

UNIVERSIDAD DE LEÓN
FACULTAD DE C.C. BIOLÓGICAS Y AMBIENTALES
Dpto. de Biología Molecular
Área de Biología Celular



Tesis Doctoral

**“Efecto de la edad y la inflamación sobre el
sistema glutamatérgico en un modelo de
isquemia cerebral en rata”**

**“Age and Inflammation Effect on the Glutamatergic
System in a Rat Cerebral Ischemia Model”**

Memoria para optar al Grado de Doctor con Mención europea

presentada por

Sheyla Montori Pina

León, Febrero de 2010



INFORME DEL DIRECTOR DE LA TESIS

(Art. 11.3 del R.D. 56/2005)

Los Dres. D. Arsenio Fernández López y Dña. Beatriz Martínez Villayandre como Directores¹ de la Tesis Doctoral titulada **“Efecto de la edad y la inflamación sobre el sistema glutamatérgico en un modelo de isquemia cerebral en rata”** realizada por Dña. **Sheyla Montori Pina** en el Departamento de Biología Molecular, informan favorablemente el depósito de la misma, dado que reúne las condiciones necesarias para su defensa.

Lo que firmamos, para dar cumplimiento al art. 11.3 del R.D. 56/2005, en León a 15 de febrero de 2010.

Fdo.: Arsenio Fernández López

Fdo.: Beatriz Martínez Villayandre

¹ Si la Tesis está dirigida por más de un Director tienen que constar los datos de cada uno y han de firmar todos ellos.



Universidad de León

ADMISIÓN A TRÁMITE DEL DEPARTAMENTO

(Art. 11.3 del R.D. 56/2005 y

Norma 7ª de las Complementarias de la ULE)

El Departamento de Biología Molecular en su reunión celebrada el día 18 de febrero de 2010 ha acordado dar su conformidad a la admisión a trámite de lectura de la Tesis Doctoral titulada “**Efecto de la edad y la inflamación sobre el sistema glutamatérgico en un modelo de isquemia cerebral en rata**”, dirigida por el Dr. D. Arsenio Fernández López y la Dra. Dña. Beatriz Martínez Villayandre, elaborada por Dña. **Sheyla Montori Pina** y cuyo título en inglés es el siguiente “**Age and Inflammation Effect on the Glutamatergic System in a Rat Cerebral Ischemia Model**”.

Lo que firmo, para dar cumplimiento al art. 11.3 del R.D. 56/2005, en León a 18 de febrero de 2010.

El Secretario,

Fdo.: Jesús Fernández Aparicio

Vº Bº

El Director del Departamento,

Fdo.: Pedro Calvo Fernández

A lab is a nurturing environment that aims to maximize the potential of students as scientists and as human beings.

(Uri Alon; *Mol.Cell*, 2009)

Un laboratorio es un ambiente propicio para maximizar el potencial de los estudiantes como científicos y como seres humanos.

AGRADECIMIENTOS

Esta Tesis Doctoral se ha realizado con las siguientes ayudas: Beca concedida por la Universidad de León desde el 1 de julio de 2005 hasta el 1 de abril de 2007, y beca de Formación de Profesorado Universitario (FPU; ref. AP2006-01964) concedida por el Ministerio de Educación y Ciencia (MEC) desde el 2 de abril de 2007 hasta el 30 de junio de 2009. El trabajo de investigación ha sido financiado por el Fondo de Investigaciones Sanitarias (FIS; ref. PI060767).

Quisiera agradecer al Dr. Arsenio Fernández López por haberme dado la oportunidad de realizar mi Tesis Doctoral en su grupo de investigación, donde he podido formarme tanto profesional como personalmente. Mencionar su enorme esfuerzo y dedicación en la realización de los artículos derivados de esta tesis, así como en la revisión de la misma.

Agradecer a la Dra. Beatriz Martínez Villayandre su ayuda durante la realización de esta Tesis Doctoral y, en especial, la lectura crítica de esta memoria.

Al resto del equipo de trabajo del Dr. Fernández López, especialmente al Dr. Carlos César Pérez García y al equipo de cirugía del Dr. José Manuel Gonzalo Orden.

Quiero agradecer a los Dres. Javier Vitorica Ferrández (Sevilla) y Mark Darlison (Reino Unido) por haberme permitido realizar estancias en sus laboratorios, que han enriquecido los conocimientos para la realización de esta Tesis Doctoral.

A Seve, Fuen y Rebeca, por “pastorearme” en el laboratorio al comienzo de esta Tesis Doctoral, complementando la enseñanza del Dr. Fernández López. Y por ser tan buena gente.

Al Área de Biología Celular donde se ha realizado esta Tesis Doctoral, especialmente a los becarios Camino, Sonia, Sera, Leticia, Zè, Irene, Taiana, Laura, Rosalía y Neila, por el buen ambiente creado dentro del departamento. A Alberto Fuertes, por su ayuda en la edición de los artículos. A los nuevos becarios del departamento, que quedan para el futuro.

Agradecer a Marta Fernández Caso y María Rehberger Olivera su inestimable ayuda en el laboratorio.

A mi familia, especialmente a mis padres y abuelos, por ser los primeros en darme su apoyo para la realización de esta Tesis Doctoral y por estar ahí siempre que los he necesitado. A mi abuelo Julián, que siempre me consideró una doctora.

A Eric, porque su apoyo ha sido fundamental durante todos estos años de tesis y por saber esperarme a pesar de la distancia. A su familia, por animarme en todo momento y por ser como son.

A todos mis amigos, especialmente a Rebeca, por las charlas en la cafetería. A mis compañeras de piso y a Iciar y Seni, por facilitarme la estancia en León durante todos estos años.

Y a todas las personas que me han facilitado este trabajo.

¡Muchas gracias!

INDICE

INDICE

ABREVIATURAS	1
RESUMEN.....	5
SUMMARY	8
INTRODUCCIÓN.....	12
ACCIDENTE CEREBROVASCULAR	12
Epidemiología	12
Etiología	13
Factores de riesgo.....	14
ENVEJECIMIENTO Y ACCIDENTE CEREBROVASCULAR.....	15
ISQUEMIA CEREBRAL	16
LA CASCADA ISQUÉMICA	17
EFECTO DE LA EDAD EN LA ISQUEMIA CEREBRAL	26
NEUROTRANSMISIÓN DE AMINOÁCIDOS EXCITATORIOS	26
RECEPTORES DE GLUTAMATO	28
TRANSPORTADORES DE GLUTAMATO.....	36
NEUROTRANSMISIÓN GLUTAMATÉRGICA EN LA ISQUEMIA CEREBRAL.....	40
INFLUENCIA DE LA EDAD EN LA NEUROTRANSMISIÓN GLUTAMATÉRGICA.....	44
MODELOS ANIMALES DE ISQUEMIA CEREBRAL	46
HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS.....	51
MATERIAL Y MÉTODOS	53

MATERIAL BIOLÓGICO Y EQUIPAMIENTO	53
ANIMALES	53
INSTALACIONES Y EQUIPAMIENTO	54
REACTIVOS Y FÁRMACOS	55
ANTICUERPOS	56
RECURSOS INFORMÁTICOS	57
MÉTODOS	58
ISQUEMIA GLOBAL TRANSITORIA	58
TRATAMIENTO ANTIINFLAMATORIO	59
PROCESAMIENTO DEL TEJIDO	60
EXTRACCIÓN DE ARN Y RETROTRANSCRIPCIÓN (RT).....	61
PCR EN TIEMPO REAL.....	61
ENSAYOS DE <i>WESTERN BLOT</i>	64
ENSAYOS DE INMUNOCITOQUÍMICA.....	65
ANÁLISIS ESTADÍSTICO	67
RESULTADOS	69
EFECTO DE LA EDAD	69
SUBUNIDADES DEL RECEPTOR DE NMDA	69
SUBUNIDADES DEL RECEPTOR DE AMPA Y ADAR2	72
TRANSPORTADORES DE GLUTAMATO	76
MARCADORES DE INFLAMACIÓN Y γ -ENOLASA	77
EFECTO DE LA ISQUEMIA REPERFUSIÓN (I/R).....	80
SUBUNIDADES DEL RECEPTOR DE NMDA	80
SUBUNIDADES DEL RECEPTOR DE AMPA Y ADAR2	82

