Suehiro et al., (2010) and Jang et al., (2010)
	STAT1, 3, 4 Signal transducer and activator of transcription 1, 3, 4	Nielsen et al., (2013) and Goettsch et al., (2012)
	ERE Estrogen-responsive element	Buteau-Luzano et al., (2002) and Applanat et al., (2008)
	NFKB Nuclear factor kappa-B	Stone et al., (2011)
Promotion of the angiogenic process	ETS V-ets avian erythroblastosis virus E26 oncogene homolog	Valter et al., (1999)
	MEF2 Mads box transcription enhancer factor 2	Liu et al., (2009)
	STAT3 Signal transducer and activator of transcription 3	Doucette et al., (2012) and Jackson et al., (2012)
	NFATC Nuclear factor of activated T cells, cytoplasmic, calcineurin-dependent	Urso et al., (2011)
Regulation of soluble factors	ETS V-ets avian erythroblastosis virus E26 oncogene homolog	Gilles et al., (1996)
	AP2 Adaptor-related protein complex 2	Huang et al., (2009)
	STAT3 Signal transducer and activator of transcription 3	Shigekawa et al., (2011)
Regulation of immediate-early genes	ETS V-ets avian erythroblastosis virus E26 oncogene homolog 1,2	Roskoski (2012) and Demir et al., (2012)
	IRF1 Interferon regulatory factor	Wang et al., (1996) and Yu-Lee et al., (1990)
	USF-1 Upstream stimulatory factor 1	White et al., (2000)
Regulation of cellular surface receptor	CREB cAMP response element-binding protein	Sandoval et al., (2009)

study showed that HMGIY protein is localized in neurons and endothelial cells in ischemic and control conditions in rat brain.

In order to identify HMGIY downstream signaling pathways in ischemia we proceeded to analyse the TF–TF interaction profile of HMGIY. To this aim, we used nuclear extracts from control and ischemic (6 h and 14 days of reperfusion) rat brain as we observed a differential expression in HMGIY mRNA studied by qPCR. The TF–TF array shows that ischemia induces changes in the HMGIY TF interaction profile over time. An increase of interactions with TFs involved in the modulation and promotion of cerebral repair processes was observed at 6 h compared with the TF–TF interaction profile at 14 days post-ischemia. These are involved in the modulation of endothelial cell adhesion,

activation, surveillance, differentiation and apoptosis (ETS, Myc-Max, CREB, GATA, p53, NFATC, STAT1, STAT3, STAT4, USF1, HNF, MEF2, PBX, OCT-1, ERE, E2F1, NFKB), in the promotion of the angiogenic process (ETS, MEF2, STAT3, NFATC), in the regulation of soluble factors (ETS, AP2, STAT3), immediate-early genes (ETS, IRF1, USF1) and cellular surface receptors (CREB) (see the corresponding references in Table 10). Among the HMGIY interactions found, the Myc-max (Wood et al., 2000); the HNF, CREB, MEF2 and OCT-1 (Bozek et al., 2009); the GATA (John et al., 1996; Battista et al., 2003); the p53 (Choi et al., 2008); the ERE (Massaad-Massade et al., 2002, 2004) and the AP-2 (Reymann and Borlak, 2008) TFs interactions, have previously been described by other authors although they have not been studied with specific

reference to ischemia. The results from our study suggest that the genes modulating brain plasticity processes are activated as early as a few hours after stroke. This finding is in line with previous authors (Navaratna et al., 2009), which reported that cerebral repair mechanisms began in the acute phase of ischemia and that the angiogenic process in the infarcted brain area starts as early as 6–12 h after experimental ischemia (Beck and Plate, 2009).

Once we had characterized HMGIY TF in rat brain cerebral ischemia, we focused on the study of its possible role in controlling genes involved in angiogenic processes, as indicated by the bioinformatics analysis. Among the candidate genes analyzed, ANGPT-1 and VEGF promoters, showed HMGIY binding sites (Table 5). Both VEGF and ANGPT-1 are key modulators of blood–brain barrier integrity and new vessel formation, playing complementary roles (Zhang and Chopp, 2002). It has been reported that their expression is induced and differentially expressed during ischemic injury (Lin et al., 2000; Zhang and Chopp, 2002; Zhang et al., 2002; Zan et al., 2011) and in vivo experiments have shown that VEGF and Ang-1 may play a vital role in regulating angiogenesis after ischemic stroke (Zhang and Chopp, 2002). In order to validate the transcriptional regulation of these genes by HMGIY, we silenced HMGIY in RBMVEC by siRNA

transfection experiments and we found a significant decrease in the mRNA and protein expression of both ANGPT-1 and VEGF. Our results support the idea that the expression of these angiogenic factors is regulated by HMGIY. According to our knowledge, this is the first study in which VEGF and ANGPT1 proteins are described as potential HMGIY targets. It has been reported that ANGPT-1 and VEGF coexpression in a pMCAO mouse model reduces vessel leakage and edema caused by VEGF at the acute stage, which can also lead to reduction in the infarct volume. In the chronic stage, this co-expression improves outcomes through the induction of new non-leaky vasculature supporting the growth and differentiation of neuronal stem/progenitor cells (Shen et al., 2011). In addition, another study has postulated that therapeutic strategies which aim to stimulate both VEGF and ANGPT-1 expression will become more effective in promoting angiogenic processes than those that stimulate a unique signaling pathway (Zhang and Chopp, 2002). In this way, our study suggests that HMGIY TF will become an interesting therapeutic target as both angiogenic proteins can be jointly modulated through it.

Therefore, in order to determine the specific role of HMGIY in the angiogenesis, we proceeded to evaluate three different essential processes that participate in the angiogenic mechanism with siRNA-treated RBMVEC:

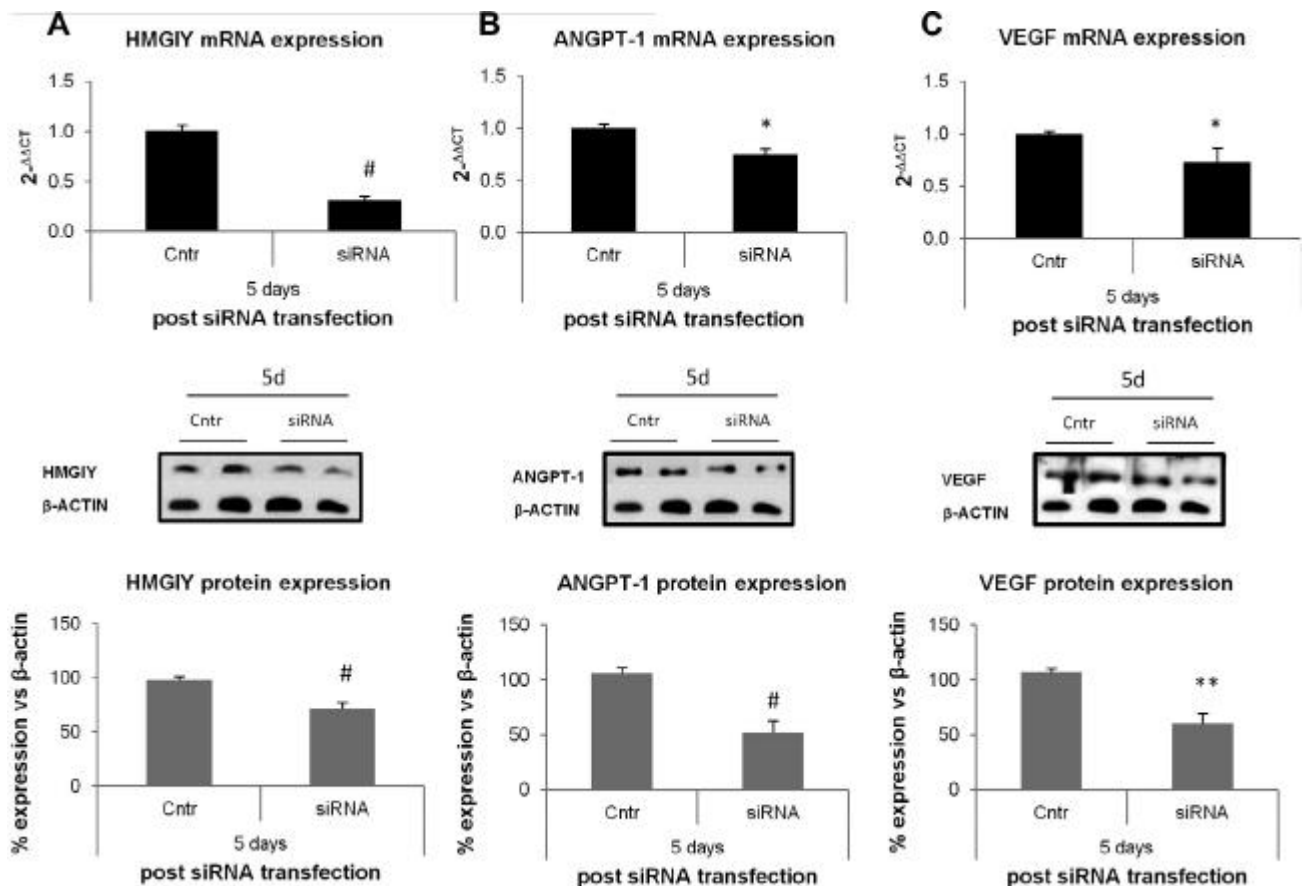


Fig. 4. Analysis of the HMGIY (A), ANGPT-1 (B) and VEGF (C) mRNA and protein expression in HMGIY siRNA-transfected RBMVEC. The mRNA and protein studies were performed at 5 days after transfection by qPCR and Western blot, respectively. Results were normalized with Ywhaz and Sdha (qPCR), and b-actin (Western blot). The study showed that the HMGIY mRNA knockdown in RBMVEC in culture promoted a significant reduction in the mRNA and protein expression of ANGPT-1 and VEGF in the transfected cells. *p < 0.05, **p < 0.01, #p < 0.001.

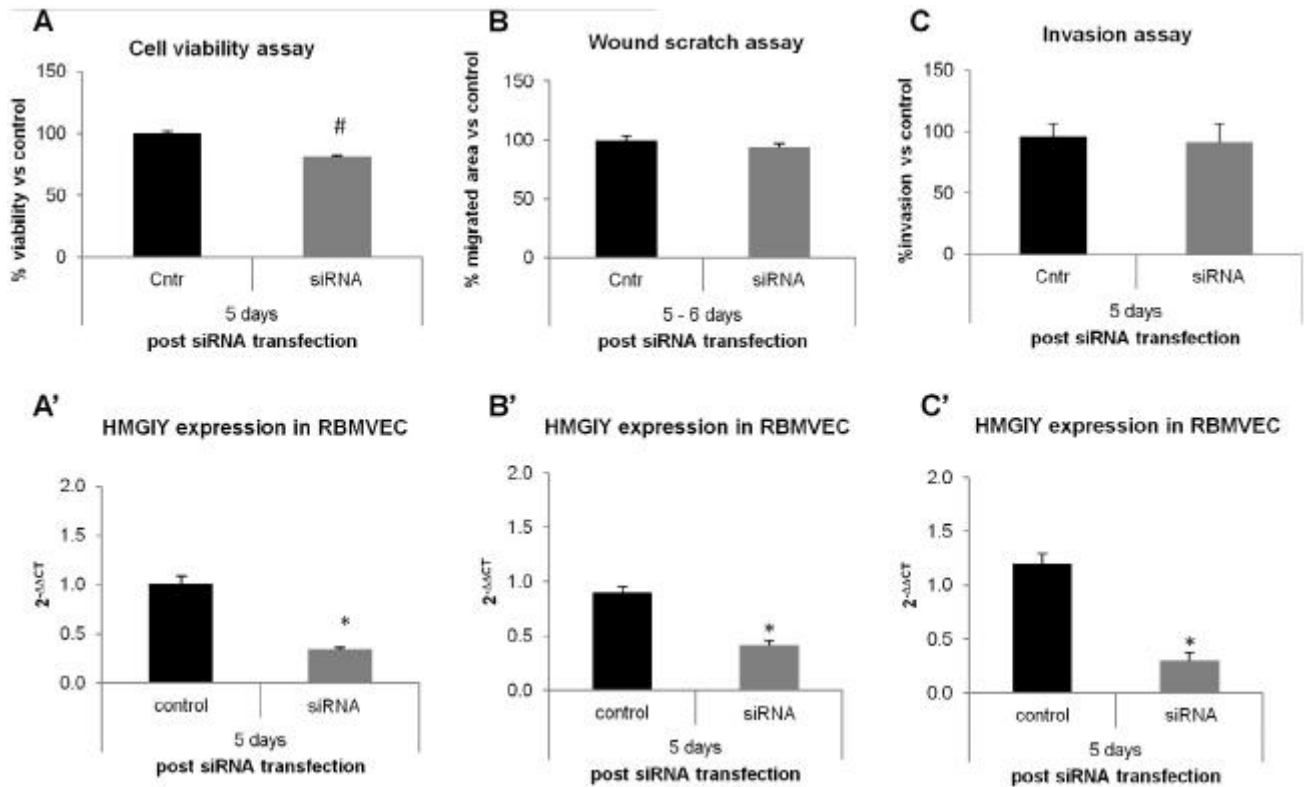


Fig. 5. In vitro evaluation of HMGIY expression and angiogenic functions in RBMVEC. Cell viability assessment by MTT (A), cell migration analysis by wound scratch assay (B), and invasion assay (C) studied by BD Falcon FluoroBlok 24-Multiwell insert plates were performed in RBMVEC at 5 days after HMGIY siRNA transfection. HMGIY expression was analyzed in the three cases (A'–C') using the qPCR technique. These experiments showed that HMGIY knockdown correlates with a significant reduction in endothelial viability. However, it does not promote significant differences in cell migration or invasion. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, # $p < 0.001$.

endothelial cell proliferation, migration and invasion. From this analysis, we are able to conclude that HMGIY promotes endothelial cell viability while not interfering in endothelial cell migration or invasion, at least during the time-course analyzed and in the experimental conditions we have tested. These findings are in line with previous studies (Steinle et al., 2003; Baumer et al., 2011) which also reported changes in some but not all the steps of the angiogenesis process. In order to avoid misinterpretations in the results, the functional studies were performed in control conditions. Moreover, our results agree with previous oncological studies which have reported that HMGIY inhibits proteins involved in apoptosis, increases the expression of oncogenic miRNAs, promotes the cell survival and stimulates the potential for growth and metastasis in specific cancer cells (Frasca et al., 2006; Yuan et al., 2011; Zhang et al., 2011). It therefore seems that the cell survival changes observed in siRNA-transfected RBMVEC are closely related to tumor progression and increased malignancy as has been previously reported.

CONCLUSIONS

The present study has identified HMGIY as a new TF involved in cerebral ischemia. Changes induced by ischemia in the HMGIY TF interaction profile at the acute phase showing an increase of interactions with

TFs involved in the modulation and promotion of cerebral repair processes suggest that the genes modulating brain plasticity processes are activated as early as a few hours after stroke. It has also been found that HMGIY regulates both VEGF and ANGPT-1 expression and promotes endothelial cell viability, which makes this TF an interesting therapeutic target for promoting angiogenic processes. It remains to be seen whether this cell survival effect is performed directly by HMGIY or through the VEGF and ANGPT-1 proteins. Although the results obtained clearly point to HMGIY being a regulator of the angiogenic process and, as such, a potential therapeutic target in the restorative phase after cerebral ischemia, further studies will be necessary to determine whether the HMGIY functions described here are also observed in vivo and in ischemic conditions.

Acknowledgments—This work was partially supported by the Centre d'Innovació i Desenvolupament Empresarial (CIDEM) of the Generalitat de Catalunya (grant No. RDITSCON07-1-0006), Grupo Ferrer Internacional SA, Spanish Ministry of Science and Innovation and the European Regional Development Fund (ERDF) (PROFIT grant No. CIT 090000-20008-11), Institut de Salut Carlos III (ISCIII) grant Nos. FIS-PI070322 and ISCIII retics-RENEVAS-RD06/0026/0005 and RD07/0026/2002. We would like to thank Andrew Hughes for performing a linguistic revision of the article.

REFERENCES

- Applanat MP, Buteau-Lozano H, Herve MA, Corpet A (2008) Vascular endothelial growth factor is a target gene for estrogen receptor and contributes to breast cancer progression. *Adv Exp Med Biol* 617:437–444.
- Battista S, Pentimalli F, Baldassarre G, Fedele M, Fidanza V, Croce CM, Fusco A (2003) Loss of Hmga1 gene function affects embryonic stem cell lympho-hematopoietic differentiation. *FASEB J* 17:1496–1498.
- Baumer Y, Scholz B, Ivanov S, Schlosshauer B (2011) Telomerase-based immortalization modifies the angiogenic/inflammatory responses of human coronary artery endothelial cells. *Exp Biol Med* (Maywood) 236:692–700.
- Beck H, Plate KH (2009) Angiogenesis after cerebral ischemia. *Acta Neuropathol* 117:481–496.
- Bozek K, Relogio A, Kielbasa SM, Heine M, Dame C, Kramer A, Herzel H (2009) Regulation of clock-controlled genes in mammals. *PLoS One* 4:e4882.
- Buteau-Lozano H, Ancelin M, Lardeux B, Milanini J, Perrot-Applanat M (2002) Transcriptional regulation of vascular endothelial growth factor by estradiol and tamoxifen in breast cancer cells: a complex interplay between estrogen receptors alpha and beta. *Cancer Res* 62:4977–4984.
- Catez F, Hock R (2010) Binding and interplay of HMG proteins on chromatin: lessons from live cell imaging. *Biochim Biophys Acta* 1799:15–27.
- Chang S, Young BD, Li S, Qi X, Richardson JA, Olson EN (2006) Histone deacetylase 7 maintains vascular integrity by repressing matrix metalloproteinase 10. *Cell* 126:321–334.
- Charboneau A, East L, Mulholland N, Rohde M, Boudreau N (2005) Pbx1 is required for Hox D3-mediated angiogenesis. *Angiogenesis* 8:289–296.
- Chen ST, Hsu CY, Hogan EL, Maricq H, Balentine JD (1986) A model of focal ischemic stroke in the rat: reproducible extensive cortical infarction. *Stroke* 17:738–743.
- Chenna R, Sugawara H, Koike T, Lopez R, Gibson TJ, Higgins DG, Thompson JD (2003) Multiple sequence alignment with the Clustal series of programs. *Nucleic Acids Res* 31:3497–3500.
- Choi D, Appukkuttan B, Binek SJ, Planck SR, Stout JT, Rosenbaum JT, Smith JR (2008) Prediction of cis-regulatory elements controlling genes differentially expressed by retinal and choroidal vascular endothelial cells. *J Ocul Biol Dis Infor* 1:37–45.
- Conway EM, Collen D, Carmeliet P (2001) Molecular mechanisms of blood vessel growth. *Cardiovasc Res* 49:507–521.
- Denker SP, Barber DL (2002) Cell migration requires both ion translocation and cytoskeletal anchoring by the Na-H exchanger NHE1. *J Cell Biol* 159:1087–1096.
- Demir O, Ari O, Kurnaz IA (2012) Elk-1 interacts with dynein upon serum stimulation but independent of serine 383 phosphorylation. *Cell Mol Neurobiol* 32:185–189.
- Doucette TA, Kong LY, Yang Y, Ferguson SD, Yang J, Wei J, Qiao W, Fuller GN, Bhat KP, Aldape K, Priebe W, Bogler O, Heimberger AB, Rao G (2012) Signal transducer and activator of transcription 3 promotes angiogenesis and drives malignant progression in glioma. *Neuro Oncol* 14:1136–1145.
- Durukan A, Tatlisumak T (2007) Acute ischemic stroke: overview of major experimental rodent models, pathophysiology, and therapy of focal cerebral ischemia. *Pharmacol Biochem Behav* 87:179–197.
- Farre D, Roset R, Huerta M, Aduara JE, Rosello L, Alba MM, Messeguer X (2003) Identification of patterns in biological sequences at the ALGGEN server: PROMO and MALGEN. *Nucleic Acids Res* 31:3651–3653.
- Fedele M, Battista S, Manfioletti G, Croce CM, Giaccotti V, Fusco A (2001) Role of the high mobility group A proteins in human lipomas. *Carcinogenesis* 22:1583–1591.
- Frasca F, Rustighi A, Malaguamera R, Altamura S, Vigneri P, Del Sal G, Giaccotti V, Pezzino V, Vigneri R, Manfioletti G (2006) HMGA1 inhibits the function of p53 family members in thyroid cancer cells. *Cancer Res* 66:2980–2989.
- Gerlitz G, Hock R, Ueda T, Bustin M (2009) The dynamics of HMG protein-chromatin interactions in living cells. *Biochem Cell Biol* 87:127–137.
- Gubern C, Hurtado O, Rodríguez R, Morales JR, Romera VG, Moro MA, Lizasoain I, Serena J, Mallolas J (2009) Validation of housekeeping genes for quantitative real-time PCR in in-vivo and in-vitro models of cerebral ischaemia. *BMC Mol Biol* 10:57.
- Gilles F, Raes MB, Stehelin D, Vandebunder B, Fafeur V, (1996) The c-ets-1 proto-oncogene is a new early-response gene differentially regulated by cytokines and growth factors in human fibroblasts. *Exp Cell Res* 222:370–378.
- Goettsch C, Kliemt S, Sinnigen K, von Bergen M, Hofbauer LC, Kalkhof S (2012) Quantitative proteomics reveals novel functions of osteoclast-associated receptor in STAT signaling and cell adhesion in human endothelial cells. *J Mol Cell Cardiol* 53:829–837.
- Hock R, Furusawa T, Ueda T, Bustin M (2007) HMG chromosomal proteins in development and disease. *Trends Cell Biol* 17:72–79.
- Hossmann KA, Traystman RJ (2009) Cerebral blood flow and the ischemic penumbra. *Handb Clin Neurol* 92:67–92.
- Huang YW, Su P, Liu GY, Crow MR, Chaukos D, Yan H, Robinson LA (2009) Constitutive endocytosis of the chemokine CX3CL1 prevents its degradation by cell surface metalloproteases. *J Biol Chem* 284:29644–29653.
- Hurtado O, Moro MA, Cardenas A, Sanchez V, Fernandez-Tome P, Leza JC, Lorenzo P, Secades JJ, Lozano R, Davalos A, Castillo J, Lizasoain I (2005) Neuroprotection afforded by prior citicoline administration in experimental brain ischemia: effects on glutamate transport. *Neurobiol Dis* 18:336–345.
- Jackson C, Ruzevick J, Amin AG, Lim M (2012) Potential role for STAT3 inhibitors in glioblastoma. *Neurosurg Clin N Am* 23:379–389.
- Jang GH, Park IS, Yang JH, Bischoff J, Lee YM (2010) Differential functions of genes regulated by VEGF-NFATc1 signaling pathway in the migration of pulmonary valve endothelial cells. *FEBS Lett* 584:141–146.
- John S, Robbins CM, Leonard WJ (1996) An IL-2 response element in the human IL-2 receptor alpha chain promoter is a composite element that binds Stat5, E1f-1, HMG-I(Y) and a GATA family protein. *EMBO J* 15:5627–5635.
- Kamei CN, Kempf H, Yelin R, Daoud G, James RG, Lassar AB, Tabin CJ, Schultheiss TM (2011) Promotion of avian endothelial cell differentiation by GATA transcription factors. *Dev Biol* 353:29–37.
- Krupinski J, Kaluza J, Kumar P, Kumar S, Wang JM (1993) Some remarks on the growth-rate and angiogenesis of microvessels in ischemic stroke. Morphometric and immunocytochemical studies. *Patol Pol* 44:203–209.
- Krupinski J, Kaluza J, Kumar P, Kumar S, Wang JM (1994) Role of angiogenesis in patients with cerebral ischemic stroke. *Stroke* 25:1794–1798.
- Lacal PM, Tentori L, Muzi A, Ruffini F, Dorio AS, Xu W, Arcelli D, Zhang J, Graziani G (2009) Pharmacological inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase activity down-regulates the expression of syndecan-4 and Id-1 in endothelial cells. *Int J Oncol* 34:861–872.
- Lin TN, Wang CK, Cheung WM, Hsu CY (2000) Induction of angiopoietin and Tie receptor mRNA expression after cerebral ischemia-reperfusion. *J Cereb Blood Flow Metab* 20:387–395.
- Liu TH, Beckman JS, Freeman BA, Hogan EL, Hsu CY (1989) Polyethylene glycol-conjugated superoxide dismutase and catalase reduce ischemic brain injury. *Am J Physiol* 256:H589–H593.
- Liu G, Han J, Profirovic J, Strelakova E, Voyno-Yasenetskaya TA (2009) Alpha13 regulates MEF2-dependent gene transcription in endothelial cells: role in angiogenesis. *Angiogenesis* 12:1–15.
- Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25:402–408.
- Maasch C, Vater A, Buchner K, Purschke WG, Eulberg D, Vonhoff S, Klusmann S (2010) Polyethylenimine-polyplexes of Spiegelmer NOX-A50 directed against intracellular high mobility group protein