TRANSPORTADORES DE GLUTAMATO.....	84
MARCADORES DE INFLAMACIÓN Y NEURONALES.....	84
EFFECTO DEL TRATAMIENTO ANTIINFLAMATORIO.....	90
DISCUSIÓN.....	97
EFFECTO DE LA EDAD.....	97
RECEPTOR DE NMDA.....	97
RECEPTOR DE AMPA Y ADAR2.....	98
TRANSPORTADORES DE GLUTAMATO.....	100
EFFECTO DE LA I/R EN LOS DOS GRUPOS DE EDAD.....	101
RECEPTOR DE NMDA.....	101
RECEPTOR DE AMPA Y ADAR2.....	103
TRANSPORTADORES DE GLUTAMATO.....	106
γ -ENOLASA.....	109
RESPUESTA INFLAMATORIA.....	110
EFFECTO DEL TRATAMIENTO ANTIINFLAMATORIO.....	112
CONCLUSIONES.....	116
BIBLIOGRAFÍA.....	120

ABREVIATURAS

- **5TH:** 5-hidroxitriptamina; 5-hydroxytryptamine
- **ADAR2:** Adenosina desaminasa 2 dependiente de ARN; RNA-dependent adenosine deaminase 2
- **ADN:** Ácido desoxirribonucleico; Deoxyribonucleic acid
- **ADNc:** ADN complementario; complementary DNA
- **AMPc:** Adenosín monofosfato cíclico; Cyclic adenosine monophosphate
- **AMPA:** Ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol-propiónico; α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid
- **AMPAR:** Receptores de AMPA; AMPA receptors
- **ARN:** Ácido ribonucleico; Ribonucleic acid
- **ARNm:** ARN mensajero; messenger RNA
- **ATP:** Adenosina trifosfato; Adenosine triphosphate
- **CA1:** Región del hipocampo *Cornu Ammonis 1*; *Cornu Ammonis 1* hippocampal region
- **CA3:** Región del hipocampo *Cornu Ammonis 3*; *Cornu Ammonis 3* hippocampal region
- **CC:** Corteza cerebral; Cerebral cortex
- **CCDV:** Canales de calcio dependientes de voltaje; Voltaje dependent calcium channels
- **Ct:** Ciclo umbral; cycle threshold
- **COX-2:** Ciclooxygenasa 2; Cyclooxygenase 2
- **DAB:** 3,3'-Diaminobenzidina; 3,3'-Diaminobenzidine

- **EAAC1:** Portador de aminoácidos excitatorios 1; Excitatory Aminoacid Carrier 1
- **EAATs:** Transportadores de aminoácidos excitatorios; Excitatory aminoacid transporters
- **FSC:** Flujo sanguíneo cerebral; Cerebral blood flow
- **GABA:** Ácido γ -aminobutírico; γ -aminobutyric acid
- **GAPDH:** Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa; Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
- **GD:** Giro dentado; Dentate gyrus
- **GFAP:** Proteína acídica fibrilar glial; Glial fibrillary acidic protein
- **GLAST:** Transportador de glutamato/aspartato; Glutamate/aspartate transporter
- **GLT-1:** Transportador de glutamato-1; Glutamate transporter-1
- **GluR:** Receptor de glutamato; Glutamate Receptor
- **HRP:** Peroxidasa de rábano picante; Horse radish peroxidase
- **IL:** Interleucina; Interleukin
- **iNOS:** Óxido nítrico sintasa inducible; Inducible nitric oxide synthase
- **I/R:** Isquemia/Reperfusión; Ischemia/Reperfusion
- **Mac-1 (CD11b/CD18):** Molécula de adhesión de macrófagos 1; Macrophage adhesion molecule-1
- **NMDA:** N-metil-D-aspartato; N-methyl-D-aspartate
- **NMDARs:** Receptores de NMDA, NMDA receptors
- **PBS:** Tampón fosfato salino; Phosphate buffered saline
- **PCR:** Reacción en cadena de la polimerasa; Polymerase chain reaction
- **ROS:** Especies reactivas del oxígeno; Reactive oxygen species

- **SDS-PAGE:** Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico; Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
- **SEM:** Error estándar de la media; Standard error of the mean
- **SNC:** Sistema nervioso central; Central nervous system
- **TBS:** Tampón tris salino; Tris buffered saline
- **TBS-T:** Tampón tris salino con Tween 20; Tris buffered saline containing Tween 20
- **TGF- β :** Factor de crecimiento transformante beta; Transforming growth factor beta
- **TNF- α :** Factor de necrosis tumoral alfa; Tumor necrosis factor alpha
- **VO:** Oclusión vascular; Vessel occlusion

RESUMEN

RESUMEN

En los países industrializados, los accidentes cerebrovasculares (ictus) son la segunda causa de muerte e invalidez y su prevalencia aumenta con la edad. A pesar de ello, la mayoría de los estudios experimentales se realizan en individuos jóvenes por lo que son necesarios más estudios para comprender como la edad modula la respuesta al ictus. La isquemia producida por el accidente cerebrovascular es seguida de un proceso de reperfusión al restablecerse el flujo sanguíneo durante la cual se ponen en marcha mecanismos que contribuyen al daño cerebral. Aparte de la prevención, los principales mecanismos susceptibles de ser usados como dianas terapéuticas son las moléculas implicadas en la excitotoxicidad y la respuesta inflamatoria provocadas por la isquemia-reperfusión. La excitotoxicidad está relacionada principalmente con la sobreactivación de los receptores glutamatérgicos, pero afecta a todo el sistema glutamatérgico, incluyendo a los transportadores de aminoácidos excitatorios (EAATs).

El objetivo de este estudio es analizar el papel de la edad en la respuesta a la isquemia cerebral, para lo que se utilizaron ratas *Sprague-Dawley* de 3 y 18 meses de edad en un modelo de isquemia global seguido de 48 horas de reperfusión, analizándose adicionalmente el efecto producido por el agente antiinflamatorio meloxicam. Para tener una medida de la actividad transcripcional y de la expresión de algunos de los genes implicados en la isquemia cerebral, se realizaron ensayos de PCR en tiempo real y de Western blot. También se realizaron estudios de inmunohistoquímica para observar la muerte neuronal retrasada y la respuesta inflamatoria.

Tras el proceso de isquemia-reperfusión se observó un descenso muy significativo en la expresión de las subunidades NR1, NR2A y NR2B del receptor glutamatérgico de NMDA en los animales de 3 meses y ese descenso se atenuó, o incluso se bloqueó, en los animales de 18 meses. El mismo efecto se observó para las subunidades GluR1 y GluR2 del receptor glutamatérgico de AMPA. Por el contrario, la edad no atenuó la transcripción de la enzima ADAR2, responsable de la edición Q/R de la subunidad GluR2. Sin embargo, los EAATs presentaron respuestas transcripcionales diferentes en función de su localización neuronal o glial. En este sentido, el transportador glial GLAST mostró un incremento de su transcripción correlacionado con el aumento de la gliosis, mientras que el descenso de la transcripción del transportador neuronal EAAC1 estuvo en concordancia con la muerte neuronal retrasada. La transcripción del transportador GLT-1, que se expresa tanto en neuronas como en células gliales, descendió de un modo similar al observado para EAAC1. La respuesta inflamatoria también se atenuó en los animales de 18 meses. El tratamiento con meloxicam dio lugar a una atenuación o bloqueo de la respuesta transcripcional a la isquemia en todos los genes estudiados, pero, curiosamente, se observó una menor supervivencia de los animales sometidos al daño isquémico.

En este trabajo se concluye que la “parada transcripcional” de varios genes del sistema glutamatérgico actúa como un mecanismo protector frente al daño excitotóxico inducido por la isquemia-reperfusión. Este mecanismo sufre una atenuación dependiente de la edad que podría explicar la mayor mortalidad inducida por la isquemia, lo que se pone muy claramente de manifiesto en los animales 18 meses sometidos al tratamiento con meloxicam. La respuesta a la

isquemia del transportador GLT-1 parece ser más dependiente de cambios neuronales que gliales, a pesar del incremento de la gliosis. Las diferencias en los niveles de expresión y/o transcripción de algunos de los genes estudiados podrían explicar parcialmente la vulnerabilidad diferencial observada entre el hipocampo y la corteza cerebral, pero no explicarían la vulnerabilidad diferencial de las distintas áreas hipocampales. Nuestros datos apoyan la hipótesis de que existen cambios en la permeabilidad al calcio como respuesta a la isquemia-reperfusión, aunque estos cambios tampoco explican completamente la vulnerabilidad diferencial asociada a la edad o las diferentes áreas encefálicas.

SUMMARY

Stroke is the second cause of death and disability in industrialized countries and its prevalence increases with age. Despite these facts, most experimental studies are conducted in young animals and further studies on the age effect are needed to find out how age modulates the response to stroke. Stroke leads to ischemia in the area affected, which is followed by reperfusion when blood flow recovers, and some of the responses elicited during this process also contribute to the cerebral damage. Apart from prevention, the main mechanisms that can be used as therapeutic targets to palliate the effects of stroke are the excitotoxicity and the inflammatory response elicited by ischemia-reperfusion. Excitotoxicity is mainly related to the glutamatergic receptor overactivation but the whole glutamatergic system is involved, the membrane transporters playing an important role in the response to ischemia.

A global ischemia model followed by a 48 hour reperfusion was used to carry out this study. Assays were conducted in both 3-month-old and 18-month-old Sprague Dawley rats. Additional assays were performed by treating animals with the anti-inflammatory agent meloxicam following the ischemic damage. Assays of real time PCR and Western blot were carried out for measuring the gene transcriptional activity and their expression respectively. Immunohistochemical assays were also performed to see delayed neuronal death and the inflammatory response.

NMDA glutamatergic receptor, NR1, NR2A and NR2B subunit expression strongly decreased following the ischemia-reperfusion in young animals and the decrease was attenuated or even blocked in aged animals. The same effect

was observed in AMPA glutamatergic receptor, GluR1 and GluR2 subunits. In contrast, no age-dependent attenuation in the transcriptional activity was found for the enzyme ADAR2, which is responsible for the Q/R GluR2 edition. In contrast, glutamatergic transporters presented different transcriptional responses related to their neuronal or glial character. The glial transporter GLAST increased in agreement with the increase in the gliosis while the neuronal transporter EAAC1 decreased consistently with the delayed neuronal death. GLT-1, a transporter expressed in both glial and neuronal cells, decreased in a similar way to EAAC1. The inflammation elicited by ischemia reperfusion was also attenuated in aged animals. The treatment with meloxicam resulted in an attenuated or blocked response to ischemia-reperfusion in all the genes studied and, interestingly, led to a decrease in the survival of the injured animals.

We conclude that a "transcriptional arrest" in a number of glutamatergic system genes acts as a protective mechanism against the excitotoxicity induced by ischemia-reperfusion. The age-dependent attenuation of this "transcriptional arrest" might account for the age-increased ischemia-induced mortality evidenced in animals treated with meloxicam. The response of the transporter GLT-1 seems to be dependent on neuronal rather than glial changes in spite of the gliosis increase. Differences in the expression levels or transcriptional levels of some genes studied may partially account for the different vulnerability between cerebral cortex and hippocampus, but fail to explain the differential vulnerability in the hippocampal areas. Our data give additional support to the hypothesis of changes in the Ca^{2+} permeability in response to ischemia-

reperfusion, although it does not completely explain differences in the age-dependent and area-dependent vulnerability.

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

ACCIDENTE CEREBROVASCULAR

El accidente cerebrovascular, también conocido como ictus, es un episodio agudo caracterizado por la disminución brusca del aporte sanguíneo a un área del cerebro que da lugar a una pérdida de la función neurológica (Donnan et al., 2008). El ictus es una de las amenazas más graves para la salud. Sucede con mayor frecuencia en personas mayores con factores de riesgo y la afectación de áreas específicas del cerebro puede generar hemiplejía, parálisis facial o afasia entre otras. Aún no existe un tratamiento efectivo para esta enfermedad y los procedimientos terapéuticos que se han realizado hasta ahora utilizando drogas neuroprotectoras para el tratamiento del accidente cerebrovascular agudo no son muy satisfactorios (Fisher y Bastan 2008; Gorelick 2002).

Epidemiología

En las sociedades industrializadas, como consecuencia de la mayor esperanza de vida, ha aumentado la incidencia de accidentes cerebrovasculares hasta convertirse en la causa directa de muerte del 10% de la población general. Otro 10% de fallecimientos se ha vinculado a secuelas y complicaciones posteriores al infarto cerebral (Pujadas et al., 2005). La Organización Mundial de la Salud estima el promedio mundial de incidencia del accidente cerebrovascular en 200 casos nuevos por cada 100.000 habitantes y una prevalencia de 500-800 casos por cada 100.000 habitantes al año (Balmaseda et al., 2003; Bonita 1992). Sin embargo, existen marcadas

diferencias entre países. Los del norte de Europa presentan incidencias más elevadas (por ejemplo, Finlandia, con 270 casos nuevos por cada 100.000 habitantes/año) que los países del sur de Europa (por ejemplo, Italia o Portugal, con 100 casos nuevos por cada 100.000 habitantes/año). En España, el accidente cerebrovascular constituye la primera causa de muerte en las mujeres y la segunda en los varones, por detrás del infarto de miocardio (Balmaseda et al., 2003; INE, 2008), y supone un coste sanitario importante (Hervas-Angulo et al., 2006), ya que más de la mitad de los pacientes con accidente cerebrovascular quedan discapacitados o fallecen (Prieto-Arribas et al., 2008). Además, constituye la causa más importante de invalidez permanente por las secuelas que deja en los supervivientes (Gil de Castro y Gil-Nunez 2000). La incidencia global de ictus en España se estima que puede oscilar entre 120-350 casos por 100.000 habitantes/año, pero las tasas se multiplican por 10 en la población mayor de 75 años de edad. Además, entre un 5 y un 11% de la población mayor de 65 años refiere antecedentes clínicos de ictus (Diaz-Guzman et al., 2008).

Etiología

Las causas del accidente cerebrovascular pueden ser muy diversas, pero las más frecuentes son el estrechamiento gradual (ateroesclerosis), la oclusión súbita (trombosis), la microembolia en vasos de pequeño calibre o la hipertensión intracraneal (Hossmann 1982). En muchos casos, la causa es la formación de trombos sobre lesiones arterioscleróticas preexistentes (aterotrombosis) en las grandes arterias cervicales o intracraneales. Otras

causas pueden ser arteritis, disección arterial, y diversos trastornos genéticos y hematológicos (Hossmann 1994).