- A1 (HMGA1) reduce tumor growth in vivo. *J Biol Chem* 285:40012–40018.
- Maiti D, Xu Z, Duh EJ (2008) Vascular endothelial growth factor induces MEF2C and MEF2-dependent activity in endothelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 49:3640–3648.
- Mallolas J, Hurtado O, Castellanos M, Blanco M, Sobrino T, Serena J, Vivancos J, Castillo J, Lizasoain I, Moro MA, Davalos A (2006) A polymorphism in the EAAT2 promoter is associated with higher glutamate concentrations and higher frequency of progressing stroke. *J Exp Med* 203:711–717.
- Manoonkitiwongsa PS, Jackson-Friedman C, McMillan PJ, Schultz RL, Lyden PD (2001) Angiogenesis after stroke is correlated with increased numbers of macrophages: the clean-up hypothesis. *J Cereb Blood Flow Metab* 21:1223–1231.
- Massaad-Massade L, Navarro S, Krummrei U, Reeves R, Beaune P, Barouki R (2002) HMGA1 enhances the transcriptional activity and binding of the estrogen receptor to its responsive element. *Biochemistry* 41:2760–2768.
- Massaad-Massade L, Tacine R, Dulauroy S, Reeves R, Barouki R (2004) The functional interaction between HMGA1 and the estrogen receptor requires either the N- or the C-terminal domain of the receptor. *FEBS Lett* 559:89–95.
- Mattot V, Vercamer C, Soncin F, Calmels T, Huguet C, Fafeur V, Vandebunder B (2000) Constitutive expression of the ADN-binding domain of Ets1 increases endothelial cell adhesion and stimulates their organization into capillary-like structures. *Oncogene* 19:762–772.
- Messeguer X, Escudero R, Farre D, Nunez O, Martinez J, Alba MM (2002) PROMO: detection of known transcription regulatory elements using species-tailored searches. *Bioinformatics* 18:333–334.
- Navaratna D, Guo S, Arai K, Lo EH (2009) Mechanisms and targets for angiogenic therapy after stroke. *Cell Adh Migr* 3: 216–223.
- Nielsen SR, Hammer T, Gibson J, Pepper MS, Nisato RE, Dissing S, Tritsarlis K (2013) IL-27 inhibits lymphatic endothelial cell proliferation by STAT1-regulated gene expression. *Microcirculation*.
- Nizamutdinova IT, Kim YM, Jin H, Son KH, Lee JH, Chang KC, Kim HJ (2012) Tanshinone IIA inhibits TNF- α -mediated induction of VCAM-1 but not ICAM-1 through the regulation of GATA-6 and IRF-1. *Int Immunopharmacol* 14:650–657.
- Olave NC, Grenett MH, Cadeiras M, Grenett HE, Higgins PJ (2010) Upstream stimulatory factor-2 mediates quercetin-induced suppression of PAI-1 gene expression in human endothelial cells. *J Cell Biochem* 111:720–726.
- Olson EN (2004) Undermining the endothelium by ablation of MAPK-MEF2 signaling. *J Clin Invest* 113:1110–1112.
- Osanaï M, Chiba H, Kojima T, Fujibe M, Kuwahara K, Kimura H, Satoh M, Sawada N (2002) Hepatocyte nuclear factor (HNF)-4 α induces expression of endothelial Fas ligand (FasL) to prevent cancer cell transmigration: a novel defense mechanism of endothelium against cancer metastasis. *Jpn J Cancer Res* 93:532–541.
- Pierreux C (2010) Personal contribution to the study of the formation of the tubular epithelial structures. *Bull Mem Acad R Med Belg* 165:278–284.
- Qin J, Li MJ, Wang P, Zhang MQ, Wang J (2011) ChIP-array: combinatory analysis of ChIP-seq/chip and microarray gene expression data to discover direct/indirect targets of a transcription factor. *Nucleic Acids Res* 39:W430–W436.
- Reeves R (2001) Molecular biology of HMGA proteins: hubs of nuclear function. *Gene* 277:63–81.
- Reymann S, Borlak J (2008) Transcription profiling of lung adenocarcinomas of c-myc-transgenic mice: identification of the c-myc regulatory gene network. *BMC Syst Biol* 2:46.
- Romera C, Hurtado O, Botella SH, Lizasoain I, Cardenas A, Fernandez-Tome P, Leza JC, Lorenzo P, Moro MA (2004) In vitro ischemic tolerance involves upregulation of glutamate transport partly mediated by the TACE/ADAM17-tumor necrosis factor- α pathway. *J Neurosci* 24:1350–1357.
- Roskoski Jr R (2012) ERK1/2 MAP kinases: structure, function, and regulation. *Pharmacol Res* 66:105–143.
- Sandoval S, Pigazzi M, Sakamoto KM (2009) CREB: A key regulator of normal and neoplastic hematopoiesis. *Adv Hematol* 2009:634292.
- Shen F, Walker EJ, Jiang L, Degos V, Li J, Sun B, Heriyanto F, Young WL, Su H (2011) Coexpression of angiopoietin-1 with VEGF increases the structural integrity of the blood-brain barrier and reduces atrophy volume. *J Cereb Blood Flow Metab* 31:2343–2351.
- Shichiri M, Kato H, Doi M, Marumo F, Hirata Y (1999) Induction of max by adrenomedullin and calcitonin gene-related peptide antagonizes endothelial apoptosis. *Mol Endocrinol* 13:1353–1363.
- Shigekawa M, Takehara T, Kodama T, Hikita H, Shimizu S, Li W, Miyagi T, Hosui A, Tatsumi T, Ishida H, Kanto T, Hiramatsu N, Hayashi N (2011) Involvement of STAT3-regulated hepatic soluble factors in attenuation of stellate cell activity and liver fibrogenesis in mice. *Biochem Biophys Res Commun* 406:614–620.
- Sobrado M, Lopez MG, Carceller F, Garcia AG, Roda JM (2003) Combined nimodipine and citicoline reduce infarct size, attenuate apoptosis and increase bcl-2 expression after focal cerebral ischemia. *Neuroscience* 118:107–113.
- Sobrado M, Delgado M, Fernandez-Valle E, Garcia-Garcia L, Torres M, Sanchez-Prieto J, Vivancos J, Manzanares R, Moro MA, Pozo MA, Lizasoain I (2011) Longitudinal studies of ischemic penumbra by using 18F-FDG PET and MRI techniques in permanent and transient focal cerebral ischemia in rats. *Neuroimage* 57:45–54.
- Steinle JJ, Booz GW, Meininger CJ, Day JN, Granger HJ (2003) Beta 3-adrenergic receptors regulate retinal endothelial cell migration and proliferation. *J Biol Chem* 278:20681–20686.
- Stone KP, Kastin AJ, Pan W (2011) NF κ B is an unexpected major mediator of interleukin-15 signaling in cerebral endothelia. *Cell Physiol Biochem* 28:115–124.
- Suehiro J, Hamakubo T, Kodama T, Aird WC, Minami T (2010) Vascular endothelial growth factor activation of endothelial cells is mediated by early growth response-3. *Blood* 115:2520–2532.
- Sylvester PW (2011) Optimization of the tetrazolium dye (MTT) colorimetric assay for cellular growth and viability. *Methods Mol Biol* 716:157–168.
- Torregrosa G, SBBJ-MTAE (2012) Fisiopatología básica: de la oclusión arterial a la muerte neuronal. In: Montaner Joan, editor. Fisiopatología de la isquemia cerebral. Barcelona: ICG Marge, SL. p. 13–31.
- Urso K, Alfranca A, Martinez-Martinez S, Escolano A, Ortega I, Rodriguez A, Redondo JM (2011) NFATc3 regulates the transcription of genes involved in T-cell activation and angiogenesis. *Blood* 118:795–803.
- Valter MM, Hugel A, Huang HJ, Cavenee WK, Wiestler OD, Pietsch T, Wernert N (1999) Expression of the Ets-1 transcription factor in human astrocytomas is associated with Fms-like tyrosine kinase-1 (Flt-1)/vascular endothelial growth factor receptor-1 synthesis and neoangiogenesis. *Cancer Res* 59:5608–5614.
- Wang YF, Yu-Lee LY (1996) Multiple stat complexes interact at the interferon regulatory factor-1 interferon- γ activation sequence in prolactin-stimulated Nb2 T cells. *Mol Cell Endocrinol* 121:19–28.
- Walsh EM, Kim R, Del Valle L, Weaver M, Sheffield J, Lazarovici P, Marcinkiewicz C (2012) Importance of interaction between nerve growth factor and α 9 β 1 integrin in glial tumor angiogenesis. *Neuro Oncol* 14:890–901.
- Wood LJ, Mukherjee M, Dolde CE, Xu Y, Maher JF, Bunton TE, Williams JB, Resar LM (2000) HMG-I/Y, a new c-Myc target gene and potential oncogene. *Mol Cell Biol* 20:5490–5502.
- White LA, Bruzdinski C, Kutz SM, Gelehrter TD, Higgins PJ (2000) Growth state-dependent binding of USF-1 to a proximal promoter E box element in the rat plasminogen activator inhibitor type 1 gene. *Exp Cell Res* 260:127–135.
- Wu X, Kihara T, Hongo H, Akaike A, Niidome T, Sugimoto H (2010) Angiotensin receptor type 1 antagonists protect against neuronal

- injury induced by oxygen-glucose depletion. *Br J Pharmacol* 161:33–50.
- Yuan S, Pan Q, Fu C, Bi Z (2011) Silencing of HMGA1 expression by RNA interference suppresses growth of osteogenic sarcoma. *Mol Cell Biochem* 355:281–287.
- Yu-Lee LY, Hrachovy JA, Stevens AM, Schwarz LA (1990) Interferon-regulatory factor 1 is an immediate-early gene under transcriptional regulation by prolactin in Nb2 T cells. *Mol Cell Biol* 10:3087–3094.
- Zan L, Wu H, Jiang J, Zhao S, Song Y, Teng G, Li H, Jia Y, Zhou M, Zhang X, Qi J, Wang J (2011) Temporal profile of Src, SSeCKS, and angiogenic factors after focal cerebral ischemia: correlations with angiogenesis and cerebral edema. *Neurochem Int* 58:872–879.
- Zhang Z, Chopp M (2002) Vascular endothelial growth factor and angiotensins in focal cerebral ischemia. *Trends Cardiovasc Med* 12:62–66.
- Zhang ZG, Zhang L, Tsang W, Soltanian-Zadeh H, Morris D, Zhang R, Goussev A, Powers C, Yeich T, Chopp M (2002) Correlation of VEGF and angiotensin expression with disruption of blood-brain barrier and angiogenesis after focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 22:379–392.
- Zhang Y, Ma T, Yang S, Xia M, Xu J, An H, Yang Y, Li S (2011) High-mobility group A1 proteins enhance the expression of the oncogenic miR-222 in lung cancer cells. *Mol Cell Biochem* 357:363–371.
- Zhang Y, Huang S, Wang B, Sun B, Li W, Lu X, Ding X (2012) Atorvastatin and whisker stimulation synergistically enhance angiogenesis in the barrel cortex of rats following focal ischemia. *Neurosci Lett* 525:135–139.
- Zhao D, Desai S, Zeng H (2011) VEGF stimulates PKD-mediated CREB-dependent orphan nuclear receptor Nurr1 expression: role in VEGF-induced angiogenesis. *Int J Cancer* 128:2602–2612.
- Zhao QT, Xie K, Zhang J, Miao JY (2004) Progress of studies on VEC apoptosis-inducing proteins in snake venom and its mechanism—review. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi* 12:708–712.
- Zhong Y, Zhang B, Eum SY, Toborek M (2012) HIV-1 Tat triggers nuclear localization of ZO-1 via Rho signaling and cAMP response element-binding protein activation. *J Neurosci* 32:143–150.

VI DISCUSIÓN

VI. DISCUSIÓN

1 Modelos experimentales de isquemia cerebral

1.1 Modelos de isquemia cerebral *in vivo*

En esta tesis se han utilizado principalmente dos modelos de isquemia cerebral focal *in vivo*: el modelo de tMCAO y el modelo pMCAO. El modelo de tMCAO fue seleccionado para aquellos estudios en los que el objetivo fue analizar e identificar diferencias entre distintas zonas cerebrales con respecto al infarto a lo largo del tiempo después de la isquemia (análisis de la actividad de unión de los FTs y el análisis de las interacciones entre FTs). Este modelo se caracteriza por mostrar una extensión lenta del núcleo del infarto en la penumbra, permitiendo de este modo una zona de peri-infarto más extensa y consistente ²¹⁰. Por otro lado, para el resto de estudios, como el análisis de la expresión génica (a nivel de ARNm y proteína) y de localización celular y subcelular, se utilizó un modelo de pMCAO, debido a que este modelo el núcleo del infarto se expande hacia la penumbra más rápidamente, y a la vez permite obtener volúmenes de infarto más reproducible ²¹⁰.

1.2 Modelos de isquemia cerebral *in vitro*: optimización del protocolo de POG de las RBMVEC

Debido a la ausencia en la bibliografía de un protocolo estandarizado de isquemia cerebral *in vitro* para las RBMVEC, se tuvieron que optimizar las condiciones de POG en el contexto de nuestro estudio. Para el estudio de optimización se seleccionaron tres protocolos distintos de POG, basándonos en estudios previos realizados en el mismo tipo celular de especies similares ¹⁰⁵. Del análisis de este estudio se observó que el protocolo óptimo (entre

las condiciones testadas) consiste en 90 minutos de exposición a POG utilizando medio DMEM sin glucosa y medio de RBMVEC convencional durante la reperfusión (protocolo 3). Este protocolo promovió un aumento de viabilidad de las RBMVEC ($p < 0.001$, respecto al control) a los tres días después de la POG y destacó por no favorecer el aumento de la citotoxicidad en ninguno de los tiempos analizados, permitiendo mantener esta a niveles similares a los del control. Además, las RBMVEC tratadas con este protocolo mantuvieron la integridad del ARN hasta los cinco días de reperfusión. A partir de este protocolo de POG optimizado para las RBMVEC se comprobó la expresión de genes de inflamación y angiogénesis, observándose un aumento significativo ($p < 0,05$) de COX-2 a las 2 horas, 24 horas y 5 días de reperfusión y de VEGF a las 2 horas, 72 horas y 5 días. Finalmente, se analizó la estabilidad génica de potenciales genes endógenos para el modelo de POG definido y se concluyó que el gen *Sdha* es el óptimo para la normalización de los resultados de expresión génica realizados en el modelo optimizado.

2 Caracterización del FT Oct-2 en isquemia cerebral de rata

Con el objetivo de identificar nuevos FTs y conocer nuevos mecanismos de regulación implicados en la isquemia cerebral, se realizó un análisis de la actividad de unión de diferentes FTs mediante el ensayo *Multiplex transcription factor binding activity profiling*. Este ensayo es compatible con la tecnología Luminex xMAP® y permite analizar simultáneamente la actividad de unión de diferentes FTs en un formato cuantitativo y reproducible. Esta técnica es más fácil y rápida que un ensayo EMSA (del inglés *electrophoretic mobility shift assay*), es entre 5 y 10 veces más sensible que un ensayo colorimétrico de ELISA (del inglés *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*) y el análisis de múltiples sitios de unión simultáneamente mimetiza las condiciones *in vivo*. Entre los 50 TFs analizados, la familia octamer mostró cambios importantes y drásticos en su perfil de actividad de unión en las muestras isquémicas respecto

al control, tanto en la fase aguda como la crónica. Así pues, a partir del ensayo de la actividad de unión, de los 50 FTs analizados, seleccionamos la familia octamer. Las proteínas de unión a octamer (Oct), son una familia de cinco FTs clonados y bien caracterizados (Oct-1, Oct-2, Oct-3/4, Oct-6, y OCT-11) que reconocen el motivo octamer (5'-ATGCAAAT- 3'). Todos los miembros pertenecen a la familia de FTs Pit-Oct-Unc (POU), la cual se caracteriza por contener un dominio POU (que tiene una estructura bipartida: subdominio específico y homeo) que permite la unión de estos factores al ADN, modulando la actividad de genes diana específicos, críticos para el desarrollo temprano de los mamíferos ²¹¹. Dentro de esta familia, nos centramos en Oct-2, debido a que es el único miembro de la familia Oct que se expresa en el sistema nervioso central, específicamente en cerebro. Además, en la bibliografía está descrito que el gen Oct-2 presenta diferentes variantes transcripcionales con una variedad estructural y funcional característica ^{196,212,213}.

Oct-2 fue descrito inicialmente en linfocitos B ^{214,215} pero posteriormente se identificó su expresión en el sistema nervioso central embrionario en rata. Sin embargo, en las ratas adultas, su expresión está restringida al cerebro ²¹⁶. A pesar de que Oct-2 también se ha descrito en astrocitos ²¹⁷ y en células endoteliales microvasculares ²¹⁸, en la presente tesis nos hemos centrado en determinar la localización neuronal de la proteína Oct-2 en cerebro de rata control y sometida a isquemia, dado que diferentes laboratorios han demostrado la expresión de esta proteína en células neuronales de diferentes especies de mamíferos en condiciones control ²¹⁹⁻²²⁴. El análisis por inmunofluorescencia en cortes cerebrales de rata control e isquémica, mostraron una localización nuclear y citoplasmática de Oct-2 en neuronas, que fue ligeramente superior en el núcleo en condiciones de isquemia experimental (24 horas después de pMCAO). El incremento en el núcleo se observó en la zona que limita el borde del infarto. El análisis proteico por Western blot de Oct-2, en cambio, mostró un incremento de ésta en la fase crónica después de la isquemia. Estas diferencias entre los dos análisis seguramente se

debe al hecho de que pequeñas diferencias en regiones específicas de los cortes cerebrales observadas por inmunofluorescencia, se ven solapadas en el estudio proteico por Western blot, en el que se utilizan homogenados de tejido cerebral.

La proteína Oct-2 neuronal difiere de la proteína Oct-2 de las células B tanto en especificidad de secuencia como en la habilidad de activación génica ²²⁵. La proteína Oct-2 comprende un dominio de transactivación N-terminal, caracterizado por un dominio de unión a ADN bipartido ^{193,194}, y un dominio de transactivación C-terminal (CTD), indispensable para las funciones de Oct-2 *in vivo* ¹⁹⁵.

En ratón, el transcrito primario de ARN del gen Oct-2 está sujeto a *splicing* alternativo dando lugar a diferentes transcritos de ARNm con diferentes efectos en la expresión génica de los linfocitos B (isoformas Oct-2.1 y Oct-2.3) comparado con las células neuronales (isoformas Oct-2.4 y Oct-2.5). La inclusión (en la isoforma Oct-2.1) o exclusión (en Oct-2.4 y Oct-2.5) del CTD entero y la presencia de un dominio regulador negativo (NRD) (en la isoforma Oct-2.3) en el ARNm de Oct-2, determina la función transcripcional y el potencial de transactivación de la proteína ¹⁹⁴. Por esto, la identificación y el análisis individual de las diferentes variantes transcripciones de Oct-2, fue esencial para evitar malas interpretaciones debido al análisis de todos los transcritos conjuntamente. Por este motivo se utilizó la base de datos *Ensembl* (*release 69 - October 2012* y *release 70 - January 2013*) para predecir las isoformas de Oct-2 en rata (*Rattus norvegicus*) ^{161,162}. Durante la escritura de la presente tesis, la base de datos *Ensembl* fue actualizada y el *Ensembl release 69* cambió a *Ensembl release 70*, y los seis transcritos inicialmente descritos para el gen Oct-2 cambiaron a sólo tres (Oct-2_002, Oct-2_649, Oct-2_678). Sin embargo, en la presente tesis, se han considerado los seis transcritos inicialmente descritos (por el *Ensemble release 69*) para la caracterización de Oct-2 en isquemia cerebral de rata. El análisis de las variantes transcripcionales de Oct-2, mostró que cinco (Oct-2_002, Oct-2_649, Oct-2_678, Oct-2_651 y Oct-2_776) de las seis variantes

previstas con el *Ensembl*, se expresan en corteza cerebral de rata control e isquémica. Según las secuencias de *Ensembl* y la nomenclatura utilizada previamente para los transcritos de Oct-2 de ratón²¹³, los transcritos de rata corresponderían a Oct-2.5 (Oct-2_002), Oct-2.3 (Oct-2_649), y Oct-2.6 (Oct-2_678). Las isoformas Oct-2_651 y Oct-2_776 (según la nomenclatura de *Ensembl*), en cambio, no se correlacionaron con ningún transcrito previamente descrito en ratón, a pesar de que la isoforma Oct-2_651 muestra cierta semejanza estructural con el Oct-2.3 (el motivo NRD) y el transcrito Oct-2.5 (el dominio C-terminal truncado).

De acuerdo con el análisis bibliográfico^{195,196} y el alineamiento de las secuencias proteicas de las isoformas de Oct-2 (Figura 31 sección de resultados) para la identificación de los dominios, podemos definir que los transcritos Oct-2_678 (Oct-2.6) y Oct-2_649 (Oct-2.3), identificados en las muestras de cerebro de rata, podrían tener una actividad transcripcional activadora, ya que presentan un CTD completo. Por otro lado, los transcritos Oct-2_002 (Oct-2.5) y Oct-2_651, que carecen de un dominio CTD completo, realizarían una actividad transcripcional inhibitoria. Respecto al potencial transactivador de las diferentes isoformas de Oct-2, los transcritos Oct-2_678 y Oct-2_649, tendrían diferentes propiedades, debido a que el último contiene un NRD en su estructura. Según estudios previos^{196,197}, este motivo ejercería un efecto negativo sobre el dominio de activación N-terminal del transcrito Oct-2_649, afectando también al dominio C-terminal y provocando a la vez, un impacto general sobre el potencial de transactivación de la proteína. Debido a que el transcrito Oct-2_678 presenta un dominio CTD completo y su estructura carece del motivo NRD, se caracterizaría por presentar el potencial de transactivador más alto entre las variantes estudiadas en el presente trabajo.

Los resultados obtenidos en la presente tesis respecto a Oct-2 en cerebro de rata sometida a isquemia concuerdan entre ellos: (a) el perfil de expresión a nivel de ARNm de los transcritos de Oct-2 presenta un patrón muy similar, caracterizado por un aumento progresivo en la fase crónica de la isquemia (alrededor de los 7 días); (b) la expresión a nivel de la proteína

de Oct-2 se mostró incrementada a los 14 días después de la pMCAO; y (c) la inducción de la actividad de unión del FT Oct-2 (respecto al control) se observó a los 14 días después de la isquemia ²²⁶. En el caso del estudio proteico de Oct-2 se utilizaron dos anticuerpos distintos: Oct-2 sc-25400 (capaz de unirse a todas las isoformas) y Oct-2 sc-233 (específico para la isoforma Pou2f2-203). No fue posible analizar las proteínas resultantes de todas las variantes transcripcionales de Oct-2, debido a la ausencia de anticuerpos disponibles comercialmente. Respecto a los patrones de expresión tanto a nivel de ARNm como de proteína se ha podido observar que concuerdan, produciéndose un incremento del ARNm de Oct-2 a los 7 días que promueve un pico de expresión proteica a los 14 días después de la isquemia cerebral. Por otro lado, cabe destacar el particular perfil de expresión del transcrito Oct-2_678, caracterizado por un incremento drástico de la expresión a los 7 días después de la pMCAO. Finalmente, respecto al transcrito Oct-2_002, es la variante predominante en las muestras estudiadas, la cual de acuerdo con estudios previos en ratón ¹⁹⁴⁻¹⁹⁶, se caracterizaría por presentar una actividad transcripcional inhibitoria.

Estudios previos han sugerido que puede jugar un papel crítico en el desarrollo normal de los mamíferos ¹⁹⁴ y, en particular, en la supervivencia después del nacimiento ^{195,227}. Para continuar con la caracterización de Oct-2 y entender mejor las funciones que desempeña en cerebro, se realizó un array de interacciones entre FTs. Este análisis mostró que Oct-2 interacciona con diferentes FTs involucrados en procesos cerebrales importantes como el desarrollo neuronal y vascular y funciones celulares básicas (supervivencia, apoptosis, crecimiento, diferenciación y homeostasis). Concretamente, el presente estudio mostró evidencias que Oct-2 puede participar en la regulación del desarrollo vascular y la angiogénesis (a través de la interacción con ETS) ^{198,199}; en la supervivencia de neuronas recién diferenciadas y el desarrollo cardiovascular (a través de MEF) ²⁰⁰⁻²⁰²; en la muerte neuronal y la respuesta inflamatoria (a través de NFκB) ^{203,204}; en la proliferación, diferenciación y apoptosis celular (a través de MYC-MAX) ^{205,206}; y en los procesos de crecimiento, diferenciación, desarrollo y

homeostasis (a través de ERE y RXR(DR1))^{127,207-209}. Los resultados obtenidos del análisis de interacciones concuerdan con estudios previos en humanos²²⁸, en los que también se describen las interacciones de Oct-2 con otros FTs, como MEF, NF1 y receptores hormonales nucleares (RXR y VDR). Además, tal y como otros autores previamente han descrito²²⁸, Oct-2 es capaz de heterodimerizar con otros miembros de la familia Octamer, tal y como demuestra la interacción con el FT Oct-1 que se observa en la presente tesis. Por otro lado, también se observó que el perfil de interacciones de Oct-2 en condiciones de isquemia cambia respecto al observado en condiciones control. Sin embargo, este cambio no implica una disminución de la actividad transcripcional de Oct-2. La unión cooperativa del FT con diferentes factores puede resultar en un efecto represor (impidiendo la unión del FT a su secuencia diana) o en un efecto promotor (actuando como co-activadores) necesario para la unión y activación de las secuencias de los promotores diana²²⁹. De este modo, dependiendo de la función que ejerzan estas interacciones en el perfil de interacción de Oct-2, la disrupción de éstas llevará a la inhibición o activación de los genes diana. Por lo tanto, son necesarios estudios complementarios para conocer el papel específico de estas interacciones multi-proteicas.