Se consideran dos tipos de accidentes cerebrovasculares, de tipo isquémico (85%) o de tipo hemorrágico (15%). El ictus de tipo isquémico se produce al obstruirse alguna de las arterias que proporcionan sangre al cerebro, lo que reduce o interrumpe el flujo de sangre a una parte del mismo. Cuando la isquemia cerebral da lugar a una pérdida celular irreversible con lesión destructiva localizada, se denomina infarto cerebral (García 1984). Las causas más comunes en este tipo de accidentes son la formación de coágulos de sangre en alguna de las arterias que irrigan el cerebro, la estenosis arterial o el embolismo (ya sea sólido, líquido o gaseoso). El segundo tipo de accidente cerebrovascular es hemorrágico, también se denomina apoplejía, y está originado por la rotura de un vaso sanguíneo encefálico. Las hemorragias subaracnoideas se producen cuando es afectada una de las grandes arterias que irrigan el cerebro y constituyen el 5% de todos los accidentes cerebrovasculares. Cuando la hemorragia se produce en el parénquima nervioso se denomina hemorragia intracerebral. Las causas más frecuentes de hemorragia cerebral son la hipertensión arterial y los aneurismas cerebrales (Donnan et al., 2008; Wolf et al., 1992).

Factores de riesgo

Hay diversos factores de riesgo que aumentan las probabilidades de sufrir un ictus, aunque en muchos casos se puede evitar mediante la atención médica y cambios sencillos en el estilo de vida. De este modo, los factores de riesgo se clasifican en controlables (aquellos que pueden ser mantenidos bajo

control mediante dieta, supervisión médica, ejercicio, medicación, etc.) e incontrolables (aquellos que no se pueden evitar). Entre los factores de riesgo controlables se encuentran la hipertensión arterial (por encima de 140/90 mm Hg), cardiopatías de alto riesgo de embolia, aterosclerosis, diabetes mellitus, accidente isquémico transitorio, tabaquismo, alcoholismo o sedentarismo. Los factores de riesgo incontrolables son la edad, el sexo (mayor prevalencia en hombres, aunque la mortalidad sea más alta en mujeres), factores genéticos (antecedentes familiares), raza, geografía o clima (Láinez y Santoja 1999; Gil de Castro y Gil-Nunez 2000).

ENVEJECIMIENTO Y ACCIDENTE CEREBROVASCULAR

El envejecimiento se asocia con un declive de los sistemas locomotor, sensorial y cognitivo (Clayton et al., 2002; Grady y Craik 2000; Mesches et al., 2004; Navarro et al., 2005) que conlleva cambios morfológicos, neuroquímicos y conductuales significativos (He et al., 2005; He et al., 2006; Sutherland et al., 1996). La edad es uno de los principales factores de riesgo en el accidente cerebrovascular (Ay et al., 2005; Baltan et al., 2008; Barnett 2002; Broderick 2004; Schaller 2007; Seshadri et al., 2006), ya que aumenta su prevalencia (Barnett 2002; Muntner et al., 2002; Sutherland et al., 1996; Suzuki et al., 2003; Vellai 2009) y hace del ictus una de las principales causas de muerte e invalidez en ancianos (Davis et al., 1995; Suzuki et al., 2003; Taoufik y Probert 2008). Las estrategias neuroprotectoras que han tenido éxito en los modelos animales, no han dado buenos resultados clínicos en ancianos (Petcu et al., 2008). Se ha señalado que una posible explicación sobre la discrepancia entre los estudios experimentales y los ensayos clínicos puede ser el papel que

juega la edad en la recuperación tisular tras un episodio isquémico, ya que con la edad se incrementa la transformación del tejido isquémico a tejido infartado (Ay et al., 2005). La mayoría de los estudios se realizan en individuos jóvenes (Davis et al., 1995) los cuales no proporcionan un buen modelo de los efectos del ictus en el tejido neural de los individuos de edad avanzada (Brown et al., 2003; Markus et al., 2005; Popa-Wagner et al., 1998; Wang et al., 1995), ya que procedimientos equivalentes en la inducción de isquemia producen menos daño en los adultos jóvenes que en los adultos de edad avanzada (Ay et al., 2005). Por este motivo, las diferencias relacionadas con la edad en la patofisiología de la isquemia cerebral deben de ser tenidas en cuenta en el tratamiento de la misma (Baltan et al., 2008).

ISQUEMIA CEREBRAL

En todos los accidentes cerebrovasculares se produce la denominada isquemia cerebral, que se define como la reducción del flujo cerebral sanguíneo (FSC) desde niveles fisiológicos (50-55 ml/min/100 g de tejido) hasta niveles que son insuficientes para mantener en condiciones normales el metabolismo y funcionamiento de las células cerebrales. Cuando el descenso impide totalmente el aporte sanguíneo al cerebro, por ejemplo, como consecuencia de una parada cardiaca, se define como isquemia cerebral global. Cuando la reducción del flujo sanguíneo se produce en un área cerebral limitada, irrigada por una determinada arteria cerebral, se define como isquemia cerebral focal (Brouns y De Deyn 2009). En la isquemia cerebral focal se produce una zona hipoperfundida que queda dañada rápida e irreversiblemente (núcleo isquémico), en la que el FSC disminuye a 10 ml/min/100 g de tejido, y una zona

circundante, denominada zona de penumbra isquémica, en la que el daño neuronal es en muchos casos reversible ya que, a pesar de la reducción del FSC (10-25 ml/min/100 g de tejido), éste aún es suficiente para el mantenimiento funcional de las neuronas (Baron 1999; Dirnagl et al., 1999; Lipton 1999; Markus et al., 2004; Nagesh et al., 1998; Obrenovitch 1995; Read et al., 1998).

LA CASCADA ISQUÉMICA

Con el término cascada isquémica se incluyen una serie de procesos neuroquímicos desencadenados por la isquemia cerebral entre los que pueden destacarse el fallo bioenergético, seguido de la excitotoxicidad, el estrés oxidativo, la disfunción de la barrera cefalorraquídea, la inflamación post-isquémica y la muerte celular de neuronas, glia y células endoteliales (revisado por Brouns y De Deyn 2009). A continuación se explicará en detalle esta cascada multifactorial en la que cualquier proceso de la misma puede ser causa o consecuencia de cualquiera de los otros procesos de la cascada.

La isquemia cerebral se inicia con un descenso o pérdida repentina del riego sanguíneo en un área del cerebro, provocando una disfunción neurológica de la misma (Donnan et al., 2008). Tras el restablecimiento del riego sanguíneo (reperfusión), el daño cerebral continúa durante horas, o incluso días, debido a la aparición de alteraciones bioquímicas y fisiopatológicas importantes que dependen en gran medida de la intensidad y de la duración del daño producido. Además, aunque la restauración del riego sanguíneo en el tejido isquémico es crítica para que éste pueda seguir

funcionando, paradójicamente se produce un daño secundario debido a esta reperusión (Brouns y De Deyn 2009).

El fallo bioenergético

El tejido cerebral requiere altos niveles de oxígeno y glucosa para su correcto funcionamiento, los cuales se ven reducidos durante el episodio isquémico afectando al sistema de producción de energía de la célula (Brouns y De Deyn 2009). Tras el inicio de la isquemia, los sistemas de transporte activo (bombas de calcio, sodio y potasio) continúan funcionando durante un tiempo, lo que permite mantener la concentración de calcio libre intracelular en niveles fisiológicos (100 nM) (Banasiak et al., 2000; Brini y Carafoli 2000), así como el potencial eléctrico y los gradientes iónicos (Banasiak et al., 2000; Dirnagl et al., 1999). Esto conduce a una disminución de las reservas de energía intracelular, con un rápido descenso de los niveles del ATP almacenado (Lee et al., 1999; Lipton 1999; Sweeney 1997; White et al., 2000). Cuando los sistemas de transporte activo dejan de funcionar se produce una entrada masiva de Ca^{2+} al espacio intracelular y la pérdida del gradiente iónico que llevan a la despolarización de neuronas y glia (Katsura et al., 1994; Martin et al., 1994). Esta despolarización activa los canales de calcio dependientes de voltaje (CCDV) y provoca la liberación de aminoácidos excitatorios, como el glutamato, en el espacio extracelular. Dado que la recaptación presináptica de estos aminoácidos excitatorios es un proceso dependiente de energía (Nicholls y Attwell 1990), el glutamato se acumula en el espacio extracelular tanto por el aumento en la liberación como por la falta de recaptación (Brouns y De Deyn 2009).