Por otro lado, para investigar la función específica de Oct-2 en cerebro, se realizaron experimentos de silenciamiento génico en cultivo de neuronas corticales de rata, en condiciones control y se analizó la posible implicación de Oct-2 en la supervivencia neuronal y en el daño celular mediante el ensayo de citotoxicidad (comparación de la liberación de LDH entre el grupo de estudio y el grupo control). Los resultados obtenidos mostraron que existe una clara correlación entre la disminución de la expresión de Oct-2 y el incremento de la liberación de LDH del cultivo, en el grupo tratado con siRNA_Oct-2, respecto al grupo control. Estudios previos han demostrado que la liberación de LDH por parte de células necróticas o apoptóticas es proporcional al número de células dañadas^{230,231}, siendo un parámetro de lesión celular^{232,233}. De este modo, nuestros resultados muestran que una reducción en la

expresión de Oct-2 en las células neuronales se correlaciona con un ligero incremento del daño neuronal *in vitro*, lo que sugiere que Oct-2 parece estar implicado en la prevención de la citotoxicidad neuronal. Hemos observado una tendencia al incremento del daño neuronal en las neuronas tratadas con siRNA_Oct-2 des de los 4 hasta los 6 días después de la transfección. Seguramente, este ligero incremento observado es proporcional al porcentaje de disminución de la proteína Oct-2 obtenido, el cual fue del 20-30% comparado con el control. Estudios previos ya han puesto en evidencia el papel del FT Oct-2 en la promoción de la supervivencia neuronal. Se ha descrito que el factor de crecimiento neuronal (NGF) promueve un aumento (de 3-4 veces) de la expresión de Oct-2 en neuronas sensoriales de rata, sugiriendo que Oct-2 está implicado en la modulación de los efectos transcripcionales (promoviendo la supervivencia neuronal y previniendo la muerte neuronal) de este factor de crecimiento ^{234,235}. Además, también se ha expuesto que el FT Oct-2 está involucrado en la regulación de genes que codifican para diferentes proteínas sinápticas (SNAP-25 y sinapsina I) en células neuronales ²³⁶. En la presente tesis hemos encontrado que la isoforma Pou2f2-201 es la predominante en cerebro de rata isquémica, de este modo, hipotetizamos que esta variante transcripcional podría prevenir el daño neuronal directamente inhibiendo las vías de señalización que promueven la muerte celular como las descritas para Oct-4 y miR-125b/BAK1 ²³⁷. Por otro lado, también hemos demostrado que los transcritos Pou2f2-202 y Pou2f2-203 caracterizados por una actividad transcripcional activadora están sobre-regulados por la isquemia. Estas isoformas podrían reducir el daño neuronal activando las vías de señalización molecular que promueven la supervivencia celular (a través de la regulación directa de la expresión de bcl-2) ²³⁸. De este modo, el presente estudio es el primero en demostrar el potencial del FT Oct-2 para prevenir la toxicidad neuronal. Sin embargo experimentos adicionales son necesarios para comprender completamente cómo realiza este rol el FT de estudio: directamente (inhibiendo la muerte neuronal o activando vías de señalización que promuevan la supervivencia neuronal) o a través de la interacción con otros FTs (identificados

mediante el array de interacciones FT-FT) involucrados en la activación de procesos de homeostasis que promuevan la restauración de las funciones neuronales.

Por lo tanto, los resultados de los estudios funciones de Oct-2 de la presente tesis (array de interacciones entre FTs y los estudios de silenciamiento génico), sugieren que el FT Oct-2 está involucrado en contrarrestar los mecanismos responsables del daño neuronal, lo cual indica que podría disminuir la progresión del infarto en la fase tardía, cuando se observa la máxima expresión. De este modo, parece que la sobreexpresión del FT Oct-2 podría jugar un papel en la recuperación funcional patofisiológica después de la isquemia cerebral. En la fase aguda, la inducción de la expresión de Oct-2 podría ser beneficiosa para reducir la muerte neuronal modulada por la isquemia y promover la supervivencia neuronal, siendo también una potencial terapia cerebro-protectora útil en las primeras horas después del ictus²²⁶.

3 Caracterización de HMG1Y en isquemia cerebral de rata

Los factores de transcripción son componentes importantes de las cascadas de señalización que controlan todo tipo de procesos celulares tanto fisiológicos como fisiopatológicos. Mientras los estudios funcionales de factores de transcripción pueden proporcionar pistas indirectas sobre genes regulados por un único factor de transcripción bajo unas condiciones experimentales concretas, es sólo a través del análisis de los sitios de unión de factores de transcripción que podemos entender los mecanismos de regulación, incluyendo la regulación coordinada por múltiples factores que actúan conjuntamente, e identificar y caracterizar de modo efectivo mutaciones que alteran los mecanismos de regulación¹⁶⁰. Debido a que hay pocos sitios de unión experimentalmente caracterizados, comparado con el número total de sitios de unión esperados, la habilidad de predecir sitios de unión aún no

caracterizados es una herramienta fundamental y sin precedentes en la búsqueda y la comprensión de los procesos fisiológicos y de enfermedad ^{160,175}.

Con el fin de identificar potenciales factores de transcripción involucrados en la angiogénesis después del ictus, realizamos un análisis bioinformático para encontrar señales de regulación transcripcional comunes entre los promotores de genes candidatos implicados en diferentes procesos angiogénicos. A partir de este estudio seleccionamos el FT HMGIY, debido a que se observó que los promotores de diferentes genes candidatos compartían el mismo TFBS para esta proteína, indicando que HMGIY podría unirse a estos genes diana y modular (activando o inhibiendo) su expresión. Concretamente el TFBS para HMGIY se encontró en genes involucrados en (1) la regulación de la estimulación y supervivencia de las células endoteliales, (2) en genes que codifican para FT que modulan funciones angiogénicas (regulación de la proliferación, supervivencia, diferenciación y maduración de las células endoteliales), (3) en genes inflamatorios, y (4) en receptores de superficie celular.

El FT HMGIY (también llamado HMGA1) es un miembro de la superfamilia de proteínas del grupo de alta movilidad (del inglés *high mobility group*), caracterizada por contener aminoácidos ácidos (al extremo carboxi-terminal) importantes para las interacciones proteína-proteína ²³⁹. HMGIY, pertenece a la familia A que comprende cuatro miembros codificados por dos genes: *HMGA1* y *HMGA2* ²³⁹⁻²⁴³. El *splicing* alternativo del gen *HMGA1* da lugar a las variantes mayoritarias HMGA1a (HMG-I) y HMGA1b (HMG-Y), y a HMGA1c, la variante minoritaria. Las proteínas HMGA son relativamente abundantes en las células embrionarias indiferenciadas en proliferación e indetectables en células completamente diferenciadas ²³⁹. Son proteínas nucleares ubicuas que se unen al ADN e inducen cambios estructurales en las fibras de cromatina y el nucleosoma, actuando como arquitectos de la transcripción y regulando la expresión de numerosos genes *in vivo* ^{239,243}. Como consecuencia, en la célula funcionan como nodos conectores de interacciones entre proteína-ADN y proteína-proteína que influyen

en una gran variedad de procesos biológicos y fisiológicos incluyendo el crecimiento, la proliferación, la diferenciación y la muerte celular^{243,244}. Asimismo, también participan en procesos fisiopatológicos, regulando la transcripción de genes virales y promoviendo la progresión tumoral y los procesos de metástasis cuando hay una sobreexpresión celular de estas proteínas. Los niveles altos y constitutivos de la proteína HMGIY son una de las características más consistentes que se observan en todos los tipos de cáncer. Además un incremento de la concentración de esta proteína se correlaciona con un aumento de la malignidad^{243,244}. Así pues, teniendo en cuenta las características y funciones del FT HMGIY (controlando muchos aspectos de la actividad nuclear en condiciones fisiológicas y patológicas) y los resultados del análisis bioinformático, procedimos a su caracterización en el cerebro isquémico de rata.

Los resultados de la caracterización de HMGIY en cerebro de rata revelan que este FT está regulado por la isquemia cerebral, con una expresión aumentada desde la fase aguda hasta la crónica, persistiendo al menos hasta los 14 días después de la isquemia (último tiempo estudiado en este trabajo). Además, el estudio por inmunofluorescencia indicó que la expresión proteica de HMGIY se localiza en células neuronales y endoteliales tanto en cerebro de rata control como en condiciones de isquemia. Este es el primer estudio que describe la expresión de HMGIY en cerebro de rata control y sometida a isquemia¹²⁵.

Con el fin de identificar las posibles vías de señalización en las que está involucrado el FT de estudio, se analizó el perfil de interacción de HMGIY en corteza cerebral de rata sometida a isquemia. Para este análisis se utilizaron extractos nucleares de cerebro de rata control y sometida a isquemia (sacrificadas a las 6 horas y a los 14 días de reperusión). Se escogieron estos dos tiempos, debido a que se observó una expresión diferencial de HMGIY (a nivel de ARNm) entre las 6 horas y los 14 días después de la isquemia, en el estudio por qPCR. El análisis de los resultados de este ensayo mostró que la isquemia induce cambios en el perfil de

interacciones de HMGIY entre los diferentes tiempos después de la isquemia analizados. Concretamente, a las 6 horas de reperfusión se observó un aumento de interacciones con FTs involucrados en la modulación e inducción de procesos de reparación cerebral, respecto al perfil de interacción de HMGIY a los 14 días post-isquemia. Estos factores están involucrados en la regulación de la adhesión, la activación, la supervivencia, la diferenciación y la apoptosis de las células endoteliales (ETS, Myc-Max, CREB, GATA, p53, NFATC, STAT1, STAT3, STAT4, USF1, HNF, MEF2, PBX, OCT-1, ERE, E2F1, NFKB), en la activación de procesos angiogénicos (ETS, MEF2, STAT3, NFATC), en la regulación de factores solubles (ETS, AP2, STAT3), de genes de respuesta inmediata (GRI) (ETS, IRF1, USF1) y de receptores de superficie celular (CREB) (ver las referencias correspondientes en la Tabla 26 de la sección V). Por otro lado, las interacciones con el FT Myc-max²⁴⁵; los FTs HNF, CREB, MEF2 y OCT-1²⁴⁶; el FT GATA^{247,248}; el FT p53²⁴⁹; el FT ERE^{250,251} y el FT AP-2²⁵², encontradas en el presente ensayo, ya fueron previamente descritas por otros autores, sin embargo no fueron estudiadas en condiciones de isquemia cerebral. Estos resultados sugieren que los genes que modulan y controlan procesos de plasticidad cerebral se activan a las pocas horas después del ictus. Nuestros datos concuerdan con estudios previos en los cuales se ha descrito que los mecanismos de reparación cerebral empiezan en la fase aguda de la isquemia cerebral¹⁰⁶ y que el proceso angiogénico en el cerebro infartado se inicia alrededor de las 6-12 horas después de la isquemia experimental¹¹⁹.

Una vez caracterizado el FT HMGIY en el contexto de la isquemia cerebral de rata, el estudio se centró en la identificación de las posibles dianas de HMGIY. Teniendo en cuenta los resultados del análisis bioinformático que identificó TFBS para HMGIY en los promotores de los genes ANGPT-1 y VEGF (Tablas 16 y 21 de la sección de resultados) se seleccionaron estos genes para el análisis del posible rol de HMGIY en la modulación de genes involucrados en procesos angiogénicos¹²⁵.

Se ha descrito que tanto VEGF como ANGPT-1 son moduladores clave de la integridad de la barrera hematoencefálica y de la formación de nuevos vasos, realizando funciones complementarias ²⁵³. Se ha demostrado que su expresión es inducida y variable durante el daño cerebral isquémico ²⁵⁴⁻²⁵⁷ y experimentos *in vivo* han descrito que VEGF y ANGPT-1 pueden tener un papel vital en la regulación de la angiogenesis después de un ictus isquémico ²⁵⁶.

Con el fin de validar la regulación transcripcional de estos genes por parte de HMGIY se silenció este FT en las RBMVEC mediante experimentos de transfección de siRNA y se analizó si variaba la expresión de los genes diana en las células con una expresión disminuida de HMGIY. La técnica de transfección del siRNA contra HMGIY se utilizó en condiciones control para minimizar la complejidad del estudio. Para poder silenciar la expresión del FT HMGIY en las RBMVEC, se optimizaron las condiciones de transfección de los siRNAs en el sistema celular de estudio a fin de seleccionar el reactivo de transfección capaz de promover una mayor eficiencia de transfección y una menor tasa de citotoxicidad, y las concentraciones de siRNA más adecuadas. Una vez optimizado el protocolo de transfección, se silenció el gen que codifica para el FT HMGIY y se analizó la expresión de los posibles genes diana seleccionados (VEGF y ANGPT-1) involucrados en angiogénesis. En el estudio de la evaluación de la variabilidad en la expresión génica y proteica de las potenciales dianas del FT, se observó una disminución significativa ($p < 0,05$) de la expresión de ANGPT-1 y VEGF a nivel del ARNm y de proteína en las células transfectadas con el siRNA_HMGIY respecto al grupo control. Los resultados de este estudio reafirman la idea de que la expresión de estas proteínas angiogénicas está regulada por HMGIY. En este contexto, éste es el primer estudio en el que las proteínas VEGF y ANGPT-1 se han definido como potenciales dianas del FT HMGIY ¹²⁵.

Estudios previos han descrito que la co-expresión de ambas proteínas en un modelo de isquemia permanente en ratón (pMCAO), reduce la fragilidad de los vasos y el edema causado

por VEGF en la fase aguda (VEGF promueve la permeabilidad vascular), lo cual también promueve una reducción del volumen de infarto ²⁵⁸. En la fase crónica esta co-expresión mejora el pronóstico induciendo la formación de nuevos vasos más resistentes y permitiendo el crecimiento y la diferenciación de células madre/progenitoras neuronales ²⁵⁸. Además, otros estudios han postulado que las estrategias terapéuticas que tienen el objetivo de estimular tanto la expresión de VEGF como ANGPT-1 son más efectivas en promover el proceso angiogénico que aquellas que sólo estimulan una única vía de señalización ²⁵⁶.

Por lo tanto, los resultados de la presente tesis sugieren que el FT HMG1Y puede ser una interesante diana terapéutica debido a que es capaz de modular conjuntamente las proteínas VEGF y ANGPT-1 promoviendo procesos angiogénicos (los cuales participan en la plasticidad cerebral y la cerebrotreparación tras un período de lesión, como el ictus) ¹²⁵.

Finalmente, con el objetivo de determinar el rol específico de HMG1Y en la angiogénesis, se procedió a la evaluación de tres procesos esenciales que participan en el mecanismo de la angiogénesis ^{5,259,260}, utilizando las RBMVEC tratadas con siRNA_HMG1Y: la viabilidad, la migración y la invasión de las células endoteliales. Este análisis reveló que la disminución de la expresión de HMG1Y en las RBMVEC no promueve cambios en la degradación de la matriz extracelular que rodea el vaso por parte de las células endoteliales (capacidad invasiva), ni en el proceso de movilidad direccionalmente regulado por estímulos quimiotácticos (capacidad de migración). Sin embargo, nuestros resultados demuestran que el FT HMG1Y está involucrado en la proliferación de células endoteliales, proceso necesario para el ensamblaje de nuevos vasos y para la formación del lumen, durante el proceso de la angiogénesis ^{5,260}. Por lo tanto, concluimos que HMG1Y promueve la viabilidad de las células endoteliales, mientras que no interfiere en los procesos de migración e invasión celular, al menos en las condiciones experimentales utilizadas y en el curso temporal analizado en la presente tesis ¹²⁵. Estos hallazgos concuerdan con estudios previos ^{261,262}, los cuales también describieron cambios en

algunas (pero no todas) de las fases del proceso de la angiogénesis. Para simplificar el análisis y evitar interpretaciones erróneas en los resultados debido al exceso de estímulos (POG, transfección de siRNA y protocolo de migración e invasión) los estudios funcionales se realizaron en condiciones control.

Los resultados que hemos obtenido respecto a HMG1Y concuerdan con estudios previos realizados en el campo de la oncología en los que se describe que HMG1Y inhibe las funciones de proteínas involucradas en la apoptosis, incrementa la expresión de miRNAs oncogénicos, promueve la supervivencia celular y estimula el potencial de crecimiento y la metástasis en células de cáncer específicas ²⁶³⁻²⁶⁵. Por lo tanto, parece que las diferencias en la viabilidad celular observadas en las RBMVEC con una expresión disminuida de HMG1Y, están estrechamente relacionados con la capacidad de este FT de promover la progresión y malignidad tumoral tal y como previamente se ha descrito ^{266,267}.

Por lo tanto, en el presente trabajo, se ha identificado HMG1Y como un nuevo FT en isquemia cerebral que modula la expresión de los genes VEGF y ANGPT-1 y promueve la viabilidad de las células endoteliales en cerebro de rata ¹²⁵. Sin embargo, aún queda por investigar si el efecto observado en la supervivencia celular endotelial, está promovido directamente por HMG1Y o indirectamente a través de las proteínas diana. A pesar de esto, los resultados de la presente tesis claramente apuntan a HMG1Y como un regulador del proceso angiogénico y, como tal, una potencial diana terapéutica en la fase de reparación después de la isquemia cerebral. Sin embargo estudios complementarios son necesarios para determinar si estas funciones también se observan en condiciones de isquemia cerebral *in vivo*.

4 Discusión conjunta

Los factores de transcripción son proteínas muy especializadas que reconocen secuencias específicas de DNA en la región reguladora de todos los genes. La unión de estos factores a esta región promotora regula, positiva o negativamente, la expresión y la subsecuente producción de la proteína codificada por el gen en cuestión. Es decir, los factores de transcripción son elementos vitales que regulan la transcripción y la expresión espacio-temporal de los genes, asegurando de este modo el desarrollo y el funcionamiento de un organismo ²⁶⁸. En el proceso fisiopatológico, los FTs son las proteínas responsables de regular la expresión de los genes que participan en los eventos moleculares que subyacen a la enfermedad. En el ámbito de la investigación biomédica, cada año se realiza una elevada inversión económica que se destina al estudio de nuevos fármacos para el tratamiento de diferentes patologías (estudios clínicos) ²⁶⁹. Sin embargo, la gran mayoría de los potenciales fármacos que resultan ser óptimos en los estudios de modelos animales (fase pre-clínica) y son aceptados para iniciar los estudios clínicos, no consiguen terminar las diferentes fases de los ensayos clínicos (en los que se valora principalmente la eficacia y la seguridad del fármaco). En el contexto del ictus, por ejemplo, en los últimos veinte años, se han testado más de 1000 compuestos (potenciales neuroprotectores) en modelos animales de isquemia cerebral pero de los 114 que han sido aceptados para ser testados en humanos mediante ensayos clínicos ninguno de ellos ha conseguido ser eficiente en un ensayo de fase III hasta el momento ³⁴. Para solventar esta falta de traslación ⁴⁶ entre los estudios preclínicos en modelos animales y los ensayos clínicos en humanos, en los últimos años se ha demostrado que la comprensión de los genes que subyacen los procesos fisiopatológicos es importante para diseñar nuevas y mejores estrategias terapéuticas. De este modo, en el contexto fisiopatológico, la comprensión y conocimiento de la red transcripcional (mapa transcriptómico) que regula y subyace los mecanismos moleculares de la enfermedad, es esencial para abordar dicha cuestión ²⁷⁰, ya que

permitirá por un lado identificar y entender la base molecular de dicha enfermedad, y por otro lado diseñar nuevas estrategias terapéuticas más óptimas ^{271,272}.

La plasticidad cerebral o cerebroteparación es la capacidad endógena del cerebro para restaurar las funciones neurológicas mediante pequeños cambios estructurales con el fin de reducir los déficits cerebrales después de una lesión cerebral ²⁷³. En el contexto del ictus, diferentes laboratorios han demostrado que después del daño isquémico se activan dichos procesos endógenos, con el fin de minimizar la lesión cerebral. Por lo tanto, el uso de la cerebroteparación endógena como herramienta terapéutica, puede ser una alternativa a las limitaciones que ofrecen los tratamientos convencionales para el ictus (tratamiento trombolítico y neuroprotección). Sin embargo, por sí sola, esta capacidad de remodelación endógena del sistema nervioso central no es suficiente para restaurar las funciones neurológicas después de una lesión, como el daño isquémico ¹¹³. Por lo tanto, es necesario identificar los mecanismos moleculares que regulan y promueven este proceso a fin de desarrollar nuevas estrategias terapéuticas efectivas basadas en el uso de la cerebroteparación endógena. Así pues, el estudio de los genes que participan en la modulación del proceso isquémico o en los procesos de cerebroteparación endógena, juntamente con sus reguladores transcripcionales, puede ser la base para identificar o desarrollar nuevas opciones terapéuticas que solventen las limitaciones que ofrecen las terapias actualmente utilizadas para el tratamiento del ictus ^{274,275}.

Por este motivo, en la presente tesis hemos integrado, en el contexto de la enfermedad cerebrovascular, el estudio de ambos aspectos. Por un lado el estudio de los mecanismos cerebroteparadores, a través del estudio de los genes implicados en los mismos; y por otro lado, el estudio de la regulación de dichos procesos mediante la identificación y análisis de los factores de transcripción que los regulan. Concretamente hemos estudiado y caracterizado dos reguladores transcripcionales implicados tanto en la regulación

de procesos moleculares como de los procesos cerebrosreparadores en el ictus, con el objetivo de ampliar el conocimiento del sustrato biológico de la enfermedad y así poder diseñar nuevos fármacos o estrategias terapéuticas en base a éste.

En el presente trabajo hemos utilizado dos técnicas de cribaje para la identificación de FTs implicados en la regulación de procesos moleculares y cerebrosreparadores en el ictus: el análisis bioinformático ¹²⁵ (para la identificación de FTs implicados en angiogénesis) y el ensayo *Multiplex Transcription Factor Profiling* ²²⁶ (para la identificación FTs con una actividad de unión diferencial tras la isquemia cerebral). Los resultados obtenidos en este cribaje han puesto de manifiesto que la isquemia constituye un escenario dónde actúan una multitud de factores de transcripción los cuales presentan una expresión génica diferencial y una actividad de unión característica. A partir de estos dos estudios iniciales, hemos seleccionado, caracterizado y validado dos factores de transcripción que modulan la respuesta cerebral isquémica y los procesos cerebrosreparadores desencadenados tras el ictus. Concretamente, seleccionamos el FT HMGIY debido a que se observó que los promotores de diferentes genes candidatos involucrados en angiogénesis compartían el mismo TFBS para esta proteína ¹²⁵. Por otro lado, se seleccionó el FT Oct-2 debido a que es el único miembro de la familia octamer que se expresa en el sistema nervioso central (específicamente en cerebro) ²¹⁶ y que mostró cambios importantes y drásticos en su perfil de actividad de unión en condiciones de isquemia ²²⁶. Sin embargo, es importante destacar que en este estudio se han identificado otros FTs cuyo papel está aún por explorar y que también podrían ser esenciales para la regulación de algunos procesos moleculares del ictus.

Así pues, en la presente tesis se han identificado y caracterizado dos factores de transcripción implicados en la isquemia cerebral: Oct-2 y HMGIY.

Cabe destacar que este es el primer trabajo en el que se estudia la familia Octamer, concretamente el FT Oct-2, en el contexto de la isquemia cerebral. En esta tesis se muestra

que la isquemia induce diferencias en la actividad de unión y en la expresión génica de Oct-2 en la fase aguda y crónica de la isquemia. También se describe la localización neuronal de Oct-2 y su interacción con otros FTs en cerebro de rata control y sometida a isquemia. Los resultados evidencian que la respuesta modulada por Oct-2 tiene un papel beneficioso en las funciones fisiológicas neuronales, lo que sugiere que podría estar implicado en la reducción del daño neuronal y en la promoción de la supervivencia neuronal en el contexto de la isquemia cerebral ²²⁶.

Por otro lado, también se ha identificado HMGIY, como un nuevo FT involucrado en la isquemia cerebral. Se ha observado que la isquemia induce un aumento de la expresión proteica de HMGIY y un incremento de sus interacciones con otros FTs que modulan funciones cerebroreparadoras ¹²⁵.

En los estudios funcionales de la presente tesis se ha analizado la función de los FTs HMGIY y Oct-2 en cerebro mediante la inhibición de su expresión *in vitro* (en cultivos de células cerebrales). Para este fin, se eligió la técnica de silenciamiento génico transitorio mediante siRNA sintéticos debido a que es un método relativamente sencillo y adecuado para la realización de ensayos cortos (menos de siete días). Concretamente, se seleccionaron los SMART pool siRNAs ON-TARGETplus (comercializados por Dharmacon), que consisten en una combinación de 3-4 siRNAs sintéticos distintos dirigidos contra un mismo gen produciendo un silenciamiento altamente específico gracias al conjunto de secuencias del 'pool' y a la baja tasa de silenciamiento inespecífico asociada ²⁷⁶. Los resultados obtenidos en estos estudios han mostrado que existe una clara correlación entre la reducción en la expresión del FT Oct-2 en las células neuronales corticales de rata y un incremento de la liberación de LDH del cultivo, lo cual se correlaciona con un incremento del daño neuronal *in vitro*. Esto sugiere que Oct-2 parece estar implicado en la prevención de la citotoxicidad neuronal. Respecto a HMGIY se ha observado que existe una estrecha relación entre la expresión de este FT y la expresión de las

proteínas ANGPT-1 y VEGF en células endoteliales de microvasculatura cerebral de rata. Además, el análisis del potencial angiogénico del FT HMGIY se completó mediante la evaluación de tres procesos esenciales que participan en este mecanismo: la viabilidad, la migración y la invasión de las células endoteliales *in vitro*. De este estudio se ha concluido que HMGIY promueve la viabilidad de las células endoteliales, mientras que no interfiere en los procesos de migración e invasión celular, al menos en las condiciones experimentales utilizadas en la presente tesis. De este modo se ha demostrado una asociación entre HMGIY y proteínas angiogénicas así como su capacidad de promover la viabilidad de las células endoteliales cerebrales.