La falta de oxígeno producida durante el episodio isquémico lleva a una acidificación intracelular con niveles de pH de 6,4-6,7, debido a la acumulación de lactato producido en la glucólisis anaerobia (Brouns et al., 2008; Kagansky et al., 2001; Nicoli et al., 2003; Schneeweis et al., 2001). Los niveles de lactato elevados aumentan el daño celular (Brouns et al., 2008; Dohmen et al., 2007; Uyttenboogaart et al., 2007).

Excitotoxicidad

Como consecuencia de la isquemia se produce muerte por necrosis, una forma de muerte celular asociada con el daño de la membrana plasmática y con edema citotóxico. El proceso de necrosis se produce en un intervalo de tiempo muy corto, de minutos (Back 1998). Las células al morir vierten en el espacio extracelular aminoácidos excitatorios, especialmente glutamato. Esto produce la sobreactivación de los receptores glutamatérgicos de AMPA (Ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol-propiónico), kainato y NMDA (N-metil-D-aspartato), con la consecuente entrada de iones Na^+ , Cl^- y Ca^{2+} a través de los canales de estos receptores provocando el daño o muerte celular, que a su vez da lugar a la liberación de más aminoácidos excitatorios extendiendo el daño a otras neuronas. Este fenómeno se conoce como excitotoxicidad (Chen et al., 2008; Dirnagl et al., 1999; Meldrum et al., 1985; Meldrum 2000; Mongin 2007) y amplifica el proceso iniciado por la isquemia. El aumento en los niveles de Ca^{2+} dentro de la célula inicia una serie de procesos citoplásmicos y nucleares, entre los que cabe destacar la generación de radicales libres y la activación de enzimas dependientes de calcio (enzimas proteolíticas, fosfolipasas, calpaínas, endonucleasas, ATPasas, ciclooxigenasas y óxido nítrico sintasas). Esto

El estrés oxidativo

Durante la isquemia cerebral se producen más radicales libres de los que la capacidad antioxidante de la célula es capaz de neutralizar, dando lugar al denominado estrés oxidativo. Estas especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno participan como mediadores del daño tisular en el proceso isquémico agudo (Brouns y De Deyn 2009), ya que inactivan enzimas, liberan iones calcio desde los compartimentos intracelulares, desnaturalizan proteínas o participan en la peroxidación lipídica, las lesiones del citoesqueleto, el daño del ADN y de la función mitocondrial. El estrés oxidativo grave es el responsable de la muerte celular por necrosis, mientras que la oxidación moderada desencadena la apoptosis (Evans y Cooke 2004; Liu et al., 1996), un tipo de muerte celular que se encuentra regulado genéticamente (Choi 1996; Johnson y Deckwerth 1993; Martin et al., 1998; Namura et al., 1998). El predominio de un tipo u otro de muerte celular viene determinado por diversos factores, como el grado de isquemia, la madurez celular, la concentración de Ca^{2+} libre intracelular y el microambiente celular (Choi 1995; Lee et al., 1999; Leist y Nicotera 1998). En general las células localizadas en el núcleo isquémico morirán por necrosis, una parte de las células de la zona de penumbra podrán recuperarse (Back 1998) y otras morirán por procesos apoptóticos que pueden ocurrir incluso varios días después de la isquemia (Banasiak et al., 2000; Dirnagl et al., 1999; Lipton 1999). Se ha denominado muerte neuronal retrasada a la muerte producida varios días después de la isquemia global o focal (Hata et al., 2000; Kerr et al., 1972), y se ha descrito en ciertas regiones consideradas vulnerables como el área CA1 (*Cornu Ammonis 1*) del hipocampo (Davolio y Greenamyre 1995; Kirino 1982; Kowalczyk et al., 2009; Yang et al., 2000). La susceptibilidad

del tejido cerebral al estrés oxidativo es muy alta debido a la presencia en las neuronas de altos niveles de ácidos grasos poliinsaturados, su elevado metabolismo oxidativo y sus bajos niveles de defensas antioxidantes (Coyle y Puttfarcken 1993), lo que dificulta su supervivencia (Chan 2001; Lewen et al., 2000; Nita et al., 2001).

Además del daño celular directo, el estrés oxidativo incrementa la permeabilidad de la barrera hematoencefálica y modifica el flujo sanguíneo debido al efecto de los radicales libres en la vasoconstricción y el incremento de la formación de agregados de plaquetas (Brouns y De Deyn 2009).

Disfunción de la barrera hematoencefálica

El microambiente neuronal está protegido por la integridad de la barrera hematoencefálica. La rotura de la barrera hematoencefálica permite la difusión de los componentes de la sangre al espacio intercelular del parénquima cerebral. La extravasación de moléculas de alto peso molecular provoca la entrada de agua al espacio intercelular por ósmosis, lo que deriva en un edema que aumenta la presión intracraneal (Brouns y De Deyn 2009). Además, la pérdida de la barrera hematoencefálica facilita la migración de células inflamatorias que promueven la respuesta inflamatoria post-isquémica (del Zoppo y Hallenbeck 2000).

Inflamación post-isquémica

La inflamación juega un papel muy importante en la patogénesis de la isquemia cerebral, y varios autores han relacionado la progresión retrasada del daño inducido por la isquemia cerebral con un efecto inflamatorio post-isquémico (Amantea et al., 2009; Barone y Feuerstein 1999; Chamorro y

Hallenbeck 2006; Feuerstein et al., 1997; Rodriguez-Yanez y Castillo 2008). En la inflamación post-isquémica participan varios tipos celulares como las células endoteliales, los astrocitos, las células microgliales y los leucocitos (granulocitos, macrófagos y linfocitos). Las especies reactivas del oxígeno activan a las células microgliales y a los astrocitos, lo cual inicia la reacción inflamatoria mediante la expresión de citoquinas (IL-1, IL-6, IL-10 TNF- α , TGF- β y quimioquinas), moléculas de adhesión (selectinas, integrinas e inmunoglobulinas), eicosanoides, óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) y otros mediadores inflamatorios, que contribuyen al daño neuronal (Brouns y De Deyn 2009; Iadecola y Alexander 2001; Wang et al., 2007). Las células microgliales (macrófagos residentes del sistema nervioso central) al activarse se transforman en fagocitos, los cuales parecen jugar un papel fundamental en el proceso isquémico ya que son reclutados a las zonas de muerte celular (Abraham y Lazar 2000; Bendel et al., 2005b), donde liberan varias sustancias, tanto citotóxicas como neuroprotectoras (Brouns y De Deyn 2009). El inicio de la respuesta inflamatoria, como consecuencia de la activación microglial por medio de aminoácidos excitatorios como el glutamato y la migración de leucocitos, da lugar a un incremento del FSC regional promoviendo daños en astrocitos y oligodendrocitos (Alvarez-Diaz et al., 2007). La activación microglial se asocia con la expresión de una β -integrina de membrana (CD11b o Mac-1) cuya expresión aumenta considerablemente tras un proceso de isquemia (Pforte et al., 2005), por lo que ha sido ampliamente utilizada como marcador de inflamación (Kim y de Vellis 2005; Yatsiv et al., 2005). Además, los anticuerpos frente a esta proteína parecen tener un papel neuroprotector tras la isquemia cerebral (Chopp et al., 1994).