Por lo tanto, la identificación y caracterización de los nuevos FTs Oct-2 y HMGIY como potenciales dianas terapéuticas en el contexto de la isquemia cerebral permite ampliar tanto el conocimiento de las bases moleculares y genéticas de la enfermedad, como de los mecanismos moleculares que modulan los procesos endógenos de la cerebroreparación, a la vez que establecer las bases del diseño de nuevos fármacos y estrategias terapéuticas que promuevan estos procesos.

VII CONCLUSIONES

VII. CONCLUSIONES

1. La identificación y caracterización de factores de transcripción implicados en isquemia cerebral y cerebroreparación ha puesto de manifiesto la existencia de una red compleja de FTs que modulan un amplio espectro de vías de señalización en respuesta al estímulo isquémico.
2. Mediante análisis bioinformático y cribaje de la actividad de unión de FTs se han identificado los factores de transcripción Oct-2 y HMGIY implicados en la regulación de procesos moleculares en el ictus.
3. El FT Oct-2 tiene una localización neuronal y HMGIY se expresa en células neuronales y endoteliales tanto en condiciones control como isquémicas
4. La isquemia cerebral promueve el aumento de la expresión de Oct-2 y HMGIY en la corteza cerebral de rata desde la fase aguda hasta la fase crónica, aumenta la actividad de unión del FT Oct-2 en la fase crónica y produce cambios en el perfil de interacciones de Oct-2 y HMGIY con otros factores de transcripción modulando procesos fisiológicos (Oct-2) y mecanismos de reparación cerebral (Oct-2 y HMGIY).
5. El análisis bioinformático ha demostrado ser una herramienta útil para la identificación de genes candidatos y sus dianas, permitiendo identificar HMGIY como FT implicado en angiogénesis (cerebroreparación) y a los genes VEGF y ANGPT-1 como dianas de este FT.
6. Mediante el silenciamiento génico transitorio con siRNAs se ha demostrado que el FT HMGIY modula la expresión de ANGPT-1 y VEGF y promueve la viabilidad de las células endoteliales de microvasculatura cerebral de rata *in vitro*. Los resultados del análisis funcional evidencian que el FT Oct-2 está implicado en la prevención del daño neuronal y la citotoxicidad *in vitro*.

CONCLUSIONES

7. Se ha optimizado un modelo experimental de isquemia cerebral *in vitro* (POG) con células endoteliales de microvasculatura cerebral de rata consiguiendo mantener la supervivencia celular hasta 5 días tras la reperusión

8. El análisis y caracterización de los FTs seleccionados y validados en la presente tesis, ha permitido describir nuevos mecanismos moleculares que regulan tanto la respuesta cerebral isquémica como procesos cerebrosreparadores tras el ictus (angiogénesis).

VIII ANEXOS

ANEXO I

Medios de cultivo para RBMVEC

A) Medio de cultivo convencional:

Composición:

- Medio de crecimiento RBMVEC comercial (con suplemento) ^a
- 2 % penicilina/estreptomicina (5000 UI/ml; 5000 µg/ml) ^b

B) Medios y tampones utilizados para la optimización de la POG

B.0 Tampón fosfato salino (PBS) ^b

B.1 Protocolo 1

- Medio POG: solución de Krebs

Composición (en mM)	
NaCl ^c (119)	NaHCO ₃ ^c (25)
KCl ^c (4,7)	CaCl ₂ ^c (2,5)
KH ₂ PO ₄ ^c (1,2)	MgCl ₂ ^c (1)

- Medio post-reperfusión: solución de Krebs y glucosa ^c (5 mM)

B.2 protocolo 2

-Medio POG: medio mínimo esencial de Dulbecco (DMEM) libre de glucosa ^b

-Medio post-reperfusión: DMEM ^b y glucosa ^c (5 mM)

B.3 protocolo 3

-Medio POG: medio mínimo esencial de Dulbecco (DMEM) libre de glucosa ^b

-Medio post-reperfusión: medio convencional para RBMVEC (ver apartado A del apéndice)

ANEXO II

Medios de cultivo para RN

A) Obtención de cultivo de RN: Solución de lavado de fetos

Composición	
NaCl ^c	155 mM
Na ₂ HPO ₄ (2H ₂ O) ^c	8 mM
KCl ^c	2,7 mM
KH ₂ PO ₄ ^c	1,5 mM
NaHCO ₃ ^c	2,6 mM
En H ₂ O estéril, ajustando el pH a 7,4	

B) Medio de crecimiento convencional (MC)

Composición	
Glucosa ^c	33 mM
Glutamina ^c	2 mM
Gentamicina ^c	16 mg/l
HS ^{e*}	10%
FBS ^{e**}	10%
En EMEM ^{e***}	

*suero de caballo (HS); **suero bovino fetal (FBF); ***medio esencial mínimo de Eagle (EMEM)

C) Medios y tampones utilizados para la POG

C.1 Medio POG:

Composición (en mM)	
NaCl (130)	NaHCO ₃ (26)
KCl (5,4)	CaCl ₂ (1,8)
NaH ₂ PO ₄ (1,18)	MgSO ₄ (0,8)

+ 2% HS

C.2 Medio post-reperfusión:

Composición	
MEM	Penicilina (50UI/ml)
Glucosa (0,6%)	Estreptomicina (50µg/ml)
Glutamina (0,029%)	HS (10%)

ANEXO III

Electroforesis en gel de agarosa

A) Preparación del gel de agarosa:

A.1 Tampón TAE (Tris-Acetato-Ácido etilendiaminotetraacético (EDTA)) 50X

Composición (para 1 L)	
Tris ^c	242 g
Ácido acético glacial ^c	57,1 ml
EDTA 0,5 M* ^c	100 ml
H ₂ O destilada (hasta llegar a 1 L)	

* ácido etilendiaminotetraacético

A.2 Tampón TAE 1X

Composición (para 1 L):

-20 ml de Tampón TAE 50x (ver apartado A.1)

-980 ml H₂O destilada

ANEXO IV

Western blot SDS-PAGE

A) Preparación del gel:

A.1 Gel de separación

Composición	
Acrilamida 30% ^d	4,95 ml
H ₂ O destilada	6,15 ml
Tris 1,5 M pH 8,8*	3,75 ml
SDS 10%** ^d	150 µl
persulfato amónico (10%) ^d	75 µl
TEMED ^d	7,5 µl

*181,5 g Tris en 800 ml de H₂O; ** del inglés *sodium dodecyl sulfate*

A.2 Gel de acumulador

Composición	
Acrilamida 30%	850 µl
H ₂ O destilada	2,85 ml
Tris 0,5 M pH 6,8*	1,25 ml
SDS 10%	50 µl
persulfato amónico (10%)	25 µl
TEMED	5 µl

*30 g Tris en 500 ml de H₂O

B) Preparación de las muestras

B.1 Cóctel de homogeneización 7X

Composición:

-Cóctel inhibidor de proteasas (*tablets EASY packs*)^f

-Lysis Buffer^g

B.2 Cóctel de homogeneización 1X

Composición:

-Cóctel de homogeneización 7X (14,3%) en H₂O

B.3 Laemmli

C) Tampón de electroforesis**C.1 Tampón de electroforesis 10X (TE 10X)**

Composición	
Tris	30,3 g
Glicina ^c	144 g
SDS	1 g
H ₂ O	1 l
Ajustar a pH 8,3	

C.2 Tampón de electroforesis 1X (TE 1X)Composición:

-100 ml de TE 10X en 900 ml de H₂O

D) Tampón de transferenciaComposición:

-100 ml de TE 10X en 900 ml de H₂O

ANEXO V

Inmunofluorescencia

A) Procesamiento de las muestras: preparación de los cortes cerebrales

A.1 Líquido anticongelante

Composición

-320 mL PBS 1X (pH 7,4) ^b

-240 mL etilenglicol (30%) ^c

-240 mL glicerol (30%) ^c

B) Desenmascaramiento antigénico:

B.1 Tampón citrato

Composición para 1L	
Ácido cítrico 0,1 M ^c	95 ml
Citrato sódico 0,1 M ^c	415 ml
H ₂ O destilada	490 ml
Ajustar a pH 6	

C) Lavados:

C.1 Tampón 1: antes del desenmascaramiento

PBS

C.2 Tampón 2: después de la incubación del anticuerpo 1^{ro}

Composición:

-0,25% Tritón-X-100 ^d en KPBS

D) Permeabilización y bloqueo

D.1 Solución de bloqueo

Composición	
BSA	5%
Tritó-X-100	0,25%
En KPBS	

E) Dilución de los anticuerpos

E.1 Primarios

Solución de bloqueo (ver apartado C.1)

E.2 Secundarios

Composición	
BSA	2%
Tritó-X-100	0,25%
En KPBS	

ANEXO VI

Array de interacciones FT-FT

A) Immunoprecipitación y elución

A.1 IP Wash Buffer 1X (15 ml)

Composición:

-3 ml de 5X IP Wash Buffer (del kit) en 12 ml H₂O destilada

B) Hibridación

B.1 Lavado 1: SSC 2X/SDS 0,5% (300 ml)

Composición	
SSC 20X	30 ml
SDS 20%	7,5 ml
H ₂ O destilada	262,5 ml

B.2 Lavado 2: 0,1X SSC/0,5% SDS (300 ml)

Composición	
SSC 20X	1,5 ml
SDS 20%	7,5 ml
H ₂ O destilada	291 ml

C) Detección y análisis

C.1 Blocking Buffer 1X (60 ml)

Composición:

-30 ml de Blocking Buffer 2X en 30 ml de H₂O destilada

C.2 Wash Buffer 1X (200 ml)

Composición:

-50 ml de Wash Buffer 4X en 150 ml de H₂O destilada

C.3 Detection Buffer 1X (100 ml)

Composición:

-10 ml de Detection Buffer 10X en 90 ml de H₂O destilada

^a Cell Applications; San Diego, California, EEUU

^b Invitrogen, Life Technologies; Grand Island, Nueva York, EEUU

^c Sigma; St Louis, Missouri, EEUU

^d Bio-Rad, Life Science; El Prat de Llobregat, Barcelona, España

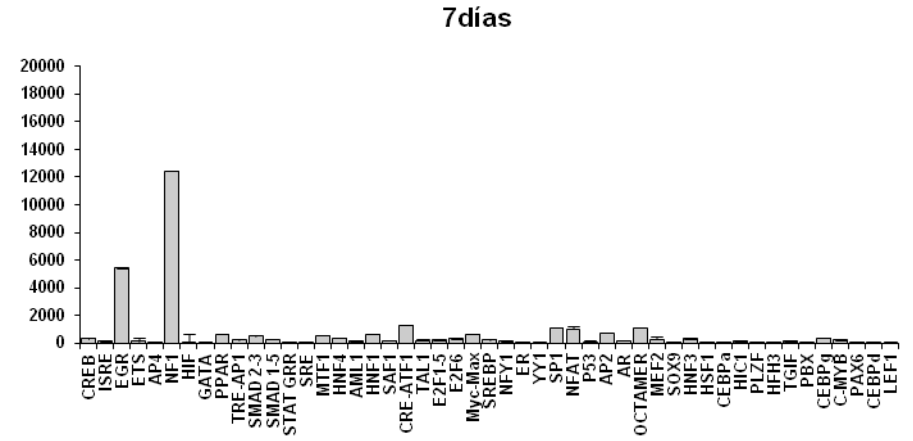
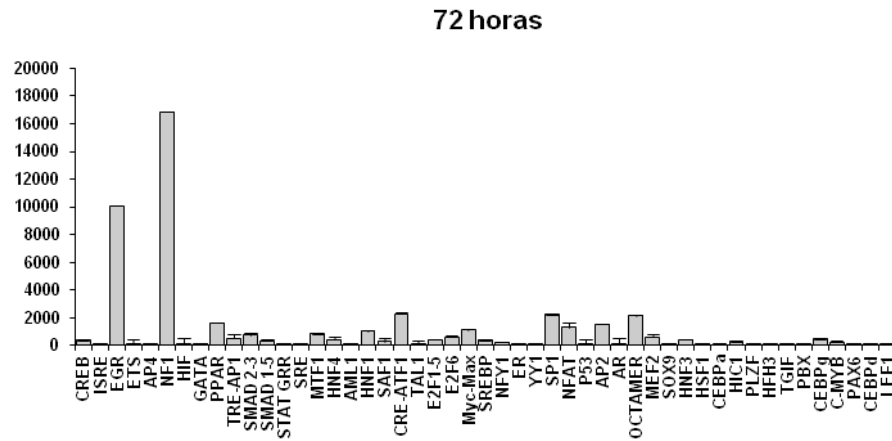
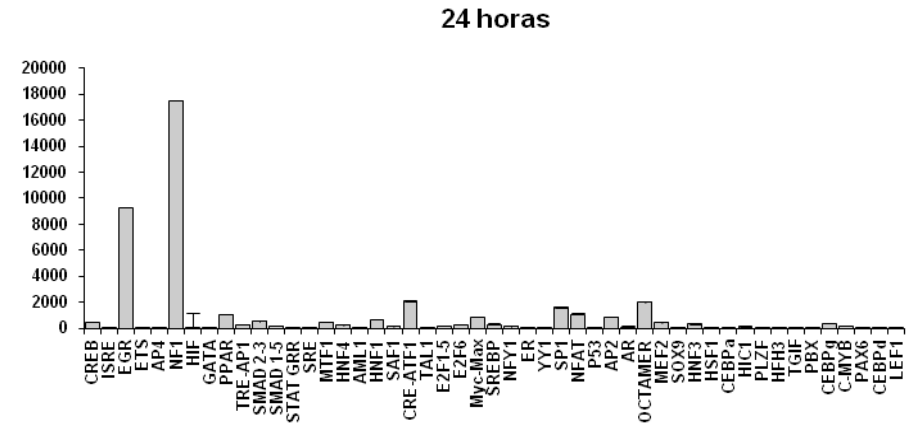
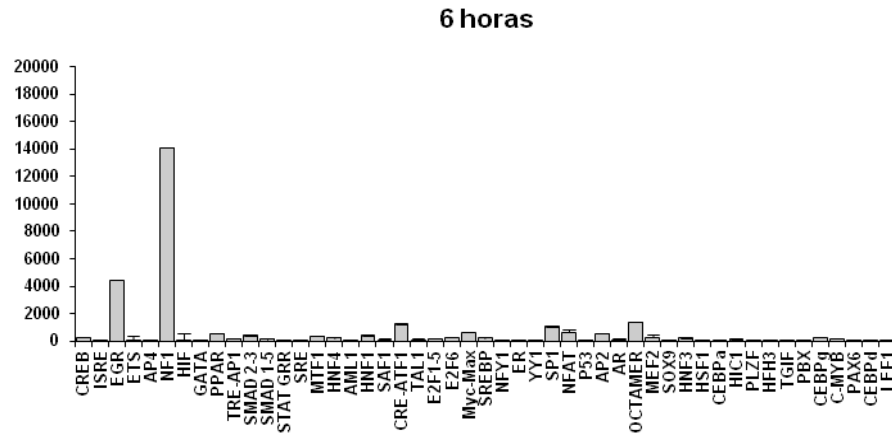
^e Gibco, Life Technologies; Grand Island, Nueva York, EEUU

^f Roche Holding AG; Basel, Suiza

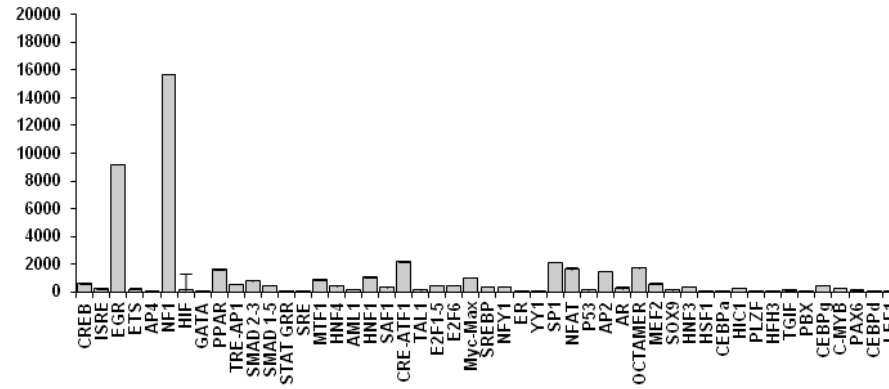
^g Cell Signaling Technology; Danvers, Massachusetts, EEUU

ANEXO VII

A. Representación gráfica de la intensidad de fluorescencia media (IFM) de los 50 FTs analizados en las muestras control entre las 6 horas y los 14 días tras la isquemia cerebral experimental.

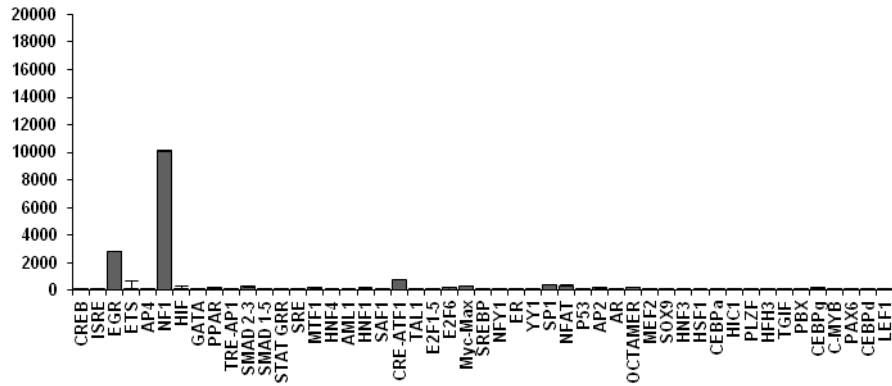


14 días

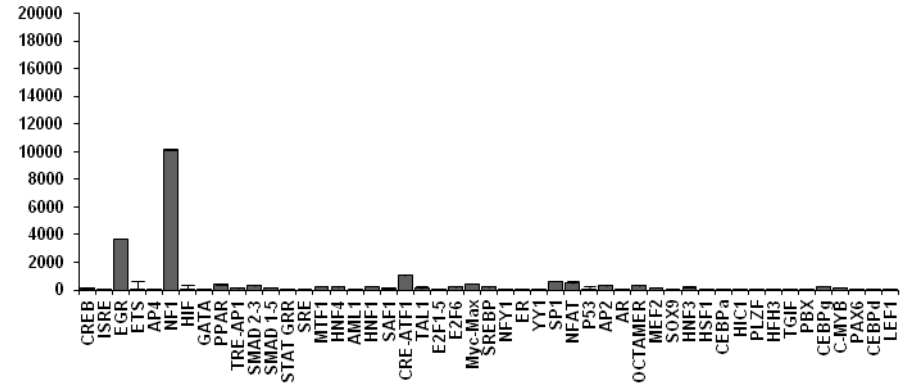


B.Representación gráfica de la intensidad de fluorescencia media (IFM) de los 50 FTs analizados en las muestras de núcleo isquémico entre las 6 horas y los 14 días tras la isquemia cerebral experimental.

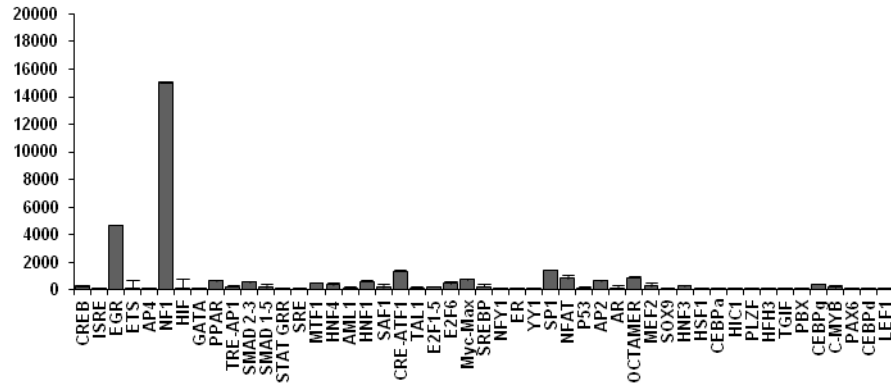
6 horas



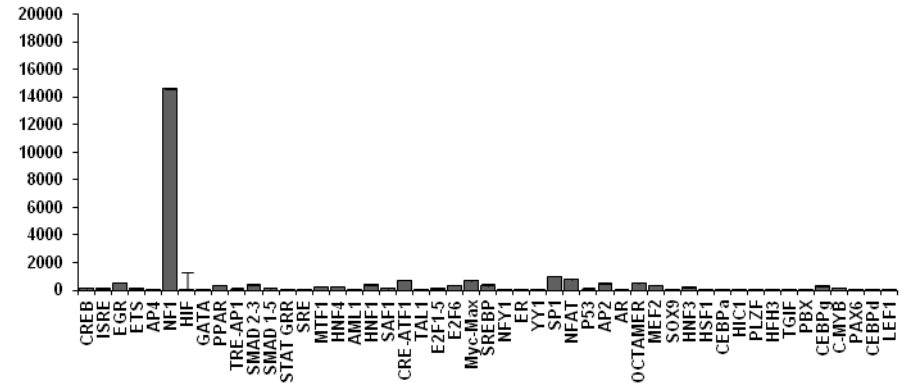
24 horas



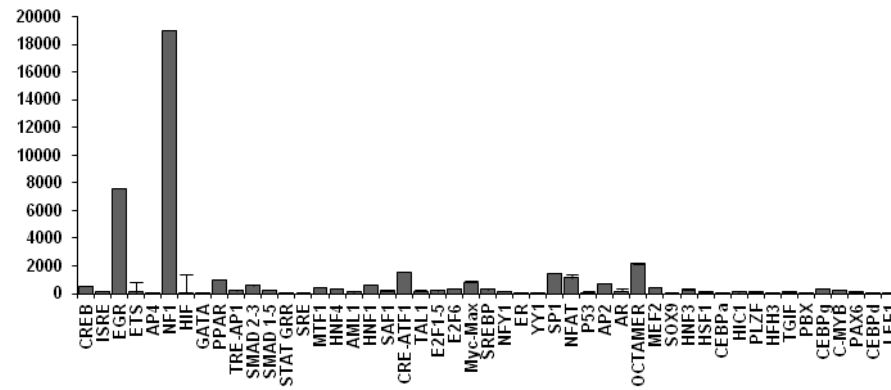
72 horas



7 días

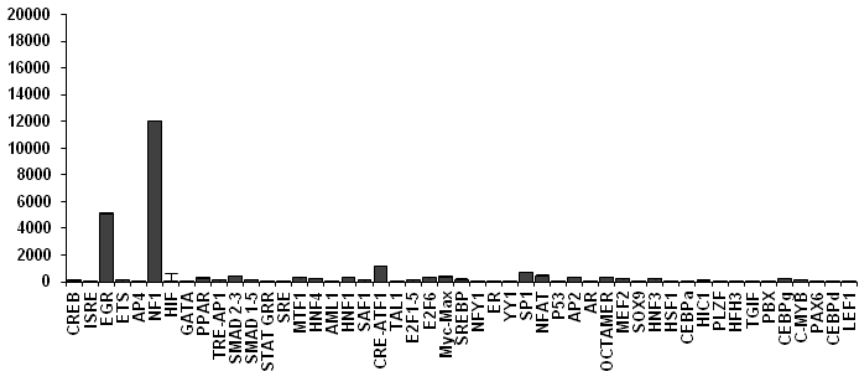


14 días

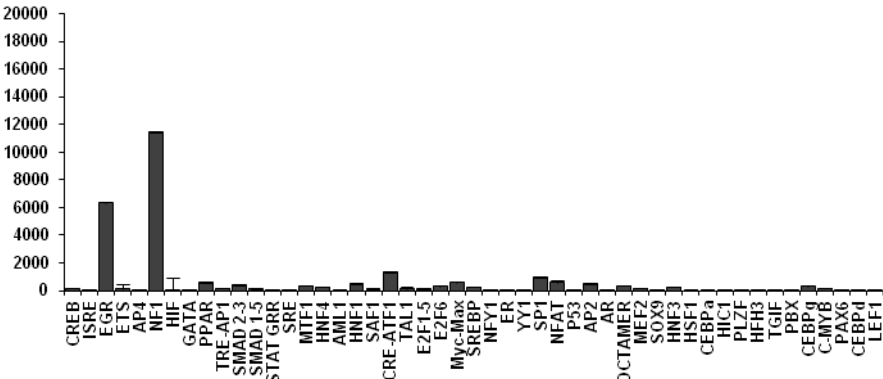


C. Representación gráfica de la intensidad de fluorescencia media (IFM) de los 50 FTs analizados en las muestras de peri-infarto isquémico entre las 6 horas y los 14 días tras la isquemia cerebral experimental.