La cascada inflamatoria que sigue a la isquemia también incluye un aumento en la expresión de varias enzimas como la fosfolipasa A2 (Muralikrishna Adibhatla y Hatcher 2006), la cual hidroliza glicerofosfolípidos liberando ácido araquidónico. El ácido araquidónico se metaboliza a prostaglandinas o leucotrienos por la acción de las enzimas ciclooxigenasa 2 (COX-2) y lipoxigenasa, respectivamente (Brouns y De Deyn 2009). La expresión de COX-2 aumenta tras la isquemia y la consiguiente generación de prostaglandinas e, incluso, de ROS tiene efectos tóxicos (Kawano et al., 2006; Manabe et al., 2004; Nogawa et al., 1997). Por otro lado, los leucotrienos generados por la acción de la lipoxigenasa están implicados en la disfunción de la barrera hematoencefálica, el edema y la muerte neuronal (Brouns y De Deyn 2009; Tomimoto et al., 2002).

El tratamiento antiinflamatorio

Los procesos inflamatorios pueden contribuir al daño cerebral inducido por la isquemia (Kriz 2006; Taoufik y Probert 2008) y, en ese aspecto, se ha descrito que el uso de antiinflamatorios reduce este daño (Antezana et al., 2003; Cole et al., 1993; Mehta et al., 2007). Sin embargo, el papel de la inflamación en la isquemia cerebral es controvertido. De hecho, las células activadas como consecuencia del daño isquémico liberan gran variedad de sustancias, muchas de las cuales son citotóxicas y/o citoprotectoras (Brouns y De Deyn 2009), con lo que el uso de antiinflamatorios en el tratamiento de la isquemia cerebral debería de analizarse cuidadosamente.

La COX-2 es una de las enzimas que juegan un papel importante en la evolución del daño isquémico (Nogawa et al., 1997; Nogawa et al., 1998). Uno de los inhibidores de esta enzima más utilizados es el meloxicam [4-hidroxi-2-

metil-N-(5-metil-2-tiazolil)-2H-1,2-benzotiazina -3-carboxamida-1, 1-dioxida], un agente antiinflamatorio no esteroideo usado tanto en la clínica humana como en la clínica veterinaria. El meloxicam tiene una vida media en plasma de aproximadamente 20 horas y no se necesita ajustar la dosis en los individuos envejecidos. Es eliminado tras ser biotransformado a cuatro metabolitos farmacológicamente inactivos, que pueden ser excretados por orina y/o heces (Davies y Skjodt 1999; Gates et al., 2005).

Reperusión

La restauración del riego sanguíneo, o reperusión, puede reducir el tamaño de la zona infartada si se produce en un corto periodo de tiempo tras el episodio isquémico (Schaller y Graf 2004). Sin embargo, y paradójicamente, la reperusión puede incrementar el daño que sigue al proceso isquémico (del Zoppo et al., 1998; Kidwell et al., 2001; Kuroda y Siesjo 1997). En varios modelos animales de isquemia se ha señalado que los cambios morfológicos indicativos del daño neuronal irreversible ocurren durante el periodo de reperusión (Kirino 1982; Pulsinelli et al., 1982). Las alteraciones de la permeabilidad vascular durante este periodo parecen ser las causantes del daño por reperusión (Dietrich 1994). Los leucocitos juegan un papel fundamental en este proceso, ya que dañan el endotelio, obstruyen la microvascularización y participan en la rotura de la barrera hematoencefálica. Esto permite la infiltración leucocitaria en el tejido cerebral, donde los leucocitos liberan citoquinas extendiendo la inflamación (Pan et al., 2007). Las plaquetas también participan en este daño, ya que contribuyen a la liberación de mediadores bioquímicos del estrés oxidativo y la inflamación (Chong et al., 2001; Wong y Crack 2008; Zeller et al., 2005). Además, la rotura de la barrera

hematoencefálica y la hiperperfusión post-isquémica pueden ocasionar edema cerebral y hemorragia (Rosenberg et al., 2001).

EFFECTO DE LA EDAD EN LA ISQUEMIA CEREBRAL

Con la edad, aumenta la vulnerabilidad del tejido cerebral al daño producido por un episodio isquémico (Aliev et al., 2002; Sutherland et al., 1996), en concordancia con la mayor activación de las células gliales y de los mediadores del proceso inflamatorio en los animales más viejos (Floyd y Hensley 2000; Roberts et al., 1997; Streit et al., 2008). Con la edad también aumenta la expresión de los genes relacionados con el estrés celular y la inflamación, mientras que desciende la de aquellos relacionados con las sinapsis, los factores de crecimiento y el mantenimiento trófico (Lucin y Wyss-Coray 2009). Además, estudios realizados en ratas de edad avanzada muestran una aceleración de la apoptosis post-isquémica, que conlleva una mayor degeneración y pérdida neuronal en estos animales (Petcu et al., 2008), así como una mayor acumulación de los factores neurotóxicos que se liberan tras la isquemia cerebral (Popa-Wagner et al., 1998).

NEUROTRANSMISIÓN DE AMINOÁCIDOS EXCITATORIOS

La capacidad de excitar a las neuronas del sistema nervioso central (SNC) mediante aminoácidos excitatorios se demostró por primera vez en 1959 (Robbins 1959). Estudios posteriores identificaron al L-glutamato como el principal mediador de las respuestas excitatorias sinápticas rápidas en el SNC de los vertebrados (Collingridge y Lester 1989). *In vivo*, la concentración de L-glutamato en la hendidura sináptica es de aproximadamente 0,6 μM (Bouvier et al., 1992) en situación de reposo y alcanza valores por encima de 10 μM

durante la transmisión sináptica (1-2 milisegundos) (Clements et al., 1992). Durante ese tiempo, el glutamato actúa sobre receptores específicos, los receptores de glutamato (GluRs), y su efecto excitador desaparece cuando es eliminado de la hendidura sináptica mediante un sistema de transportadores de alta afinidad, los transportadores de aminoácidos excitatorios (EAATs), que se localizan en las membranas presinápticas y postsinápticas de las neuronas o en las membranas de las células gliales adyacentes (Danbolt 2001).