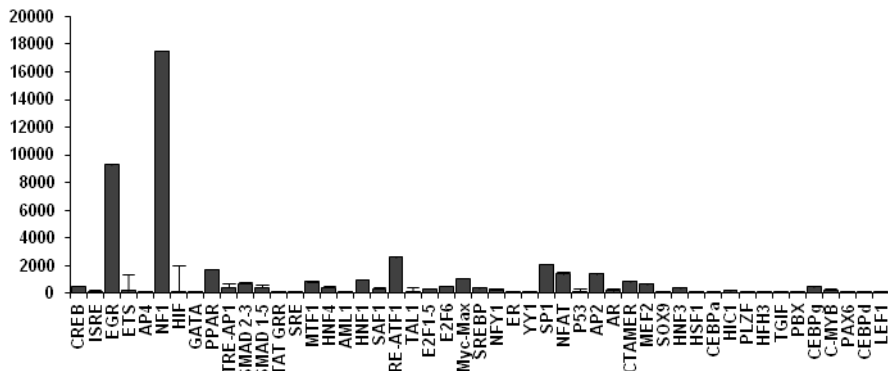
6 horas



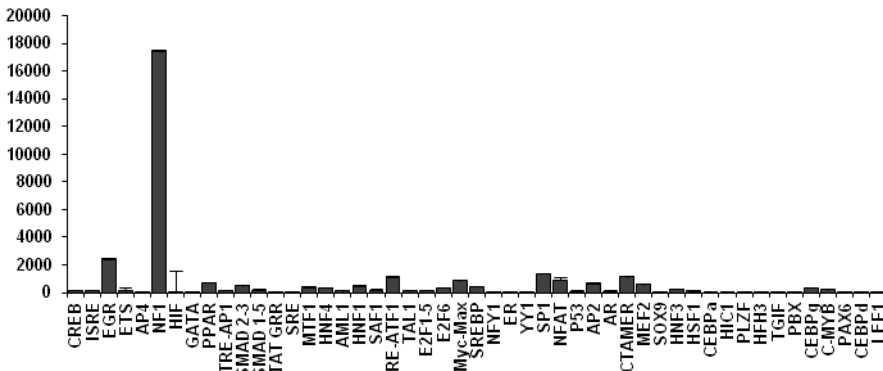
24 horas



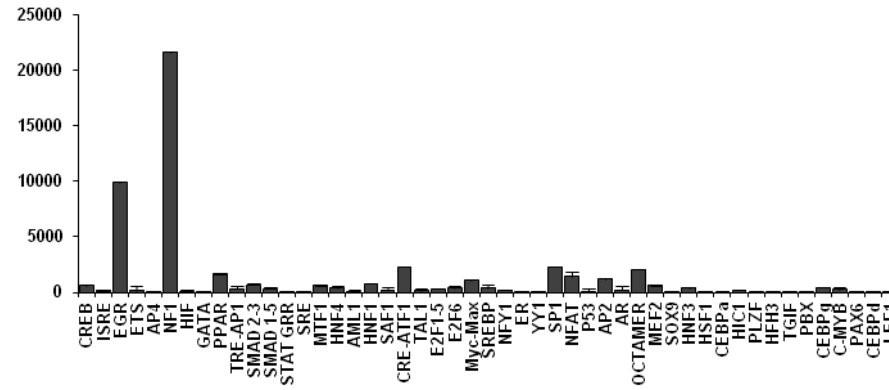
72 horas



7 días

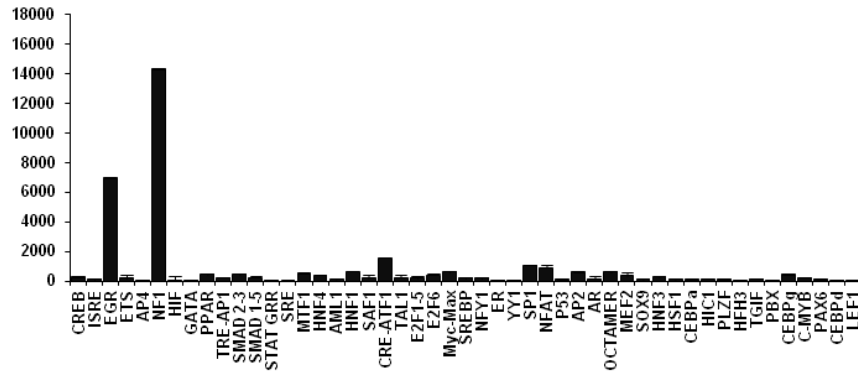


14 días

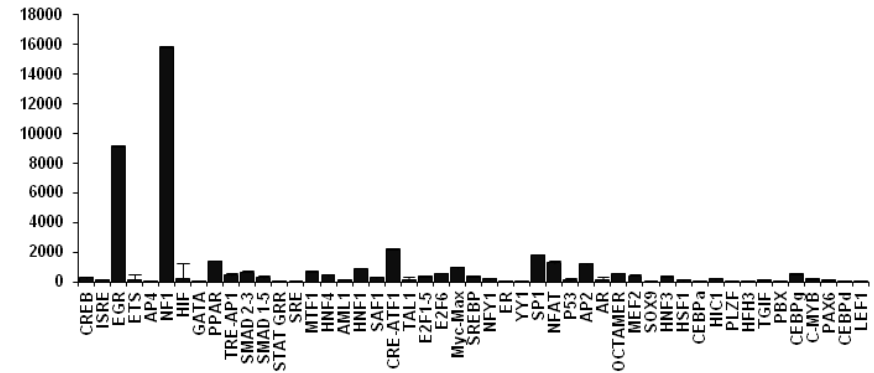


D.Representación gráfica de la intensidad de fluorescencia media (IFM) de los 50 FTs analizados en las muestras de tejido sano ipsi-lateral entre las 6 horas y los 14 días tras la isquemia cerebral experimental.

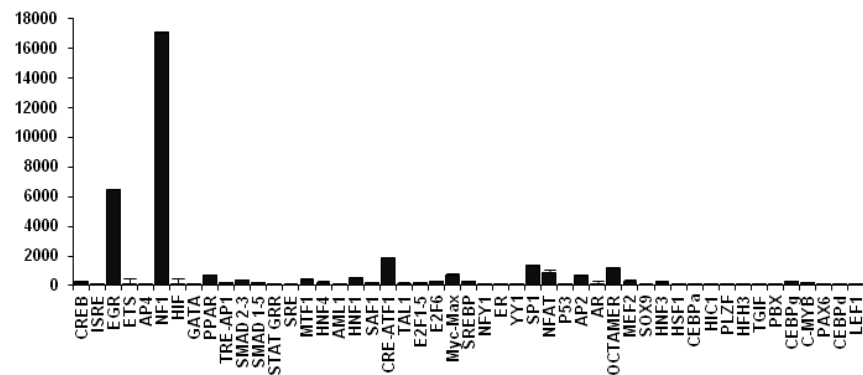
6 horas



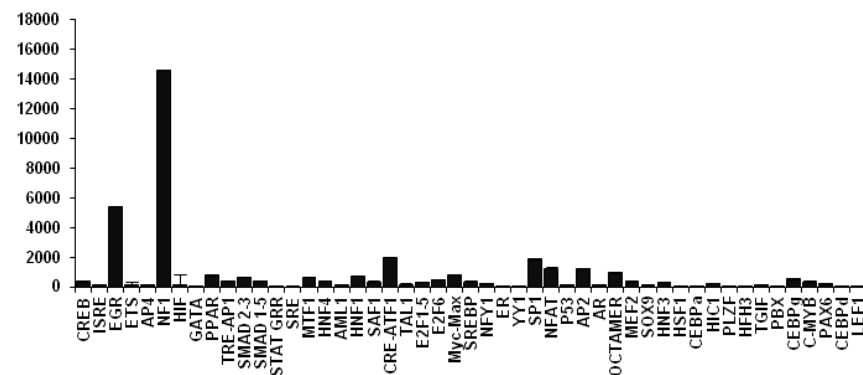
24 horas



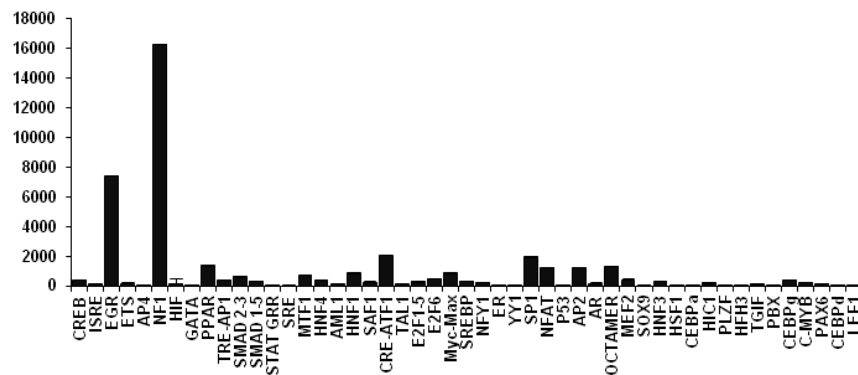
72 horas



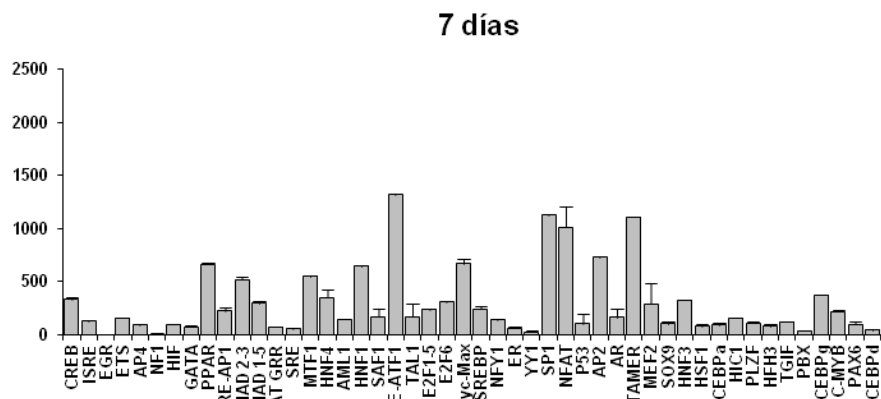
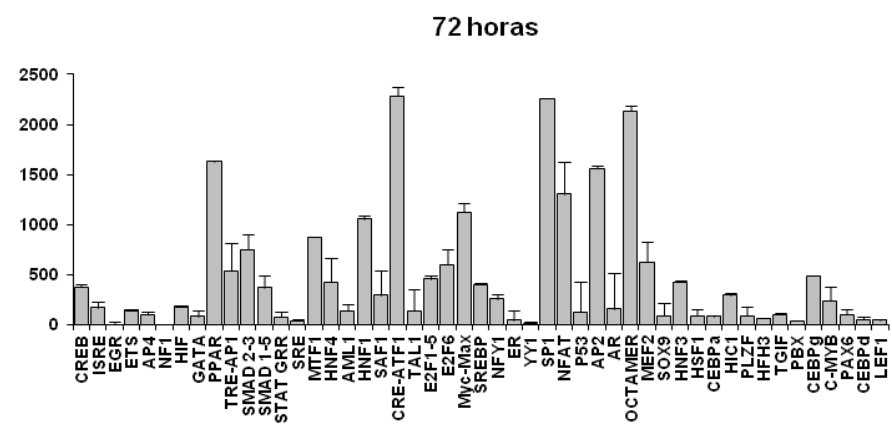
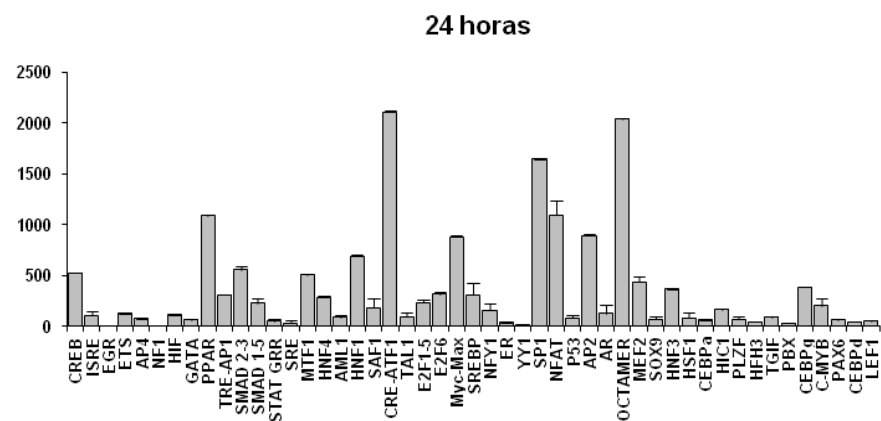
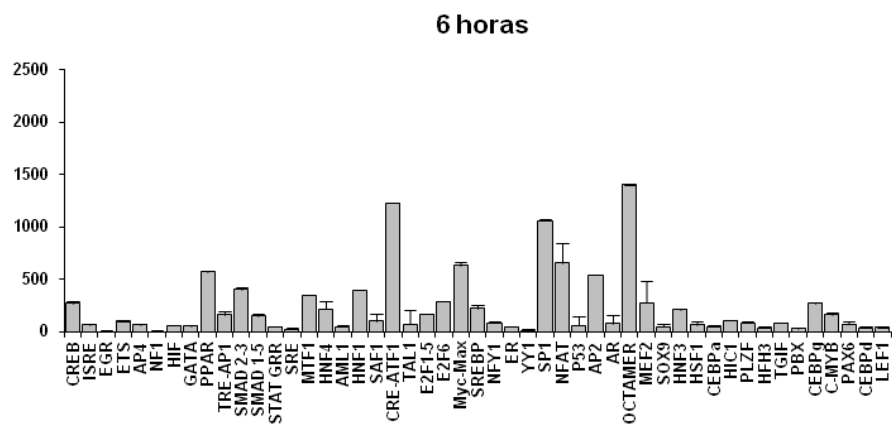
7 días



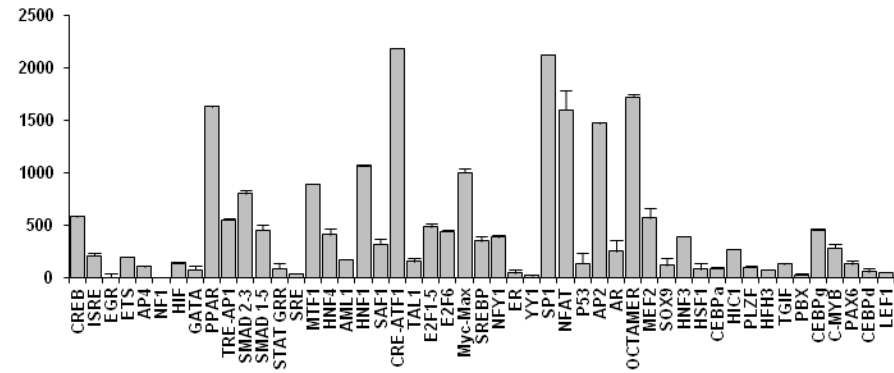
14 días



A'. Representación gráfica de la intensidad de fluorescencia media (IFM) de los 50 FTs analizados en las muestras control entre las 6 horas y los 14 días tras la isquemia cerebral experimental. Se han eliminado los FTs con mayor IFM (NF1 y EGR) de las gráficas "A" para disminuir la escala y analizar mejor las diferencias entre los otros FTs.

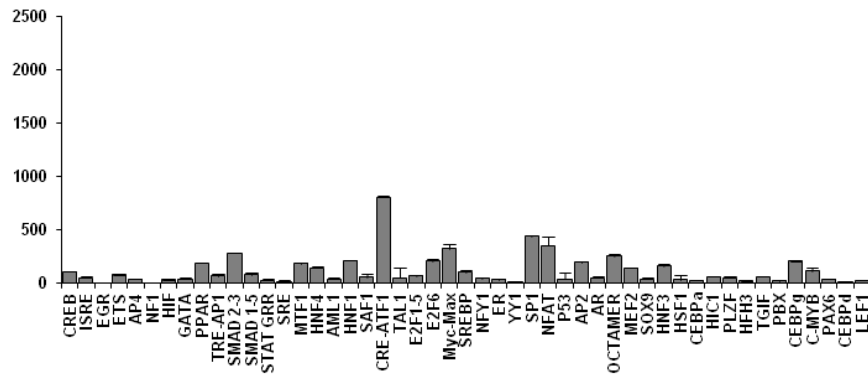


14 días

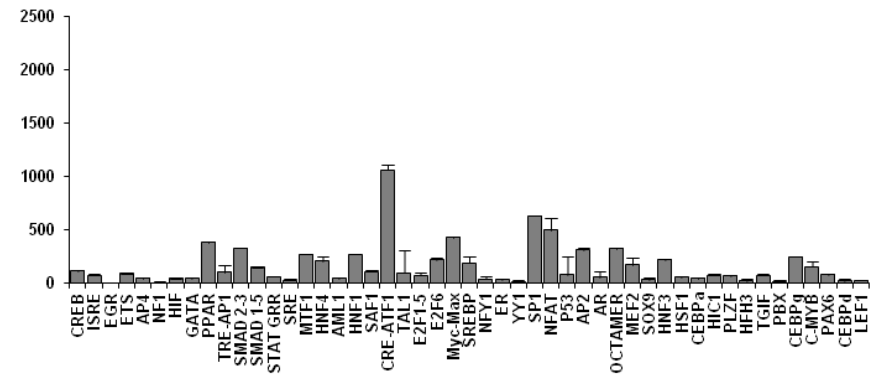


B'. Representación gráfica de la intensidad de fluorescencia media (IFM) de los 50 FTs analizados en las muestras de núcleo isquémico entre las 6 horas y los 14 días tras la isquemia cerebral experimental. Se han eliminado los FTs con mayor IFM (NF1 y EGR) de las gráficas "B" para disminuir la escala y analizar mejor las diferencias entre los otros FTs.

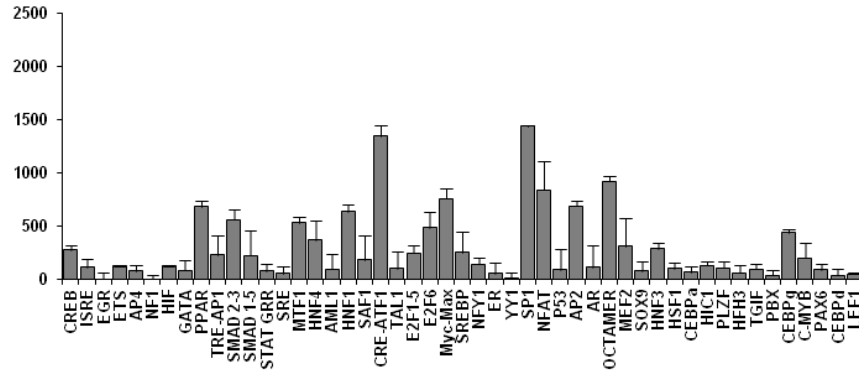
6 horas



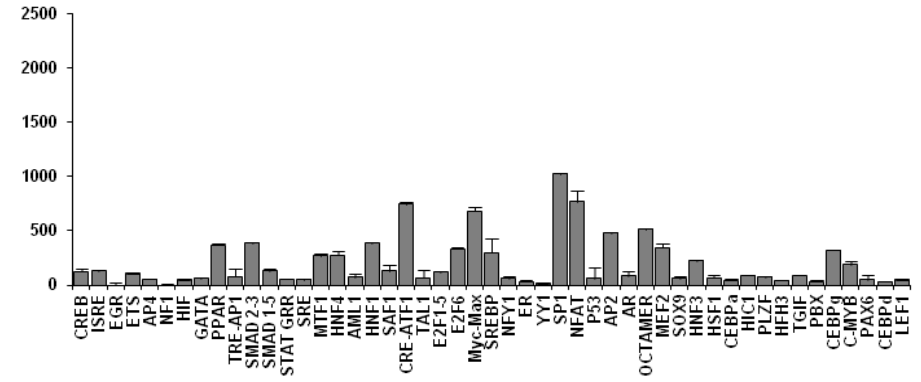
24 horas



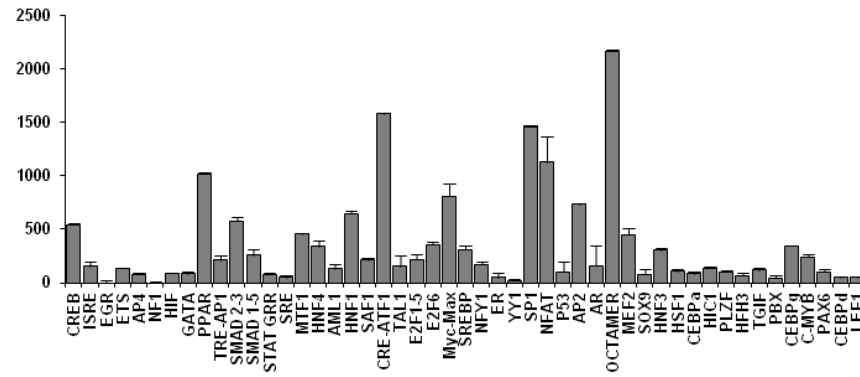
72 horas



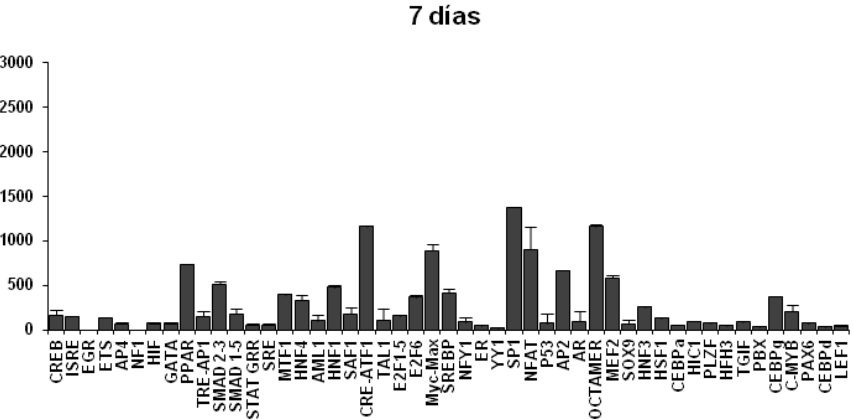
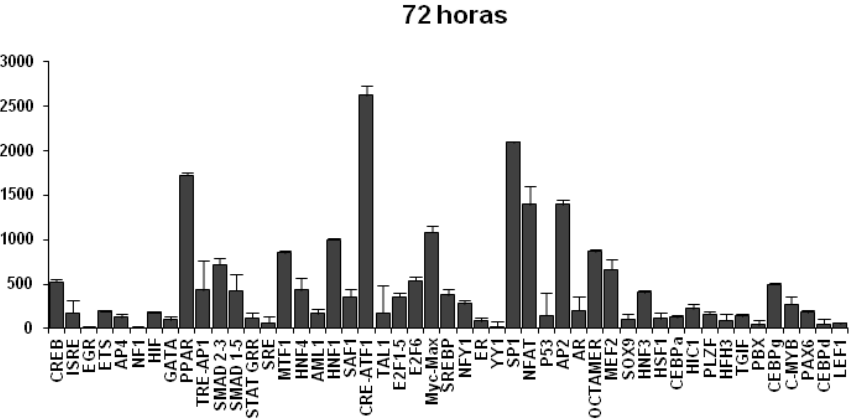
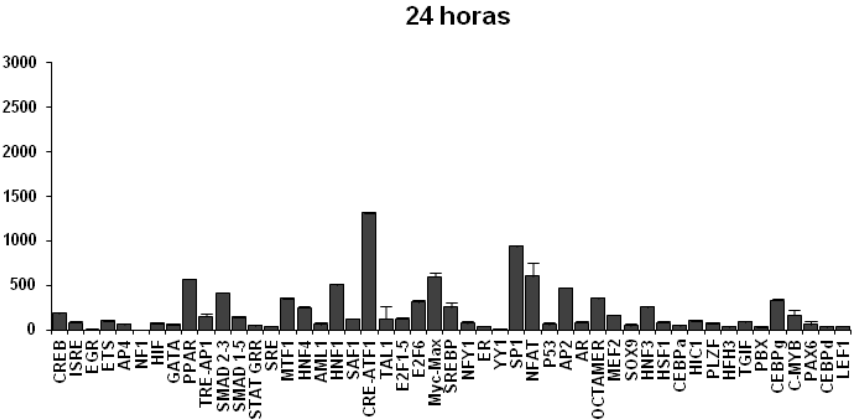
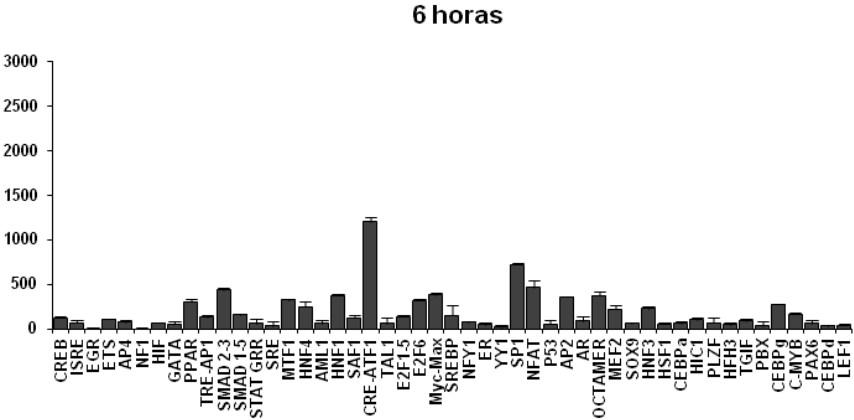
7 días

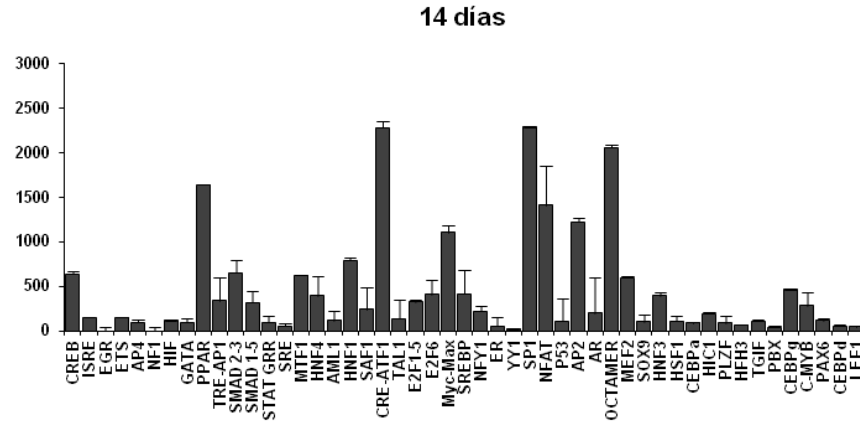


14 días

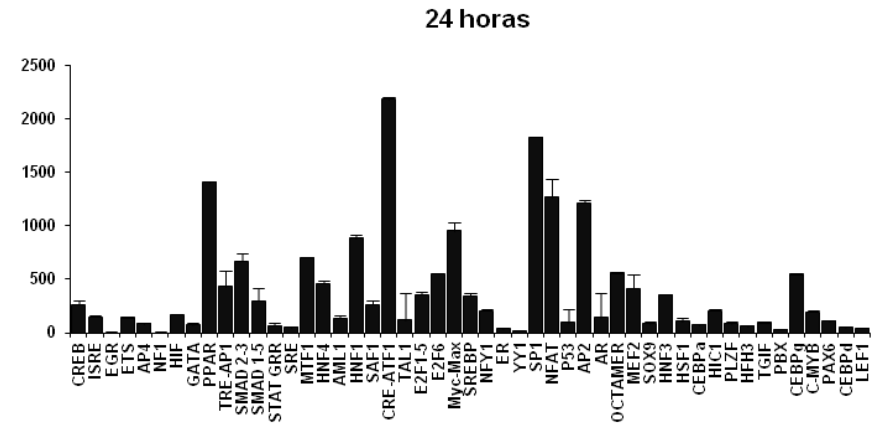
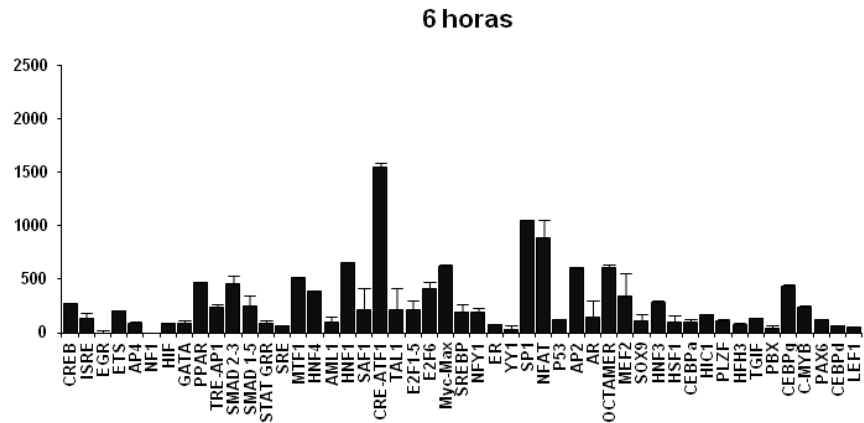


C'. Representación gráfica de la intensidad de fluorescencia media (IFM) de los 50 FTs analizados en las muestras de peri-infarto isquémico entre las 6 horas y los 14 días tras la isquemia cerebral experimental. Se han eliminado los FTs con mayor IFM (NF1 y EGR) de las gráficas "C" para disminuir la escala y analizar mejor las diferencias entre los otros FTs.

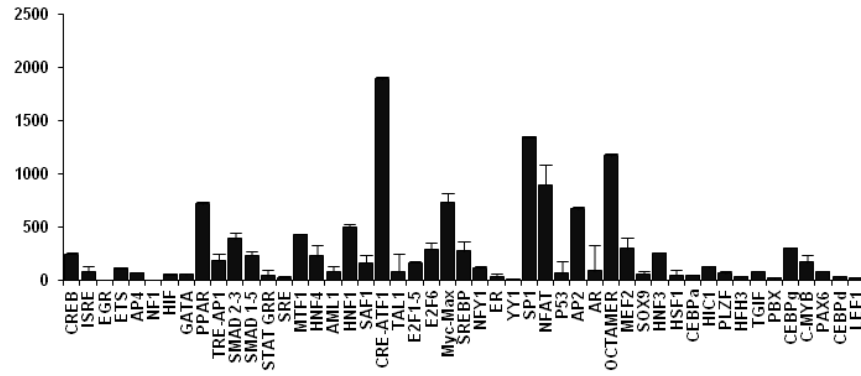




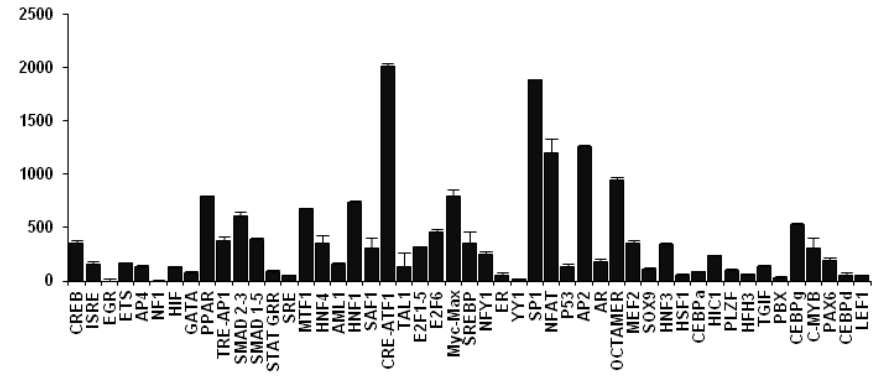
D'. Representación gráfica de la intensidad de fluorescencia media (IFM) de los 50 FTs analizados en las muestras de tejido sano ipsi-lateral entre las 6 horas y los 14 días tras la isquemia cerebral experimental. Se han eliminado los FTs con mayor IFM (NF1 y EGR) de las gráficas "D" para disminuir la escala y analizar mejor las diferencias entre los otros FTs.



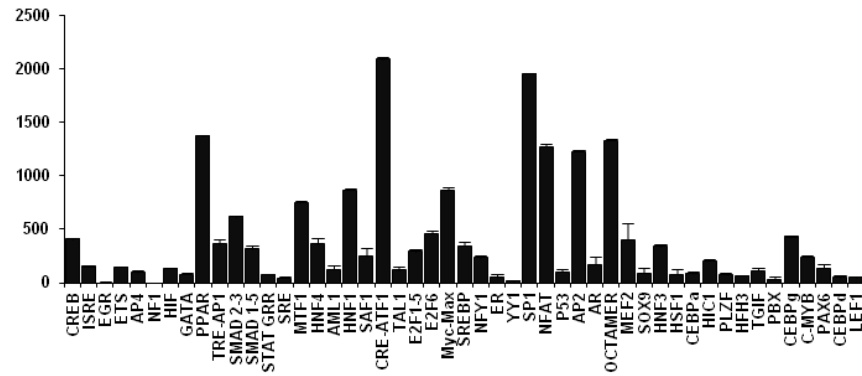
72 horas



7 días



14 días



IX BIBLIOGRAFÍA

Reference List

1. **Warlow, C., C. Sudlow, M. Dennis, J. Wardlaw, and P. Sandercock.** 2003. Stroke. *Lancet* **362**:1211-1224.
2. **Arboix A, Díaz J, Pérez-Sempere A, Álvarez Sabín J, and en nombre del Comité de redacción ad hoc del Grupo de estudio de Enfermedades Cerebrovasculares de la SEN.** 2006. Ictus: tipos etiológicos y criterios diagnósticos., p. 1-23. *In: Díez Tejedor E (ed.), Guía para el diagnóstico y el tratamiento del ictus.* Prous Science, Barcelona.
3. **Castillo, J.** 2000. [Physiopathology of cerebral ischemia]. *Rev.Neurol.* **30**:459-464.
4. **Castillo, J.** 2001. Luces y sombras de la neuroprotección en la isquemia cerebral, *In: Sociedad Peruana de Neuropsiquiatría (ed.), Revista de Neuro-Psiquiatría del Perú.,* vol. volumen 64, Nº 4 Lima, Perú.
5. **Carmeliet, P. and R. K. Jain.** 2011. Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature* **473**:298-307.
6. **Sacco, R. L., E. J. Benjamin, J. P. Broderick, M. Dyken, J. D. Easton, W. M. Feinberg, L. B. Goldstein, P. B. Gorelick, G. Howard, S. J. Kittner, T. A. Manolio, J. P. Whisnant, and P. A. Wolf.** 1997. American Heart Association Prevention Conference. IV. Prevention and Rehabilitation of Stroke. Risk factors. *Stroke* **28**:1507-1517.
7. **Ruíz-Giménez N, González Ruano P, and Suárez C.** 2002. Abordaje del accidente cerebrovascular. Del Sistema nacional de salud. http://www.msssi.gob.es/biblioPublic/publicaciones/docs/200204_1.pdf.
8. **Chaudhary, N., A. S. Pandey, and J. J. Gemmete.** 2011. Intervention in acute cerebral ischaemic stroke: a review of the role of pharmacological therapies and intra-arterial mechanical thrombectomy devices. *Postgrad.Med.J.* **87**:714-723.
9. **Yeo, L. L. and V. K. Sharma.** 2013. The quest for arterial recanalization in acute ischemic stroke—the past, present and the future. *J.Clin.Med.Res.* **5**:251-265.
10. **Schmidt, A., J. Minnerup, and C. Kleinschnitz.** 2013. Emerging neuroprotective drugs for the treatment of acute ischaemic stroke. *Expert.Opin.Emerg.Drugs* **18**:109-120.
11. **García-Barragán, N and Masjuan, J.** 2012. Enfermedad cerebrovascular. Ictus aterotrombótico. Ictus lacunar, p. 797-809. *In: José Sabán Ruiz (ed.), Enfermedad cerebrovascular: Control Global del riesgo cardiometabólico.,* vol. 1. Ediciones Díaz de Santos, Madrid.
12. Martínez-Vila, E., Murie Fernández, M., Pagola, I., and Irimia, P. Enfermedades cerebrovasculares. *Medicine-Programa de Formación Médica Continuada Acreditado.* *Medicine* **72**, 4871-4881. 2011. Ref Type: Magazine Article
13. **Alvarez-Sabin, J., C. A. Molina, S. Abilleira, J. Montaner, A. F. Garcia, F. Jimenez, X, J. Arenillas, R. Huertas, M. Ribo, M. Quintana, and A. Codina.** 2003. [Stroke code impact on the efficacy of thrombolytic treatment]. *Med.Clin.(Barc.)* **120**:47-51.
14. **Belvis, R., D. Cocho, J. Marti-Fabregas, J. Pagonabarraga, A. Aleu, M. D. Garcia-Bargo, J. Pons, E. Coma, F. Garcia-Alfranca, X. Jimenez-Fabrega, and J. L. Marti-Vilalta.** 2005. Benefits of a prehospital stroke code system. Feasibility and efficacy in the first year of clinical practice in Barcelona, Spain. *Cerebrovasc.Dis.* **19**:96-101.
15. **Hacke, W., M. Kaste, E. Bluhmki, M. Brozman, A. Davalos, D. Guidetti, V. Larrue, K. R. Lees, Z. Medeghri, T. Machnig, D. Schneider, R. von Kummer, N. Wahlgren, and D. Toni.** 2008. Thrombolysis with alteplase 3 to 4.5 hours after acute ischemic stroke. *N.Engl.J.Med.* **359**:1317-1329.
16. 2014. http://www.texasheartinstitute.org/HIC/Topics_Esp/Cond/strok_sp.cfm.
17. **Hacke, W., M. Kaste, O. T. Skyhoj, J. M. Orgogozo, and J. Bogousslavsky.** 2000. European Stroke Initiative (EUSI) recommendations for stroke management. The European Stroke Initiative Writing Committee. *Eur.J.Neurol.* **7**:607-623.

18. **Durukan, A. and T. Tatlisumak.** 2007. Acute ischemic stroke: overview of major experimental rodent models, pathophysiology, and therapy of focal cerebral ischemia. *Pharmacol.Biochem.Behav.* **87**:179-197.
19. **Olsen, T. S., P. Langhorne, H. C. Diener, M. Hennerici, J. Ferro, J. Sivenius, N. G. Wahlgren, and P. Bath.** 2003. European Stroke Initiative Recommendations for Stroke Management-update 2003. *Cerebrovasc.Dis.* **16**:311-337.
20. **Cremades, I., Sotillo, C., Villanova, M., Andrade, G., Bueno, B., Domínguez, E., and Guerrero, J.E.** 2001. El ictus isquémico. Manejo clásico y las nuevas perspectivas, p. 117-124. *In: Puesta al día en urgencias, emergencias y catástrofes.*, vol. 2.
21. 2014. WHO. <http://www.who.int/healthinfo/bodgbd2002revised/en/index.html>.
22. **Fuentes, B., J. Gallego, A. Gil-Nunez, A. Morales, F. Purroy, J. Roquer, T. Segura, J. Tejada, A. Lago, E. Díez-Tejedor, d. L. Alonso, J. Alvarez-Sabin, J. Arenillas, S. Calleja, I. Casado, M. Castellanos, J. Castillo, A. Davalos, F. Diaz-Otero, J. A. Egido, J. C. Lopez-Fernandez, M. Freijo, P. A. Garcia, F. Gil, P. Irimia, J. Maestre, J. Masjuan, J. Martí-Fabregas, P. Martínez-Sánchez, E. Martínez-Vila, C. Molina, F. Nombela, M. Ribo, M. Rodríguez-Yanez, F. Rubio, J. Serena, P. Simal, and J. Vivancos.** 2012. Guidelines for the preventive treatment of ischaemic stroke and TIA (I). Update on risk factors and life style. *Neurologia* **27**:560-574.
23. **O'Donnell, M. J., D. Xavier, L. Liu, H. Zhang, S. L. Chin, P. Rao-Melacini, S. Rangarajan, S. Islam, P. Pais, M. J. McQueen, C. Mondo, A. Damasceno, P. Lopez-Jaramillo, G. J. Hankey, A. L. Dans, K. Yusuf, T. Truelsen, H. C. Diener, R. L. Sacco, D. Ryglewicz, A. Czlonkowska, C. Weimar, X. Wang, and S. Yusuf.** 2010. Risk factors for ischaemic and intracerebral haemorrhagic stroke in 22 countries (the INTERSTROKE study): a case-control study. *Lancet* **376**:112-123.
24. **Arce, C. and F. Rubio.** 2004. ¿Qué es el ictus? Clasificación y tipos etiológicos., p. 3-18. *In: Díez Tejedor E (ed.), Ictus. Una cadena asistencial.* Mayo Ediciones, Madrid.
25. **Díez-Tejedor E, S. R.** 2014. Concepto y clasificación de las enfermedades vasculares cerebrales, p. 43-54. *In: Á. S. J. M.-V. J. M. V. E. M.-G. J. Castillo J (ed.), Manual de enfermedades vasculares cerebrales.* Prous Science, Barcelona.
26. **Martí-Vilata JL, M.-F. J.** 2004. Nomenclatura de las enfermedades vasculares cerebrales, p. 31-42. *In: Martí-Vilata JL (ed.), Enfermedades vasculares cerebrales.* 2a ed. Prous Science, Barcelona.
27. **Ustrell-Roig, X. and J. Serena-Leal.** 2007. [Stroke. Diagnosis and therapeutic management of cerebrovascular disease]. *Rev.Esp Cardiol.* **60**:753-769.
28. **Davalos, A., W. Ricart, F. Gonzalez-Huix, S. Soler, J. Marrugat, A. Molins, R. Suner, and D. Genis.** 1996. Effect of malnutrition after acute stroke on clinical outcome. *Stroke* **27**:1028-1032.
29. **Baird, T. A., M. W. Parsons, T. Phan, K. S. Butcher, P. M. Desmond, B. M. Tress, P. G. Colman, B. R. Chambers, and S. M. Davis.** 2003. Persistent poststroke hyperglycemia is independently associated with infarct expansion and worse clinical outcome. *Stroke* **34**:2208-2214.
30. **Strand, T., K. Asplund, S. Eriksson, E. Hagg, F. Lithner, and P. O. Wester.** 1985. A non-intensive stroke unit reduces functional disability and the need for long-term hospitalization. *Stroke* **16**:29-34.
31. **Strand, T., K. Asplund, S. Eriksson, E. Hagg, F. Lithner, and P. O. Wester.** 1986. Stroke unit care--who benefits? Comparisons with general medical care in relation to prognostic indicators on admission. *Stroke* **17**:377-381.
32. **Indredavik, B., F. Bakke, R. Solberg, R. Rokseth, L. L. Haaheim, and I. Holme.** 1991. Benefit of a stroke unit: a randomized controlled trial. *Stroke* **22**:1026-1031.
33. **Langhorne, P., B. O. Williams, W. Gilchrist, and K. Howie.** 1993. Do stroke units save lives?. *Lancet* **342**:395-398.

34. **Bacigaluppi, M. and D. M. Hermann.** 2008. New targets of neuroprotection in ischemic stroke. *ScientificWorldJournal*. **8**:698-712.
35. **Egido, J.A., Alonso de Leciana, M., Martínez Vila, E., Díez Tejedor, E., and por el comité ad hoc del Grupo de Estudio de Enfermedades Cerebrovasculares de la SEN.** 2006. Guías Oficiales de la Sociedad Española de Neurología. Guía para el tratamiento del infarto cerebral agudo, p. 97-132. *In: Díez Tejedor E and Comité ad hoc del Grupo de Estudio de Enfermedades Cerebrovasculares de la SEN (eds.), Guía para el diagnóstico y tratamiento del ictus., vol. 3. Prous Science, Barcelona.*
36. **Graham, G. D.** 2003. Tissue plasminogen activator for acute ischemic stroke in clinical practice: a meta-analysis of safety data. *Stroke* **34**:2847-2850.
37. **von Kummer, R., G. W. Albers, and E. Mori.** 2012. The Desmoteplase in Acute Ischemic Stroke (DIAS) clinical trial program. *Int.J.Stroke* **7**:589-596.
38. 2014. The Internet stroke center. *Stroke trials*. <http://www.strokecenter.org/trials>.
39. **Morris, D. C., B. Silver, P. Mitsias, C. Lewandowski, S. Patel, S. Daley, Z. G. Zhang, and M. Lu.** 2003. Treatment of acute stroke with recombinant tissue plasminogen activator and abciximab. *Acad.Emerg.Med.* **10**:1396-1399.
40. **Straub, S., U. Junghans, V. Jovanovic, H. J. Wittsack, R. J. Seitz, and M. Siebler.** 2004. Systemic thrombolysis with recombinant tissue plasminogen activator and tirofiban in acute middle cerebral artery occlusion. *Stroke* **35**:705-709.
41. 2013. ClinicalTrials.gov homepage. <http://www.clinicaltrials.gov>
42. **Leary, M. C., J. L. Saver, Y. P. Gobin, R. Jahan, G. R. Duckwiler, F. Vinuela, C. S. Kidwell, J. Frazee, and S. Starkman.** 2003. Beyond tissue plasminogen activator: mechanical intervention in acute stroke. *Ann.Emerg.Med.* **41**:838-846.
43. **Stead, L. G., R. M. Gilmore, M. F. Bellolio, A. A. Rabinstein, and W. W. Decker.** 2008. Percutaneous clot removal devices in acute ischemic stroke: a systematic review and meta-analysis. *Arch.Neurol.* **65**:1024-1030.
44. **Ducruet, A. F., B. T. Grobelny, B. E. Zacharia, Z. L. Hickman, M. L. Yeh, and E. S. Connolly.** 2009. Pharmacotherapy of cerebral ischemia. *Expert.Opin.Pharmacother.* **10**:1895-1906.
45. **Sicard, K. M. and M. Fisher.** 2009. Emerging drugs for acute ischemic stroke. *Expert.Opin.Emerg.Drugs* **14**:33-42.
46. **Fisher, M., G. Feuerstein, D. W. Howells, P. D. Hurn, T. A. Kent, S. I. Savitz, and E. H. Lo.** 2009. Update of the stroke therapy academic industry roundtable preclinical recommendations. *Stroke* **40**:2244-2250.
47. **Hata, R., K. Maeda, D. Hermann, G. Mies, and K. A. Hossmann.** 2000. Evolution of brain infarction after transient focal cerebral ischemia in mice. *J.Cereb.Blood Flow Metab* **20**:937-946.
48. **Hata, R., K. Maeda, D. Hermann, G. Mies, and K. A. Hossmann.** 2000. Dynamics of regional brain metabolism and gene expression after middle cerebral artery occlusion in mice. *J.Cereb.Blood Flow Metab* **20**:306-315.
49. **Hossmann, K. A.** 2006. Pathophysiology and therapy of experimental stroke. *Cell Mol.Neurobiol.* **26**:1057-1083.
50. **Pulsinelli, W.** 1992. Pathophysiology of acute ischaemic stroke. *Lancet* **339**:533-536.
51. **Heiss, W. D. and R. Graf.** 1994. The ischemic penumbra. *Curr.Opin.Neurol.* **7**:11-19.
52. **Baron, J. C.** 2001. Mapping the ischaemic penumbra with PET: a new approach. *Brain* **124**:2-4.
53. **Heiss, W. D.** 2001. Imaging the ischemic penumbra and treatment effects by PET. *Keio J.Med.* **50**:249-256.
54. **Richard, G. A., T. Odergren, and T. Ashwood.** 2003. Animal models of stroke: do they have value for discovering neuroprotective agents? *Trends Pharmacol.Sci.* **24**:402-408.
55. **Smith, W. S.** 2004. Pathophysiology of focal cerebral ischemia: a therapeutic perspective. *J.Vasc.Interv.Radiol.* **15**:S3-12.

56. **Choi, D. W.** 1988. Calcium-mediated neurotoxicity: relationship to specific channel types and role in ischemic damage. *Trends Neurosci.* **11**:465-469.
57. **Ginsberg, M. D.** 1997. The new language of cerebral ischemia. *AJNR Am.J.Neuroradiol.* **18**:1435-1445.
58. **Choi, D. W. and S. M. Rothman.** 1990. The role of glutamate neurotoxicity in hypoxic-ischemic neuronal death. *Annu.Rev.Neurosci.* **13**:171-182.
59. **Castillo, J.** 1999. [Biochemistry of cerebral ischemia]. *Neurologia* **14 Suppl 4**:17-23.
60. **Siesjo, B. K.** 1994. Calcium-mediated processes in neuronal degeneration. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* **747**:140-161.
61. **Rosenberg, G. A., M. Navratil, F. Barone, and G. Feuerstein.** 1996. Proteolytic cascade enzymes increase in focal cerebral ischemia in rat. *J.Cereb.Blood Flow Metab* **16**:360-366.
62. **Derex, L. and N. Nighoghossian.** 2008. Intracerebral haemorrhage after thrombolysis for acute ischaemic stroke: an update. *J.Neurol.Neurosurg.Psychiatry* **79**:1093-1099.
63. **Gartshore, G., J. Patterson, and I. M. Macrae.** 1997. Influence of ischemia and reperfusion on the course of brain tissue swelling and blood-brain barrier permeability in a rodent model of transient focal cerebral ischemia. *Exp.Neurol.* **147**:353-360.
64. **Danton, G. H. and W. D. Dietrich.** 2003. Inflammatory mechanisms after ischemia and stroke. *J.Neuropathol.Exp.Neurol.* **62**:127-136.
65. **Dirnagl, U., C. Iadecola, and M. A. Moskowitz.** 1999. Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. *Trends Neurosci.* **22**:391-397.
66. **Gunther, A., L. Koppers-Tiedt, P. M. Schneider, I. Kunert, J. Berrouschot, D. Schneider, and S. Rossner.** 2005. Reduced infarct volume and differential effects on glial cell activation after hyperbaric oxygen treatment in rat permanent focal cerebral ischaemia. *Eur.J.Neurosci.* **21**:3189-3194.
67. **Schilling, M., M. Besselmann, C. Leonhard, M. Mueller, E. B. Ringelstein, and R. Kiefer.** 2003. Microglial activation precedes and predominates over macrophage infiltration in transient focal cerebral ischemia: a study in green fluorescent protein transgenic bone marrow chimeric mice. *Exp.Neurol.* **183**:25-33.
68. **Trendelenburg, G. and U. Dirnagl.** 2005. Neuroprotective role of astrocytes in cerebral ischemia: focus on ischemic preconditioning. *Glia* **50**:307-320.
69. **Dohmen, C., B. Bosche, R. Graf, F. Staub, L. Kracht, J. Sobesky, M. Neveling, G. Brinker, and W. D. Heiss.** 2003. Prediction of malignant course in MCA infarction by PET and microdialysis. *Stroke* **34**:2152-2158.
70. **Fisher, M. and W. Schaebitz.** 2000. An overview of acute stroke therapy: past, present, and future. *Arch.Intern.Med.* **160**:3196-3206.
71. **Love, S.** 2003. Apoptosis and brain ischaemia. *Prog.Neuropsychopharmacol.Biol.Psychiatry* **27**:267-282.
72. **Mergenthaler, P., U. Dirnagl, and A. Meisel.** 2004. Pathophysiology of stroke: lessons from animal models. *Metab Brain Dis.* **19**:151-167.
73. **Sugawara, T., M. Fujimura, N. Noshita, G. W. Kim, A. Saito, T. Hayashi, P. Narasimhan, C. M. Maier, and P. H. Chan.** 2004. Neuronal death/survival signaling pathways in cerebral ischemia. *NeuroRx.* **1**:17-25.
74. **Morgan, J. I. and T. Curran.** 1991. Stimulus-transcription coupling in the nervous system: involvement of the inducible proto-oncogenes fos and jun. *Annu.Rev.Neurosci.* **14**:421-451.
75. **Lanahan, A. and P. Worley.** 1998. Immediate-early genes and synaptic function. *Neurobiol.Learn.Mem.* **70**:37-43.
76. **Akins, P. T., P. K. Liu, and C. Y. Hsu.** 1996. Immediate early gene expression in response to cerebral ischemia. Friend or foe? *Stroke* **27**:1682-1687.