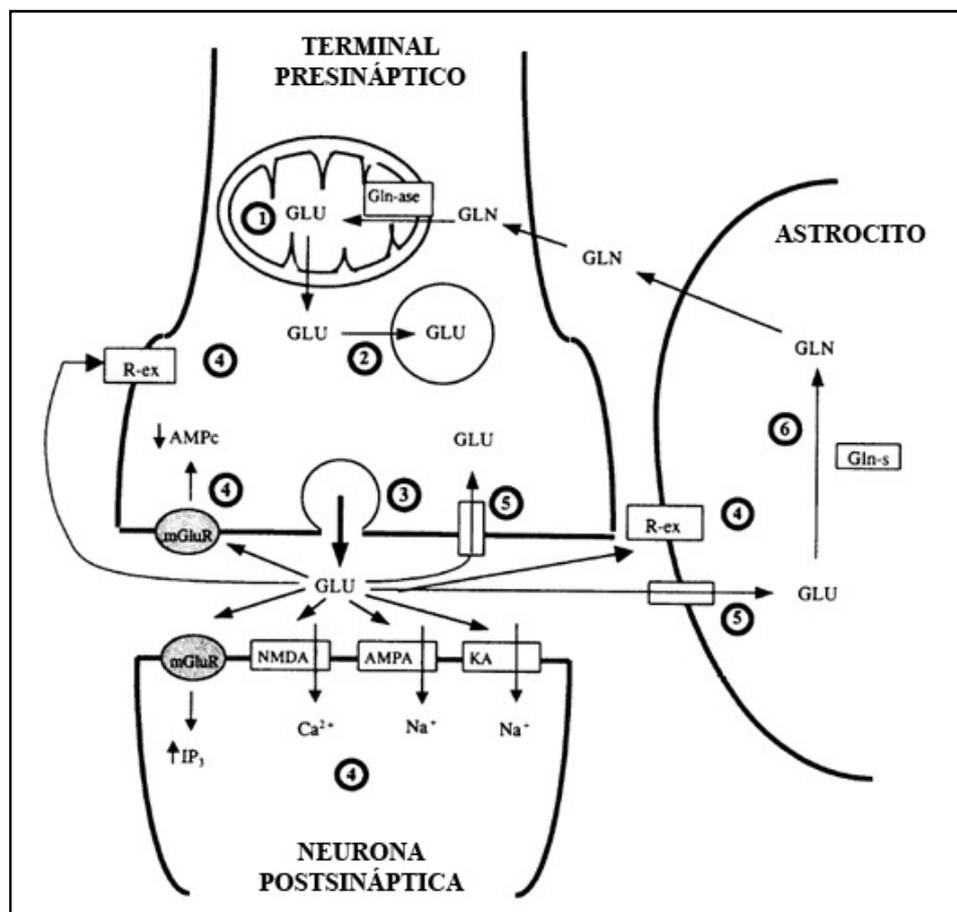


Figura 2: Neurotransmisión glutamatergica. El glutamato (GLU) (1) sintetizado en el terminal presináptico se almacena (2) en vesículas sinápticas hasta ser liberado (3) a la hendidura sináptica, donde activa los receptores glutamatergicos (4). La transmisión sináptica finaliza como consecuencia de la recaptación del glutamato por transportadores específicos (5) localizados en el terminal presináptico y en los astrocitos, donde el glutamato es transformado (6) de nuevo en glutamina. (Imagen modificada de Segovia et al., 2001).

RECEPTORES DE GLUTAMATO

Se reconocen dos grandes familias de receptores glutamatérgicos según la naturaleza de la respuesta: los que median respuestas sinápticas rápidas mediante la apertura de canales iónicos, conocidos como receptores ionotrópicos de glutamato (Watkins y Jane 2006), y los receptores metabotrópicos de glutamato, que se asocian a la formación enzimática de segundos mensajeros que activan cascadas metabólicas intracelulares (Ozawa et al., 1998; Schoepp et al., 1999).

Los receptores glutamatérgicos ionotrópicos son complejos heteroméricos relativamente grandes compuestos por cinco péptidos individuales (subunidades), cada una de los cuales tiene varios dominios de transmembrana. Las subunidades se agrupan formando un canal iónico en la membrana que es altamente impermeable a iones en ausencia del neurotransmisor (Zigmond et al., 1999). Su apertura se regula por la unión de ligandos específicos que provocan un cambio conformacional en el canal iónico permitiendo el paso de cationes específicos (Hollmann y Heinemann 1994; Nakanishi 1992). Tradicionalmente, se han subdividido en tres subtipos según su afinidad por los agonistas AMPA, kainato y NMDA (Figura 3). En mamíferos se han descrito 18 genes que codifican para las diferentes subunidades de los receptores ionotrópicos de glutamato (Dingledine et al., 1999), pero la diversidad molecular de estos receptores se ve incrementada por fenómenos como la maduración alternativa y la edición del ARN mensajero (ARNm) (Ozawa et al., 1998).

Los receptores metabotrópicos de glutamato están formados por un único polipéptido de siete dominios de transmembrana al que se unen a proteínas G

activando o inhibiendo enzimas que regulan la producción de mensajeros intracelulares. Estos receptores también son regulados por la unión de ligandos (Gudermann et al., 1995). Se subdividen en tres grupos, como se muestra en la Figura 3: Grupo I, en el que la activación de los receptores da lugar a la activación de la fosfolipasa C, la cual induce un incremento en la concentración del inositol trifosfato intracelular y la movilización del calcio; Grupo II, cuyos receptores controlan la liberación de neurotransmisores, incluyendo glutamato, ácido γ -aminobutírico (GABA) y 5-hidroxitriptamina (5HT); y Grupo III, cuyos receptores inhiben la actividad de la adenilato ciclasa, disminuyendo la concentración del adenosín monofosfato cíclico (AMPc) intracelular. El grupo I se ha asociado, generalmente a respuestas excitatorias sinápticas, mientras que los otros dos grupos se han asociado con depresión de la respuesta sináptica, inhibiendo la liberación de glutamato (Watkins y Jane 2006).

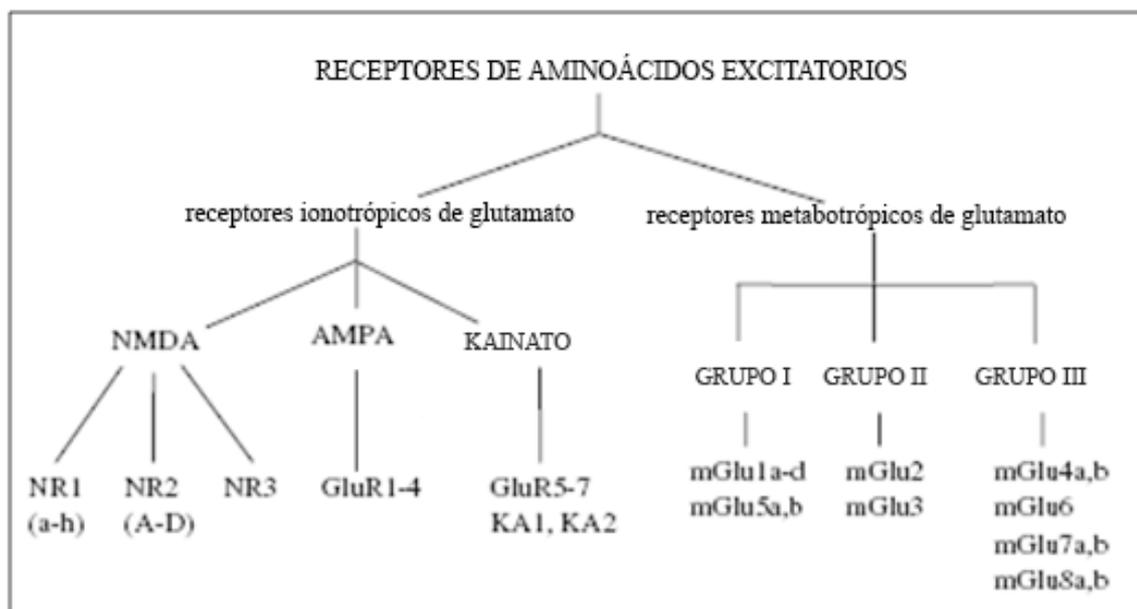


Figura 3: Clasificación de los receptores de aminoácidos excitatorios. Varias subunidades proteicas específicas se ensamblan para conformar los distintos tipos de receptores. (Imagen modificada de Watkins y Jane 2006).

Como se ha visto en los apartados anteriores, los receptores de glutamato están implicados en el inicio de la muerte neuronal debida a isquemia. A continuación, se revisarán en detalle los receptores ionotrópicos de NMDA y AMPA, que son los que se estudian en este trabajo.

Receptores de NMDA

Los receptores de NMDA (NMDARs) participan en una amplia variedad de procesos fisiológicos y patológicos (revisado por Slikker et al., 2007). Entre los procesos fisiológicos podemos destacar el papel de estos receptores en la transmisión sináptica excitatoria, el aprendizaje, la memoria (Ozawa et al., 1998), el desarrollo neuronal (D'Souza et al., 1993) o la plasticidad sináptica (Meldrum y Garthwaite 1990). Estos receptores están implicados en neuropatologías agudas como el ictus (Beal 1992a; Beal 1992b) y en neuropatologías crónicas como la enfermedad de Alzheimer (Cotman et al., 1989), la enfermedad de Parkinson, la enfermedad de Huntington y otras enfermedades mentales como la esquizofrenia (Greenamyre y Maragos 1993; Meldrum y Garthwaite 1990). Además, los receptores de NMDA juegan un papel importante en la adicción a las drogas o la percepción del dolor (Dubner 2004; Nestler et al., 2001; VanDongen 2009).