77. **Honkaniemi, J., B. A. States, P. R. Weinstein, J. Espinoza, and F. R. Sharp.** 1997. Expression of zinc finger immediate early genes in rat brain after permanent middle cerebral artery occlusion. *J.Cereb.Blood Flow Metab* **17**:636-646.
78. **DeGracia, D. J. and B. R. Hu.** 2007. Irreversible translation arrest in the reperfused brain. *J.Cereb.Blood Flow Metab* **27**:875-893.
79. **Ford, G., Z. Xu, A. Gates, J. Jiang, and B. D. Ford.** 2006. Expression Analysis Systematic Explorer (EASE) analysis reveals differential gene expression in permanent and transient focal stroke rat models. *Brain Res.* **1071**:226-236.
80. **Jin, K., X. O. Mao, M. W. Eshoo, T. Nagayama, M. Minami, R. P. Simon, and D. A. Greenberg.** 2001. Microarray analysis of hippocampal gene expression in global cerebral ischemia. *Ann.Neurol.* **50**:93-103.
81. **Kim, J. B., C. S. Piao, K. W. Lee, P. L. Han, J. I. Ahn, Y. S. Lee, and J. K. Lee.** 2004. Delayed genomic responses to transient middle cerebral artery occlusion in the rat. *J.Neurochem.* **89**:1271-1282.
82. **Rickhag, M., M. Teilum, and T. Wieloch.** 2007. Rapid and long-term induction of effector immediate early genes (BDNF, Neuritin and Arc) in peri-infarct cortex and dentate gyrus after ischemic injury in rat brain. *Brain Res.* **1151**:203-210.
83. **Yakubov, E., M. Gottlieb, S. Gil, P. Dinerman, P. Fuchs, and E. Yavin.** 2004. Overexpression of genes in the CA1 hippocampus region of adult rat following episodes of global ischemia. *Brain Res.Mol.Brain Res.* **127**:10-26.
84. **Liu, J., K. Solway, R. O. Messing, and F. R. Sharp.** 1998. Increased neurogenesis in the dentate gyrus after transient global ischemia in gerbils. *J.Neurosci.* **18**:7768-7778.
85. **Kokaia, Z. and O. Lindvall.** 2003. Neurogenesis after ischaemic brain insults. *Curr.Opin.Neurobiol.* **13**:127-132.
86. **Cameron, H. A. and R. McKay.** 1998. Stem cells and neurogenesis in the adult brain. *Curr.Opin.Neurobiol.* **8**:677-680.
87. **Jin, K., M. Minami, J. Q. Lan, X. O. Mao, S. Batteur, R. P. Simon, and D. A. Greenberg.** 2001. Neurogenesis in dentate subgranular zone and rostral subventricular zone after focal cerebral ischemia in the rat. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **98**:4710-4715.
88. **Hurtado, O., J. M. Pradillo, D. Alonso-Escolano, P. Lorenzo, T. Sobrino, J. Castillo, I. Lizasoain, and M. A. Moro.** 2006. Neurorepair versus neuroprotection in stroke. *Cerebrovasc.Dis.* **21 Suppl 2**:54-63.
89. **White, B. D., R. J. Nathe, D. O. Maris, N. K. Nguyen, J. M. Goodson, R. T. Moon, and P. J. Horner.** 2010. Beta-catenin signaling increases in proliferating NG2+ progenitors and astrocytes during post-traumatic gliogenesis in the adult brain. *Stem Cells* **28**:297-307.
90. **Gross, R. E., M. F. Mehler, P. C. Mabie, Z. Zang, L. Santschi, and J. A. Kessler.** 1996. Bone morphogenetic proteins promote astroglial lineage commitment by mammalian subventricular zone progenitor cells. *Neuron* **17**:595-606.
91. **Bonaguidi, M. A., C. Y. Peng, T. McGuire, G. Falciglia, K. T. Gobeske, C. Czeisler, and J. A. Kessler.** 2008. Noggin expands neural stem cells in the adult hippocampus. *J.Neurosci.* **28**:9194-9204.
92. **Lippman, J. and A. Dunaevsky.** 2005. Dendritic spine morphogenesis and plasticity. *J.Neurobiol.* **64**:47-57.
93. **Stroemer, R. P., T. A. Kent, and C. E. Hulsebosch.** 1995. Neocortical neural sprouting, synaptogenesis, and behavioral recovery after neocortical infarction in rats. *Stroke* **26**:2135-2144.
94. **Brock, T. O. and J. P. O'Callaghan.** 1987. Quantitative changes in the synaptic vesicle proteins synapsin I and p38 and the astrocyte-specific protein glial fibrillary acidic protein are associated with chemical-induced injury to the rat central nervous system. *J.Neurosci.* **7**:931-942.

95. **Cabalka, L. M., T. C. Ritchie, and J. D. Coulter.** 1990. Immunolocalization and quantitation of a novel nerve terminal protein in spinal cord development. *J.Comp Neurol.* **295**:83-91.
96. **Leclerc, N., P. W. Beesley, I. Brown, M. Colonnier, J. W. Gurd, T. Paladino, and R. Hawkes.** 1989. Synaptophysin expression during synaptogenesis in the rat cerebellar cortex. *J.Comp Neurol.* **280**:197-212.
97. **Masliah, E., R. D. Terry, R. M. DeTeresa, and L. A. Hansen.** 1989. Immunohistochemical quantification of the synapse-related protein synaptophysin in Alzheimer disease. *Neurosci.Lett.* **103**:234-239.
98. **Masliah, E., R. D. Terry, M. Alford, and R. DeTeresa.** 1990. Quantitative immunohistochemistry of synaptophysin in human neocortex: an alternative method to estimate density of presynaptic terminals in paraffin sections. *J.Histochem.Cytochem.* **38**:837-844.
99. **Masliah, E., A. M. Fagan, R. D. Terry, R. DeTeresa, M. Mallory, and F. H. Gage.** 1991. Reactive synaptogenesis assessed by synaptophysin immunoreactivity is associated with GAP-43 in the dentate gyrus of the adult rat. *Exp.Neurol.* **113**:131-142.
100. **Wright, D. J., T. C. Ritchie, and J. D. Coulter.** 1991. Distribution and developmental expression of the nerve terminal protein NT75 in the rat cerebellum. *J.Comp Neurol.* **304**:530-543.
101. **Sun, M. K., J. Hongpaisan, T. J. Nelson, and D. L. Alkon.** 2008. Poststroke neuronal rescue and synaptogenesis mediated in vivo by protein kinase C in adult brains. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **105**:13620-13625.
102. **Staton, C. A., S. M. Stribbling, S. Tazzyman, R. Hughes, N. J. Brown, and C. E. Lewis.** 2004. Current methods for assaying angiogenesis in vitro and in vivo. *Int.J.Exp.Pathol.* **85**:233-248.
103. **Folkman, J. and Y. Shing.** 1992. Angiogenesis. *J.Biol.Chem.* **267**:10931-10934.
104. **Conway, E. M., D. Collen, and P. Carmeliet.** 2001. Molecular mechanisms of blood vessel growth. *Cardiovasc.Res.* **49**:507-521.
105. **Camos, S. and J. Mallolas.** 2010. Experimental models for assaying microvascular endothelial cell pathophysiology in stroke. *Molecules.* **15**:9104-9134.
106. **Navaratna, D., S. Guo, K. Arai, and E. H. Lo.** 2009. Mechanisms and targets for angiogenic therapy after stroke. *Cell Adh.Migr.* **3**:216-223.
107. **Krupinski, J., J. Kaluza, P. Kumar, S. Kumar, and J. M. Wang.** 1994. Role of angiogenesis in patients with cerebral ischemic stroke. *Stroke* **25**:1794-1798.
108. **Krupinski, J., J. Kaluza, P. Kumar, S. Kumar, and J. M. Wang.** 1993. Some remarks on the growth-rate and angiogenesis of microvessels in ischemic stroke. Morphometric and immunocytochemical studies. *Patol.Pol.* **44**:203-209.
109. **Manoonkitiwongsa, P. S., C. Jackson-Friedman, P. J. McMillan, R. L. Schultz, and P. D. Lyden.** 2001. Angiogenesis after stroke is correlated with increased numbers of macrophages: the clean-up hypothesis. *J.Cereb.Blood Flow Metab* **21**:1223-1231.
110. **Arkuszewski, M., M. Swiat, and G. Opala.** 2009. Perfusion computed tomography in prediction of functional outcome in patients with acute ischaemic stroke. *Nucl.Med.Rev.Cent.East Eur.* **12**:89-94.
111. **Bliss, T. M., R. H. Andres, and G. K. Steinberg.** 2010. Optimizing the success of cell transplantation therapy for stroke. *Neurobiol.Dis.* **37**:275-283.
112. **Chopp, M., Z. G. Zhang, and Q. Jiang.** 2007. Neurogenesis, angiogenesis, and MRI indices of functional recovery from stroke. *Stroke* **38**:827-831.
113. **Hermann, D. M. and M. Chopp.** 2012. Promoting brain remodelling and plasticity for stroke recovery: therapeutic promise and potential pitfalls of clinical translation. *Lancet Neurol.* **11**:369-380.
114. **Wang, L., Z. G. Zhang, R. L. Zhang, S. R. Gregg, A. Hozeska-Solgot, Y. LeTourneau, Y. Wang, and M. Chopp.** 2006. Matrix metalloproteinase 2 (MMP2) and MMP9 secreted

- by erythropoietin-activated endothelial cells promote neural progenitor cell migration. *J.Neurosci.* **26**:5996-6003.
115. **Zhang, Z. G. and M. Chopp.** 2009. Neurorestorative therapies for stroke: underlying mechanisms and translation to the clinic. *Lancet Neurol.* **8**:491-500.
 116. **Brea, D., T. Sobrino, P. Ramos-Cabrera, and J. Castillo.** 2009. [Reorganisation of the cerebral vasculature following ischaemia]. *Rev.Neurol.* **49**:645-654.
 117. **Masada, T., Y. Hua, G. Xi, S. R. Ennis, and R. F. Keep.** 2001. Attenuation of ischemic brain edema and cerebrovascular injury after ischemic preconditioning in the rat. *J.Cereb.Blood Flow Metab* **21**:22-33.
 118. **van Bruggen, N., H. Thibodeaux, J. T. Palmer, W. P. Lee, L. Fu, B. Cairns, D. Tumas, R. Gerlai, S. P. Williams, C. M. van Lookeren, and N. Ferrara.** 1999. VEGF antagonism reduces edema formation and tissue damage after ischemia/reperfusion injury in the mouse brain. *J.Clin.Invest* **104**:1613-1620.
 119. **Beck, H. and K. H. Plate.** 2009. Angiogenesis after cerebral ischemia. *Acta Neuropathol.* **117**:481-496.
 120. 2013. Imgenex. <http://imgenex.com/TranscriptionFactors.php>.
 121. 2013. <http://www.revistafitotecniamexicana.org/documentos/36-2/2a.pdf>.
 122. 2013. Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology. <http://atlasgeneticsoncology.org/Educ/TFactorsSpID30020SS.html>.
 123. **Rodriguez-Mercado, R., G. D. Ford, Z. Xu, E. N. Kraiselburd, M. I. Martinez, V. A. Eterovic, E. Colon, I. V. Rodriguez, P. Portilla, P. A. Ferchmin, L. Gierbolini, M. Rodriguez-Carrasquillo, M. D. Powell, J. V. Pulliam, C. O. McCraw, A. Gates, and B. D. Ford.** 2012. Acute neuronal injury and blood genomic profiles in a nonhuman primate model for ischemic stroke. *Comp Med.* **62**:427-438.
 124. **Xu, Z., G. D. Ford, D. R. Croslan, J. Jiang, A. Gates, R. Allen, and B. D. Ford.** 2005. Neuroprotection by neuregulin-1 following focal stroke is associated with the attenuation of ischemia-induced pro-inflammatory and stress gene expression. *Neurobiol.Dis.* **19**:461-470.
 125. **Camos, S., C. Gubern, M. Sobrado, R. Rodriguez, V. G. Romera, M. A. Moro, I. Lizasoain, J. Serena, J. Mallolas, and M. Castellanos.** 2014. The high-mobility group I-Y transcription factor is involved in cerebral ischemia and modulates the expression of angiogenic proteins. *Neuroscience* **269C**:112-130.
 126. **Pulliam, J. V., Z. Xu, G. D. Ford, C. Liu, Y. Li, K. C. Stovall, V. S. Cannon, T. Tewolde, C. S. Moreno, and B. D. Ford.** 2013. Computational identification of conserved transcription factor binding sites upstream of genes induced in rat brain by transient focal ischemic stroke. *Brain Res.* **1495**:76-85.
 127. **Collino, M., N. S. Patel, and C. Thiemermann.** 2008. PPARs as new therapeutic targets for the treatment of cerebral ischemia/reperfusion injury. *Ther.Adv.Cardiovasc.Dis.* **2**:179-197.
 128. **Nadareishvili, Z. and J. Hallenbeck.** 2003. Neuronal regeneration after stroke. *N.Engl.J.Med.* **348**:2355-2356.
 129. **Zhang, C., H. Wu, X. Zhu, Y. Wang, and J. Guo.** 2011. Role of transcription factors in neurogenesis after cerebral ischemia. *Rev.Neurosci.* **22**:457-465.
 130. **Singh, N., G. Sharma, and V. Mishra.** 2012. Hypoxia inducible factor-1: its potential role in cerebral ischemia. *Cell Mol.Neurobiol.* **32**:491-507.
 131. **Kitagawa, K., T. Sasaki, Y. Terasaki, Y. Yagita, and H. Mochizuki.** 2012. [CREB activation is a key player for ischemic tolerance in the brain]. *Rinsho Shinkeigaku* **52**:904-907.
 132. **Baranova, O., L. F. Miranda, P. Pichiule, I. Dragatsis, R. S. Johnson, and J. C. Chavez.** 2007. Neuron-specific inactivation of the hypoxia inducible factor 1 alpha increases brain injury in a mouse model of transient focal cerebral ischemia. *J.Neurosci.* **27**:6320-6332.

133. **Li, L., X. Zhang, L. Cui, L. Wang, H. Liu, H. Ji, and Y. Du.** 2013. Ursolic acid promotes the neuroprotection by activating Nrf2 pathway after cerebral ischemia in mice. *Brain Res.* **1497**:32-39.
134. **Gubern, C., S. Camos, O. Hurtado, R. Rodriguez, V. G. Romera, M. Sobrado, R. Canadas, M. A. Moro, I. Lizasoain, J. Serena, J. Mallolas, and M. Castellanos.** 2014. Characterization of Gcf2/Lrrfip1 in experimental cerebral ischemia and its role as a modulator of Akt, mTOR and beta-catenin signaling pathways. *Neuroscience* **268C**:48-65.
135. **Raivich, G.** 2011. Transcribing the path to neurological recovery-From early signals through transcription factors to downstream effectors of successful regeneration. *Ann.Anat.* **193**:248-258.
136. **Zhang, Y., S. Huang, B. Wang, B. Sun, W. Li, X. Lu, and X. Ding.** 2012. Atorvastatin and whisker stimulation synergistically enhance angiogenesis in the barrel cortex of rats following focal ischemia. *Neurosci.Lett.* **525**:135-139.
137. **Chen, S. T., C. Y. Hsu, E. L. Hogan, H. Maricq, and J. D. Balentine.** 1986. A model of focal ischemic stroke in the rat: reproducible extensive cortical infarction. *Stroke* **17**:738-743.
138. **Liu, T. H., J. S. Beckman, B. A. Freeman, E. L. Hogan, and C. Y. Hsu.** 1989. Polyethylene glycol-conjugated superoxide dismutase and catalase reduce ischemic brain injury. *Am.J.Physiol* **256**:H589-H593.
139. **Sobrado, M., M. G. Lopez, F. Carceller, A. G. Garcia, and J. M. Roda.** 2003. Combined nimodipine and citicoline reduce infarct size, attenuate apoptosis and increase bcl-2 expression after focal cerebral ischemia. *Neuroscience* **118**:107-113.
140. **Sobrado, M., M. Delgado, E. Fernandez-Valle, L. Garcia-Garcia, M. Torres, J. Sanchez-Prieto, J. Vivancos, R. Manzanares, M. A. Moro, M. A. Pozo, and I. Lizasoain.** 2011. Longitudinal studies of ischemic penumbra by using 18F-FDG PET and MRI techniques in permanent and transient focal cerebral ischemia in rats. *Neuroimage.* **57**:45-54.
141. **Tamura, A., D. I. Graham, J. McCulloch, and G. M. Teasdale.** 1981. Focal cerebral ischaemia in the rat: 1. Description of technique and early neuropathological consequences following middle cerebral artery occlusion. *J.Cereb.Blood Flow Metab* **1**:53-60.
142. **Bederson, J. B., L. H. Pitts, M. Tsuji, M. C. Nishimura, R. L. Davis, and H. Bartkowski.** 1986. Rat middle cerebral artery occlusion: evaluation of the model and development of a neurologic examination. *Stroke* **17**:472-476.
143. **Hurtado, O., M. A. Moro, A. Cardenas, V. Sanchez, P. Fernandez-Tome, J. C. Leza, P. Lorenzo, J. J. Secades, R. Lozano, A. Davalos, J. Castillo, and I. Lizasoain.** 2005. Neuroprotection afforded by prior citicoline administration in experimental brain ischemia: effects on glutamate transport. *Neurobiol.Dis.* **18**:336-345.
144. **Mallolas, J., O. Hurtado, M. Castellanos, M. Blanco, T. Sobrino, J. Serena, J. Vivancos, J. Castillo, I. Lizasoain, M. A. Moro, and A. Davalos.** 2006. A polymorphism in the EAAT2 promoter is associated with higher glutamate concentrations and higher frequency of progressing stroke. *J.Exp.Med.* **203**:711-717.
145. **Goldberg, M. P. and D. W. Choi.** 1993. Combined oxygen and glucose deprivation in cortical cell culture: calcium-dependent and calcium-independent mechanisms of neuronal injury. *J.Neurosci.* **13**:3510-3524.
146. **Aird, W. C.** 2007. Phenotypic heterogeneity of the endothelium: II. Representative vascular beds. *Circ.Res.* **100**:174-190.
147. **Harkness, K. A., J. D. Sussman, G. A. Davies-Jones, J. Greenwood, and M. N. Woodroffe.** 2003. Cytokine regulation of MCP-1 expression in brain and retinal microvascular endothelial cells. *J.Neuroimmunol.* **142**:1-9.

148. **Hoehn, B. D., S. I. Harik, and A. G. Hudetz.** 2002. VEGF mRNA expressed in microvessels of neonatal and adult rat cerebral cortex. *Brain Res.Mol.Brain Res.* **101**:103-108.
149. **Hansen, M. B., S. E. Nielsen, and K. Berg.** 1989. Re-examination and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth/cell kill. *J.Immunol.Methods* **119**:203-210.
150. **Mosmann, T.** 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J.Immunol.Methods* **65**:55-63.
151. **Hurtado, O., I. Lizasoain, P. Fernandez-Tome, A. Alvarez-Barrientos, J. C. Leza, P. Lorenzo, and M. A. Moro.** 2002. TACE/ADAM17-TNF-alpha pathway in rat cortical cultures after exposure to oxygen-glucose deprivation or glutamate. *J.Cereb.Blood Flow Metab* **22**:576-585.
152. **Romera, C., O. Hurtado, S. H. Botella, I. Lizasoain, A. Cardenas, P. Fernandez-Tome, J. C. Leza, P. Lorenzo, and M. A. Moro.** 2004. In vitro ischemic tolerance involves upregulation of glutamate transport partly mediated by the TACE/ADAM17-tumor necrosis factor-alpha pathway. *J.Neurosci.* **24**:1350-1357.
153. **Romera, C., O. Hurtado, J. Mallolas, M. P. Pereira, J. R. Morales, A. Romera, J. Serena, J. Vivancos, F. Nombela, P. Lorenzo, I. Lizasoain, and M. A. Moro.** 2007. Ischemic preconditioning reveals that GLT1/EAAT2 glutamate transporter is a novel PPARgamma target gene involved in neuroprotection. *J.Cereb.Blood Flow Metab* **27**:1327-1338.
154. 2013. Pubmed. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>.
155. **Benson, D. A., M. Cavanaugh, K. Clark, I. Karsch-Mizrachi, D. J. Lipman, J. Ostell, and E. W. Sayers.** 2013. GenBank. *Nucleic Acids Res.* **41**:D36-D42.
156. 2013. NCBI database. NCBI database <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>.
157. 2013. NCBI: the Reference Sequence database. NCBI <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21091/>.
158. 2013. RSCB. <http://home.rcsb.org/> <http://home.rcsb.org/>.
159. **Farre, D., R. Roset, M. Huerta, J. E. Adsuara, L. Rosello, M. M. Alba, and X. Messeguer.** 2003. Identification of patterns in biological sequences at the ALGGEN server: PROMO and MALGEN. *Nucleic Acids Res.* **31**:3651-3653.
160. **Messeguer, X., R. Escudero, D. Farre, O. Nunez, J. Martinez, and M. M. Alba.** 2002. PROMO: detection of known transcription regulatory elements using species-tailored searches. *Bioinformatics.* **18**:333-334.
161. 2013. Ensembl. <http://www.ensembl.org> <http://www.ensembl.org>.
162. **Flicek, P., I. Ahmed, M. R. Amode, D. Barrell, K. Beal, S. Brent, D. Carvalho-Silva, P. Clapham, G. Coates, S. Fairley, S. Fitzgerald, L. Gil, C. Garcia-Giron, L. Gordon, T. Hourlier, S. Hunt, T. Juettemann, A. K. Kahari, S. Keenan, M. Komorowska, E. Kulesha, I. Longden, T. Maurel, W. M. McLaren, M. Muffato, R. Nag, B. Overduin, M. Pignatelli, B. Pritchard, E. Pritchard, H. S. Riat, G. R. Ritchie, M. Ruffier, M. Schuster, D. Sheppard, D. Sobral, K. Taylor, A. Thormann, S. Trevanion, S. White, S. P. Wilder, B. L. Aken, E. Birney, F. Cunningham, I. Dunham, J. Harrow, J. Herrero, T. J. Hubbard, N. Johnson, R. Kinsella, A. Parker, G. Spudich, A. Yates, A. Zadissa, and S. M. Searle.** 2013. Ensembl 2013. *Nucleic Acids Res.* **41**:D48-D55.
163. **Needleman, S. B. and C. D. Wunsch.** 1970. A general method applicable to the search for similarities in the amino acid sequence of two proteins. *J.Mol.Biol.* **48**:443-453.
164. 2013. ClustalW2. <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>.
165. 2013. Multiple Alignment. Universidad Nacional de Colombia <http://bioinf.ibun.unal.edu.co/documentos/multAlignmentCBIB.pdf>.
166. **Thompson, J. D., D. G. Higgins, and T. J. Gibson.** 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting,

- position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* **22**:4673-4680.
167. 2013. Primer3. <http://primer3.ut.ee/> <http://primer3.ut.ee/>.
168. **Chuang, L. Y., Y. H. Cheng, and C. H. Yang.** 2013. Specific primer design for the polymerase chain reaction. *Biotechnol.Lett.*
169. **Rozen, S. a. S. H. J.** 2013. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers., p. 365-386. *In*: M. S. Krawetz S (ed.), *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology.* Humana Press, Totowa, NJ.
170. **Bradford, A. and K. Lees.** 2000. Design of the Intravenous Magnesium Efficacy in Acute Stroke (IMAGES) trial. *Curr.Control Trials Cardiovasc.Med.* **1**:184-190.
171. **Sobrado, M., M. P. Pereira, I. Ballesteros, O. Hurtado, D. Fernandez-Lopez, J. M. Pradillo, J. R. Caso, J. Vivancos, F. Nombela, J. Serena, I. Lizasoain, and M. A. Moro.** 2009. Synthesis of lipoxin A4 by 5-lipoxygenase mediates PPARgamma-dependent, neuroprotective effects of rosiglitazone in experimental stroke. *J.Neurosci.* **29**:3875-3884.
172. **Longo, M. C., M. S. Berninger, and J. L. Hartley.** 1990. Use of uracil DNA glycosylase to control carry-over contamination in polymerase chain reactions. *Gene* **93**:125-128.
173. **Gubern, C., O. Hurtado, R. Rodriguez, J. R. Morales, V. G. Romera, M. A. Moro, I. Lizasoain, J. Serena, and J. Mallolas.** 2009. Validation of housekeeping genes for quantitative real-time PCR in in-vivo and in-vitro models of cerebral ischaemia. *BMC.Mol.Biol.* **10**:57.
174. **Livak, K. J. and T. D. Schmittgen.** 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* **25**:402-408.
175. 2013. TRANSFAC: biological databases. Biological databases <http://www.biobase-international.com/product/transcription-factor-binding-sites>.
176. **Chenna, R., H. Sugawara, T. Koike, R. Lopez, T. J. Gibson, D. G. Higgins, and J. D. Thompson.** 2003. Multiple sequence alignment with the Clustal series of programs. *Nucleic Acids Res.* **31**:3497-3500.
177. **Shurin, G. V., R. L. Ferris, I. L. Tourkova, L. Perez, A. Lokshin, L. Balkir, B. Collins, G. S. Chatta, and M. R. Shurin.** 2005. Loss of new chemokine CXCL14 in tumor tissue is associated with low infiltration by dendritic cells (DC), while restoration of human CXCL14 expression in tumor cells causes attraction of DC both in vitro and in vivo. *J.Immunol.* **174**:5490-5498.
178. **Hansmann, G., J. P. de, V, T. P. Alastalo, C. M. Alvira, C. Guignabert, J. M. Bekker, S. Schellong, T. Urashima, L. Wang, N. W. Morrell, and M. Rabinovitch.** 2008. An antiproliferative BMP-2/PPARgamma/apoE axis in human and murine SMCs and its role in pulmonary hypertension. *J.Clin.Invest* **118**:1846-1857.
179. **Qin, J., M. J. Li, P. Wang, M. Q. Zhang, and J. Wang.** 2011. ChIP-Array: combinatory analysis of ChIP-seq/chip and microarray gene expression data to discover direct/indirect targets of a transcription factor. *Nucleic Acids Res.* **39**:W430-W436.
180. **Liu, D. M., L. Jin, H. Wang, H. Y. Zhao, C. L. Zhao, and H. Yang.** 2008. RNA interference mediated silencing of alpha-synuclein in MN9D cells and its effects on cell viability. *Neurosci.Bull.* **24**:96-104.
181. **Sapru, M. K., J. W. Yates, S. Hogan, L. Jiang, J. Halter, and M. C. Bohn.** 2006. Silencing of human alpha-synuclein in vitro and in rat brain using lentiviral-mediated RNAi. *Exp.Neurol.* **198**:382-390.
182. **Lipfert, J., V. Odemis, and J. Engele.** 2013. Grk2 is an essential regulator of CXCR7 signalling in astrocytes. *Cell Mol.Neurobiol.* **33**:111-118.
183. **Yang, Y., H. Wang, J. Zhang, F. Luo, K. Herrup, J. A. Bibb, R. Lu, and R. H. Miller.** 2013. Cyclin dependent kinase 5 is required for the normal development of oligodendrocytes and myelin formation. *Dev.Biol.* **378**:94-106.

184. **Feng, J., T. Wang, Q. Li, X. Wu, and X. Qin.** 2012. RNA interference against repulsive guidance molecule A improves axon sprout and neural function recovery of rats after MCAO/reperfusion. *Exp.Neurol.* **238**:235-242.
185. **Ferres-Coy, A., F. Pilar-Cuellar, R. Vidal, V. Paz, M. Masana, R. Cortes, M. C. Carmona, L. Campa, A. Pazos, A. Montefeltro, E. M. Valdizan, F. Artigas, and A. Bortolozzi.** 2013. RNAi-mediated serotonin transporter suppression rapidly increases serotonergic neurotransmission and hippocampal neurogenesis. *Transl.Psychiatry* **3**:e211.
186. **Rodriguez-Lebron, E., C. M. Gouvion, S. A. Moore, B. L. Davidson, and H. L. Paulson.** 2009. Allele-specific RNAi mitigates phenotypic progression in a transgenic model of Alzheimer's disease. *Mol.Ther.* **17**:1563-1573.
187. **Lobner, D.** 2000. Comparison of the LDH and MTT assays for quantifying cell death: validity for neuronal apoptosis? *J.Neurosci.Methods* **96**:147-152.
188. **Pan, L. N., W. Zhu, C. Li, X. L. Xu, L. J. Guo, and Q. Lu.** 2012. Toll-like receptor 3 agonist Poly I:C protects against simulated cerebral ischemia in vitro and in vivo. *Acta Pharmacol.Sin.* **33**:1246-1253.
189. **Xie, R., X. Li, Y. Ling, C. Shen, X. Wu, W. Xu, and X. Gao.** 2012. Alpha-lipoic acid pre- and post-treatments provide protection against in vitro ischemia-reperfusion injury in cerebral endothelial cells via Akt/mTOR signaling. *Brain Res.* **1482**:81-90.
190. **Cory, G.** 2011. Scratch-wound assay. *Methods Mol.Biol.* **769**:25-30.
191. **Denker, S. P. and D. L. Barber.** 2002. Cell migration requires both ion translocation and cytoskeletal anchoring by the Na-H exchanger NHE1. *J.Cell Biol.* **159**:1087-1096.
192. **Walsh, E. M., R. Kim, L. Del Valle, M. Weaver, J. Sheffield, P. Lazarovici, and C. Marcinkiewicz.** 2012. Importance of interaction between nerve growth factor and alpha9beta1 integrin in glial tumor angiogenesis. *Neuro.Oncol.* **14**:890-901.
193. **Latchman, D. S.** 1996. The Oct-2 transcription factor. *Int.J.Biochem.Cell Biol.* **28**:1081-1083.
194. **Latchman, D. S.** 1996. Activation and repression of gene expression by POU family transcription factors. *Philos.Trans.R.Soc.Lond B Biol.Sci.* **351**:511-515.
195. **Corcoran, L. M., F. Koentgen, W. Dietrich, M. Veale, and P. O. Humbert.** 2004. All known in vivo functions of the Oct-2 transcription factor require the C-terminal protein domain. *J.Immunol.* **172**:2962-2969.
196. **Annweiler, A., S. Zwilling, and T. Wirth.** 1994. Functional differences between the Oct2 transactivation domains determine the transactivation potential of individual Oct2 isoforms. *Nucleic Acids Res.* **22**:4250-4258.
197. **Lillycrop, K. A., J. K. Estridge, and D. S. Latchman.** 1994. Functional interaction between different isoforms of the Oct-2 transcription factor expressed in neuronal cells. *Biochem.J.* **298 (Pt 1)**:245-248.
198. **Lelievre, E., F. Lionneton, F. Soncin, and B. Vandebunder.** 2001. The Ets family contains transcriptional activators and repressors involved in angiogenesis. *Int.J.Biochem.Cell Biol.* **33**:391-407.
199. **Sato, Y., K. Teruyama, T. Nakano, N. Oda, M. Abe, K. Tanaka, and C. Iwasaka-Yagi.** 2001. Role of transcription factors in angiogenesis: Ets-1 promotes angiogenesis as well as endothelial apoptosis. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* **947**:117-123.
200. **Agarwal, P., M. P. Verzi, T. Nguyen, J. Hu, M. L. Ehlers, D. J. McCulley, S. M. Xu, E. Dodou, J. P. Anderson, M. L. Wei, and B. L. Black.** 2011. The MADS box transcription factor MEF2C regulates melanocyte development and is a direct transcriptional target and partner of SOX10. *Development* **138**:2555-2565.
201. **Ikeshima, H., S. Imai, K. Shimoda, J. Hata, and T. Takano.** 1995. Expression of a MADS box gene, MEF2D, in neurons of the mouse central nervous system: implication of its binary function in myogenic and neurogenic cell lineages. *Neurosci.Lett.* **200**:117-120.

202. **Naya, F. J., C. Wu, J. A. Richardson, P. Overbeek, and E. N. Olson.** 1999. Transcriptional activity of MEF2 during mouse embryogenesis monitored with a MEF2-dependent transgene. *Development* **126**:2045-2052.
203. **Crack, P. J. and J. M. Taylor.** 2005. Reactive oxygen species and the modulation of stroke. *Free Radic.Biol.Med.* **38**:1433-1444.
204. **Qin, Z. H., Y. Wang, M. Nakai, and T. N. Chase.** 1998. Nuclear factor-kappa B contributes to excitotoxin-induced apoptosis in rat striatum. *Mol.Pharmacol.* **53**:33-42.
205. **Chen, J., T. Willingham, L. R. Margraf, N. Schreiber-Agus, R. A. DePinho, and P. D. Nisen.** 1995. Effects of the MYC oncogene antagonist, MAD, on proliferation, cell cycling and the malignant phenotype of human brain tumour cells. *Nat.Med.* **1**:638-643.
206. **Tencheva, T. and I. R. Panov.** 2008. Intracerebral development of transplanted glioblastoma C6 cells in rats after preliminary exposure to neuropeptides and an MAPK inhibitor. *Neurosci.Behav.Physiol* **38**:913-916.
207. **Giaginis, C., C. Klonaris, A. Katsargyris, G. Kouraklis, C. Spiliopoulou, and S. Theocharis.** 2011. Correlation of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-gamma (PPAR-gamma) and Retinoid X Receptor-alpha (RXR-alpha) expression with clinical risk factors in patients with advanced carotid atherosclerosis. *Med.Sci.Monit.* **17**:CR381-CR391.
208. **Lee, S. H. and M. M. Mouradian.** 1999. Up-regulation of D1A dopamine receptor gene transcription by estrogen. *Mol.Cell Endocrinol.* **156**:151-157.
209. **Mathisen, G. H., A. B. Fallgren, B. O. Strom, K. A. Boldingh Debernard, B. U. Mohebi, and R. E. Paulsen.** 2011. Delayed translocation of NGFI-B/RXR in glutamate stimulated neurons allows late protection by 9-cis retinoic acid. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **414**:90-95.
210. **Hossmann K-A and Traystman RJ.** 2013. Cerebral blood flow and the ischemic penumbra, p. 67-92. *In*: M.Fisher (ed.), *Stroke*, Part I.
211. **Kristie, T. M. and P. A. Sharp.** 1990. Interactions of the Oct-1 POU subdomains with specific DNA sequences and with the HSV alpha-trans-activator protein. *Genes Dev.* **4**:2383-2396.
212. **Lillycrop, K. A. and D. S. Latchman.** 1992. Alternative splicing of the Oct-2 transcription factor RNA is differentially regulated in neuronal cells and B cells and results in protein isoforms with opposite effects on the activity of octamer/TAATGARAT-containing promoters. *J.Biol.Chem.* **267**:24960-24965.
213. **Wirth, T., A. Priess, A. Annweiler, S. Zwilling, and B. Oeler.** 1991. Multiple Oct2 isoforms are generated by alternative splicing. *Nucleic Acids Res.* **19**:43-51.
214. **Staudt, L. M., R. G. Clerc, H. Singh, J. H. LeBowitz, P. A. Sharp, and D. Baltimore.** 1988. Cloning of a lymphoid-specific cDNA encoding a protein binding the regulatory octamer DNA motif. *Science* **241**:577-580.
215. **Singh, H., R. Sen, D. Baltimore, and P. A. Sharp.** 1986. A nuclear factor that binds to a conserved sequence motif in transcriptional control elements of immunoglobulin genes. *Nature* **319**:154-158.
216. **He, X., M. N. Treacy, D. M. Simmons, H. A. Ingraham, L. W. Swanson, and M. G. Rosenfeld.** 1989. Expression of a large family of POU-domain regulatory genes in mammalian brain development. *Nature* **340**:35-41.
217. **Schreiber, E., K. Harshman, I. Kemler, U. Malipiero, W. Schaffner, and A. Fontana.** 1990. Astrocytes and glioblastoma cells express novel octamer-DNA binding proteins distinct from the ubiquitous Oct-1 and B cell type Oct-2 proteins. *Nucleic Acids Res.* **18**:5495-5503.
218. **Boutet, S. C., T. Quertermous, and B. M. Fadel.** 2001. Identification of an octamer element required for in vivo expression of the TIE1 gene in endothelial cells. *Biochem.J.* **360**:23-29.

219. **Hatzopoulos, A. K., A. S. Stoykova, J. R. Erselius, M. Goulding, T. Neuman, and P. Gruss.** 1990. Structure and expression of the mouse Oct2a and Oct2b, two differentially spliced products of the same gene. *Development* **109**:349-362.
220. **He, X., M. N. Treacy, D. M. Simmons, H. A. Ingraham, L. W. Swanson, and M. G. Rosenfeld.** 1989. Expression of a large family of POU-domain regulatory genes in mammalian brain development. *Nature* **340**:35-41.
221. **Kemp, L. M., C. L. Dent, and D. S. Latchman.** 1990. Octamer motif mediates transcriptional repression of HSV immediate-early genes and octamer-containing cellular promoters in neuronal cells. *Neuron* **4**:215-222.
222. **Lillycrop, K. A., C. L. Dent, S. C. Wheatley, M. N. Beech, N. N. Ninkina, J. N. Wood, and D. S. Latchman.** 1991. The octamer-binding protein Oct-2 represses HSV immediate-early genes in cell lines derived from latently infectable sensory neurons. *Neuron* **7**:381-390.
223. **Scholer, H. R., A. K. Hatzopoulos, R. Balling, N. Suzuki, and P. Gruss.** 1989. A family of octamer-specific proteins present during mouse embryogenesis: evidence for germline-specific expression of an Oct factor. *EMBO J.* **8**:2543-2550.
224. **Stoykova, A. S., S. Sterrer, J. R. Erselius, A. K. Hatzopoulos, and P. Gruss.** 1992. Mini-Oct and Oct-2c: two novel, functionally diverse murine Oct-2 gene products are differentially expressed in the CNS. *Neuron* **8**:541-558.
225. **Dent, C. L., K. A. Lillycrop, J. K. Estridge, N. S. Thomas, and D. S. Latchman.** 1991. The B-cell and neuronal forms of the octamer-binding protein Oct-2 differ in DNA-binding specificity and functional activity. *Mol. Cell Biol.* **11**:3925-3930.
226. **Camos, S., C. Gubern, M. Sobrado, R. Rodriguez, V. G. Romera, M. A. Moro, I. Lizasoain, J. Serena, J. Mallolas, and M. Castellanos.** 2014. Oct-2 transcription factor binding activity and expression up-regulation in rat cerebral ischaemia is associated with a diminution of neuronal damage in vitro. *Neuromolecular.Med.* **16**:332-349.
227. **Phillips, K. and B. Luisi.** 2000. The virtuoso of versatility: POU proteins that flex to fit. *J.Mol.Biol.* **302**:1023-1039.
228. **Andersen, B. and M. G. Rosenfeld.** 2001. POU domain factors in the neuroendocrine system: lessons from developmental biology provide insights into human disease. *Endocr.Rev.* **22**:2-35.
229. **Martinez, E.** 2002. Multi-protein complexes in eukaryotic gene transcription. *Plant Mol.Biol.* **50**:925-947.
230. **Gwag, B. J., D. Lobner, J. Y. Koh, M. B. Wie, and D. W. Choi.** 1995. Blockade of glutamate receptors unmasks neuronal apoptosis after oxygen-glucose deprivation in vitro. *Neuroscience* **68**:615-619.
231. **Koh, J. Y. and D. W. Choi.** 1987. Quantitative determination of glutamate mediated cortical neuronal injury in cell culture by lactate dehydrogenase efflux assay. *J.Neurosci.Methods* **20**:83-90.
232. **Arce, C., S. Diaz-Castroverde, M. J. Canales, J. Marco-Contelles, A. Samadi, M. J. Oset-Gasque, and M. P. Gonzalez.** 2012. Drugs for stroke: action of nitron (Z)-N-(2-bromo-5-hydroxy-4-methoxybenzylidene)-2-methylpropan-2-amine oxide on rat cortical neurons in culture subjected to oxygen-glucose-deprivation. *Eur.J.Med.Chem.* **55**:475-479.
233. **Thoresen, M., X. Liu, S. Jary, E. Brown, H. Sabir, J. Stone, F. Cowan, and M. Karlsson.** 2012. Lactate dehydrogenase in hypothermia-treated newborn infants with hypoxic-ischaemic encephalopathy. *Acta Paediatr.* **101**:1038-1044.
234. **Kim, D. H., X. Zhao, C. H. Tu, P. Casaccia-Bonnel, and M. V. Chao.** 2004. Prevention of apoptotic but not necrotic cell death following neuronal injury by neurotrophins signaling through the tyrosine kinase receptor. *J.Neurosurg.* **100**:79-87.

235. **Wood, J. N., K. A. Lillycrop, C. L. Dent, N. N. Ninkina, M. M. Beech, J. J. Willoughby, J. Winter, and D. S. Latchman.** 1992. Regulation of expression of the neuronal POU protein Oct-2 by nerve growth factor. *J.Biol.Chem.* **267**:17787-17791.
236. **Deans, Z. C., S. J. Dawson, M. W. Kilimann, D. Wallace, M. C. Wilson, and D. S. Latchman.** 1997. Differential regulation of genes encoding synaptic proteins by the Oct-2 transcription factor. *Brain Res.Mol.Brain Res.* **51**:1-7.
237. **Wang, Y. D., N. Cai, X. L. Wu, H. Z. Cao, L. L. Xie, and P. S. Zheng.** 2013. OCT4 promotes tumorigenesis and inhibits apoptosis of cervical cancer cells by miR-125b/BAK1 pathway. *Cell Death.Dis.* **4**:e760.
238. **Heckman, C. A., H. Duan, P. B. Garcia, and L. M. Boxer.** 2006. Oct transcription factors mediate t(14;18) lymphoma cell survival by directly regulating bcl-2 expression. *Oncogene* **25**:888-898.
239. **Hock, R., T. Furusawa, T. Ueda, and M. Bustin.** 2007. HMG chromosomal proteins in development and disease. *Trends Cell Biol.* **17**:72-79.
240. **Catez, F. and R. Hock.** 2010. Binding and interplay of HMG proteins on chromatin: lessons from live cell imaging. *Biochim.Biophys.Acta* **1799**:15-27.
241. **Fedele, M., S. Battista, G. Manfioletti, C. M. Croce, V. Giancotti, and A. Fusco.** 2001. Role of the high mobility group A proteins in human lipomas. *Carcinogenesis* **22**:1583-1591.
242. **Maasch, C., A. Vater, K. Buchner, W. G. Purschke, D. Eulberg, S. Vonhoff, and S. Klussmann.** 2010. Polyethylenimine-polyplexes of Spiegelmer NOX-A50 directed against intracellular high mobility group protein A1 (HMGA1) reduce tumor growth in vivo. *J.Biol.Chem.* **285**:40012-40018.
243. **Reeves, R.** 2001. Molecular biology of HMGA proteins: hubs of nuclear function. *Gene* **277**:63-81.
244. **Gerlitz, G., R. Hock, T. Ueda, and M. Bustin.** 2009. The dynamics of HMG protein-chromatin interactions in living cells. *Biochem.Cell Biol.* **87**:127-137.
245. **Wood, L. J., M. Mukherjee, C. E. Dolde, Y. Xu, J. F. Maher, T. E. Bunton, J. B. Williams, and L. M. Resar.** 2000. HMG-I/Y, a new c-Myc target gene and potential oncogene. *Mol.Cell Biol.* **20**:5490-5502.
246. **Bozek, K., A. Religio, S. M. Kielbasa, M. Heine, C. Dame, A. Kramer, and H. Herzel.** 2009. Regulation of clock-controlled genes in mammals. *PLoS.One.* **4**:e4882.
247. **Battista, S., F. Pentimalli, G. Baldassarre, M. Fedele, V. Fidanza, C. M. Croce, and A. Fusco.** 2003. Loss of Hmga1 gene function affects embryonic stem cell lymphohematopoietic differentiation. *FASEB J.* **17**:1496-1498.
248. **John, S., C. M. Robbins, and W. J. Leonard.** 1996. An IL-2 response element in the human IL-2 receptor alpha chain promoter is a composite element that binds Stat5, Elf-1, HMG-I(Y) and a GATA family protein. *EMBO J.* **15**:5627-5635.
249. **Choi, D., B. Appukuttan, S. J. Binek, S. R. Planck, J. T. Stout, J. T. Rosenbaum, and J. R. Smith.** 2008. Prediction of Cis-Regulatory Elements Controlling Genes Differentially Expressed by Retinal and Choroidal Vascular Endothelial Cells. *J.Ocul.Biol.Dis.Infor.* **1**:37-45.
250. **Massaad-Massade, L., S. Navarro, U. Krummrei, R. Reeves, P. Beaune, and R. Barouki.** 2002. HMGA1 enhances the transcriptional activity and binding of the estrogen receptor to its responsive element. *Biochemistry* **41**:2760-2768.
251. **Massaad-Massade, L., R. Tacine, S. Dulauroy, R. Reeves, and R. Barouki.** 2004. The functional interaction between HMGA1 and the estrogen receptor requires either the N- or the C-terminal domain of the receptor. *FEBS Lett.* **559**:89-95.
252. **Reymann, S. and J. Borlak.** 2008. Transcription profiling of lung adenocarcinomas of c-myc-transgenic mice: identification of the c-myc regulatory gene network. *BMC.Syst.Biol.* **2**:46.

253. **Zhang, Z. G., L. Zhang, Q. Jiang, R. Zhang, K. Davies, C. Powers, N. Bruggen, and M. Chopp.** 2000. VEGF enhances angiogenesis and promotes blood-brain barrier leakage in the ischemic brain. *J.Clin.Invest* **106**:829-838.
254. **Lin, T. N., C. K. Wang, W. M. Cheung, and C. Y. Hsu.** 2000. Induction of angiopoietin and Tie receptor mRNA expression after cerebral ischemia-reperfusion. *J.Cereb.Blood Flow Metab* **20**:387-395.
255. **Zan, L., H. Wu, J. Jiang, S. Zhao, Y. Song, G. Teng, H. Li, Y. Jia, M. Zhou, X. Zhang, J. Qi, and J. Wang.** 2011. Temporal profile of Src, SSeCKS, and angiogenic factors after focal cerebral ischemia: correlations with angiogenesis and cerebral edema. *Neurochem.Int.* **58**:872-879.
256. **Zhang, Z. and M. Chopp.** 2002. Vascular endothelial growth factor and angiopoietins in focal cerebral ischemia. *Trends Cardiovasc.Med.* **12**:62-66.
257. **Zhang, Z. G., L. Zhang, W. Tsang, H. Soltanian-Zadeh, D. Morris, R. Zhang, A. Goussev, C. Powers, T. Yeich, and M. Chopp.** 2002. Correlation of VEGF and angiopoietin expression with disruption of blood-brain barrier and angiogenesis after focal cerebral ischemia. *J.Cereb.Blood Flow Metab* **22**:379-392.
258. **Shen, F., E. J. Walker, L. Jiang, V. Degos, J. Li, B. Sun, F. Heriyanto, W. L. Young, and H. Su.** 2011. Coexpression of angiopoietin-1 with VEGF increases the structural integrity of the blood-brain barrier and reduces atrophy volume. *J.Cereb.Blood Flow Metab* **31**:2343-2351.
259. **Yin, K. J., K. Olsen, M. Hamblin, J. Zhang, S. P. Schwendeman, and Y. E. Chen.** 2012. Vascular endothelial cell-specific microRNA-15a inhibits angiogenesis in hindlimb ischemia. *J.Biol.Chem.* **287**:27055-27064.
260. **Liekens, S., E. De Clercq, and J. Neyts.** 2001. Angiogenesis: regulators and clinical applications. *Biochem.Pharmacol.* **61**:253-270.
261. **Baumer, Y., B. Scholz, S. Ivanov, and B. Schlosshauer.** 2011. Telomerase-based immortalization modifies the angiogenic/inflammatory responses of human coronary artery endothelial cells. *Exp.Biol.Med.(Maywood.)* **236**:692-700.
262. **Steinle, J. J., G. W. Booz, C. J. Meininger, J. N. Day, and H. J. Granger.** 2003. Beta 3-adrenergic receptors regulate retinal endothelial cell migration and proliferation. *J.Biol.Chem.* **278**:20681-20686.
263. **Frasca, F., A. Rustighi, R. Malaguarnera, S. Altamura, P. Vigneri, G. Del Sal, V. Giancotti, V. Pezzino, R. Vigneri, and G. Manfioletti.** 2006. HMGA1 inhibits the function of p53 family members in thyroid cancer cells. *Cancer Res.* **66**:2980-2989.
264. **Yuan, S., Q. Pan, C. Fu, and Z. Bi.** 2011. Silencing of HMGA1 expression by RNA interference suppresses growth of osteogenic sarcoma. *Mol.Cell Biochem.* **355**:281-287.
265. **Zhang, Y., T. Ma, S. Yang, M. Xia, J. Xu, H. An, Y. Yang, and S. Li.** 2011. High-mobility group A1 proteins enhance the expression of the oncogenic miR-222 in lung cancer cells. *Mol.Cell Biochem.* **357**:363-371.
266. **Resar, L. M.** 2010. The high mobility group A1 gene: transforming inflammatory signals into cancer?. *Cancer Res.* **70**:436-439.
267. **Pierantoni, G. M., C. Rinaldo, M. Mottolese, A. Di Benedetto, F. Esposito, S. Soddu, and A. Fusco.** 2007. High-mobility group A1 inhibits p53 by cytoplasmic relocalization of its proapoptotic activator HIPK2. *J.Clin.Invest* **117**:693-702.
268. **Sharma, N., P. L. Bhalla, and M. B. Singh.** 2013. Transcriptome-wide profiling and expression analysis of transcription factor families in a liverwort, *Marchantia polymorpha*. *BMC.Genomics* **14**:915.
269. **Magos Guerrero, Gil A and Lorenzana-Jiménez, Marte.** Las fases en el desarrollo de nuevos medicamentos. *Rev Fac Med UNAM* 52(6), 260-264. 2009. Ref Type: Magazine Article

270. **Farnham, P. J.** 2009. Insights from genomic profiling of transcription factors. *Nat.Rev.Genet.* **10**:605-616.
271. **Dasgupta, S. and B. W. O'Malley.** 2014. Transcriptional coregulators: emerging roles of SRC family of coactivators in disease pathology. *J.Mol.Endocrinol.* **53**:R47-R59.
272. **Shlyueva, D., G. Stampfel, and A. Stark.** 2014. Transcriptional enhancers: from properties to genome-wide predictions. *Nat.Rev.Genet.* **15**:272-286.
273. **Chopp, M., Y. Li, and J. Zhang.** 2008. Plasticity and remodeling of brain. *J.Neurol.Sci.* **265**:97-101.
274. **Gutierrez-Fernandez, M., B. Fuentes, B. Rodriguez-Frutos, J. Ramos-Cejudo, M. T. Vallejo-Cremades, and E. Diez-Tejedor.** 2012. Trophic factors and cell therapy to stimulate brain repair after ischaemic stroke. *J.Cell Mol.Med.* **16**:2280-2290.
275. **Ziemka-Nalecz, M. and T. Zalewska.** 2012. Endogenous neurogenesis induced by ischemic brain injury or neurodegenerative diseases in adults. *Acta Neurobiol.Exp.(Wars.)* **72**:309-324.
276. **Ortiz-Quintero, B.** 2009. [RNA interference: from origins to a novel tool for gene silencing]. *Rev.Invest Clin.* **61**:412-427.