Los NMDARs poseen una alta permeabilidad al Ca^{2+} (MacDermott et al., 1986; Mayer y Westbrook 1987) y a iones monovalentes como el Na^+ y el K^+ (Ichinose et al., 2003), son bloqueados por Mg^{2+} extracelular en un proceso dependiente de voltaje (Mayer et al., 1984; Nowak et al., 1984; Wollmuth y Sobolevsky 2004), y presentan una cinética de activación/desactivación lenta (Lester et al., 1990). Cuando la célula se despolariza, se libera el Mg^{2+} que mantiene bloqueado al receptor (Hara y Snyder 2007), pero aún es necesaria la

presencia de glicina como co-agonista del glutamato, para que estos receptores puedan ser activados (Moriyoshi et al., 1991). Además, el comportamiento del receptor puede ser modificado por la presencia de otras moléculas en el espacio extracelular, como poliaminas y Zn^{2+} (Cull-Candy et al., 2001).

Estructura del receptor de NMDA

Los receptores de NMDA de mamíferos son heterotetrámeros formados por distintas subunidades que están codificadas por tres familias de genes: NR1 o *Grin1*, NR2 o *Grin2* y NR3 o *Grin3* (Das et al., 1998; Dingledine et al., 1999; Mori y Mishina 1995). Aunque pueden aparecer 8 variantes peptídicas distintas debido a maduración alternativa (Zukin y Bennett 1995), la familia NR1 deriva de un solo gen. La familia NR2 consta de 4 genes (designados A-D), mientras que sólo se han descrito dos genes (A y B) en la familia NR3 (VanDongen 2009). Algunas subunidades NR2 y NR3 también pueden sufrir maduración alternativa (Cull-Candy et al., 2001; Rafiki et al., 2000).

La presencia de la subunidad NR1 es esencial en los receptores de NMDA funcionales, ya que contiene el sitio de unión a glicina. Las distintas subunidades NR2, que contienen el sitio de unión a glutamato (Stephenson 2006), se ensamblan con la subunidad NR1. El predominio de una u otra subunidad NR2 depende de la edad y de la región donde se localiza el receptor (Monyer et al., 1994; VanDongen 2009). En este sentido, las subunidades NR2B y NR2D predominan en el encéfalo neonatal, pero son sustituidas por las subunidades NR2A y NR2C (en cerebelo) a lo largo del desarrollo (Akazawa et al., 1994). El ensamblaje también puede producirse con las subunidades NR3, aunque el papel de estas subunidades no está claro (Stephenson 2006). Se ha

señalado también que las subunidades NR1/NR3 forman un nuevo tipo de receptor que es excitado por glicina (Chatterton et al., 2002) pero que no presenta corriente inducida por el glutamato (Nishi et al., 2001).

Cada subunidad está formada por un dominio C-terminal intracelular, tres dominios de transmembrana, una región embebida en la membrana formando una estructura en horquilla entre los dominios 1 y 3, y un dominio N-terminal extracelular, que contiene dos secuencias (S1 y S2) que forman conjuntamente el sitio de unión al ligando (Villmann y Becker 2007).

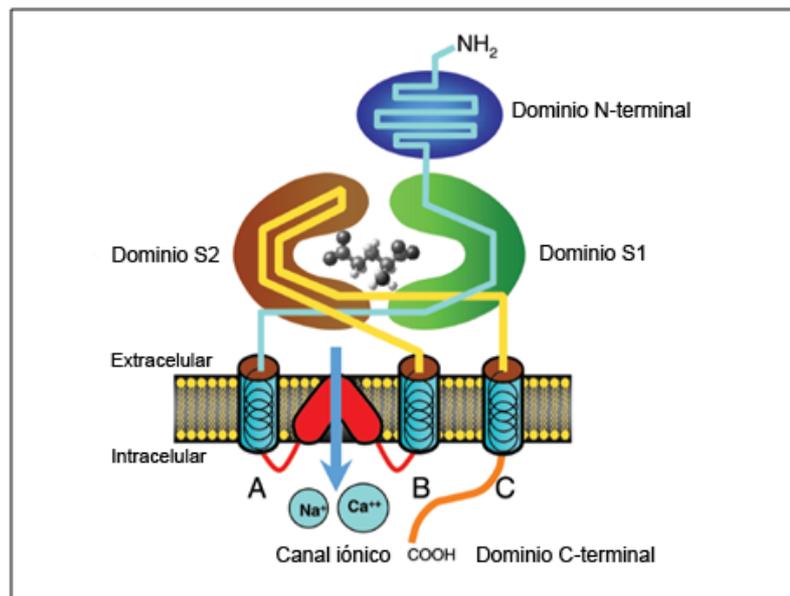


Figura 4: Estructura de las subunidades del receptor de NMDA. Ver explicación en el texto. (Imagen tomada de Villmann and Becker 2007).

Cada subunidad cumple funciones específicas (Al-Hallaq et al., 2007), de modo que la composición del receptor de NMDA determina sus propiedades electrofisiológicas y farmacológicas (Kutsuwada et al., 1992; McBain y Mayer 1994; Meguro et al., 1992; Monyer et al., 1992). Además, el receptor también se ve afectado por el grado de fosforilación de las subunidades (Chen y Roche 2007; Salter y Kalia 2004) así como por su interacción con proteínas intracelulares (Wenthold et al., 2003).

Receptores de AMPA

Los receptores de AMPA (AMPARs) se distribuyen ampliamente por todo el SNC, estando presentes tanto en neuronas como en células gliales (Belachew y Gallo 2004). Esta amplia distribución está relacionada con el importante papel de estos receptores implicados en la despolarización postsináptica y la transmisión sináptica excitatoria rápida. Además, participan en la formación, mantenimiento y plasticidad de las sinapsis, por lo que su disfunción está relacionada con diversos desórdenes neurológicos (Greger et al., 2007). Los AMPARs son canales permeables al Na^+ , aunque también presentan cierta permeabilidad a cationes divalentes como el Ca^{2+} o el Zn^{2+} (Ozawa et al., 1998).

Estructura del receptor de AMPA

Los AMPARs forman canales iónicos tetraméricos mediante el ensamblaje de cuatro subunidades, GluR1-4, en la membrana plasmática (Borges y Dingledine 1998; Greger et al., 2007; Rosenmund et al., 1998; Wu et al., 1996). Se cree que la estructura tetramérica está formada por dímeros de dímeros (Greger et al., 2007; Mayer 2006). A lo largo del encéfalo se han observado distintas isoformas (Martin et al., 1993; Monyer et al., 1991; Sans et al., 2003; Wenthold et al., 1996), siendo predominantes las subunidades GluR1 y GluR2 en hipocampo y corteza cerebral (Craig et al., 1993; Monyer et al., 1991; Sans et al., 2003). La composición del receptor le confiere propiedades funcionales específicas (Kwak y Weiss 2006) y dicha composición puede ser modificada en respuesta a ciertas señales (Greger et al., 2007).

Cada subunidad está formada un dominio N-terminal extracelular, que media la formación del dímero; un bucle extracelular, que está implicado en la formación del tetrámero; cuatro regiones hidrofóbicas, tres de las cuales atraviesan la membrana y la otra (TM2) se encuentra embebida en la misma con una estructura de horquilla que participa en la formación el poro del canal; y finalmente un extremo C-terminal intracelular, con el que interaccionan varias proteínas. El sitio de unión del ligando lo constituyen una secuencia (S1) del extremo N-terminal y otra secuencia (S2) del bucle extracelular (Ayalon et al., 2005; Jiang et al., 2006).

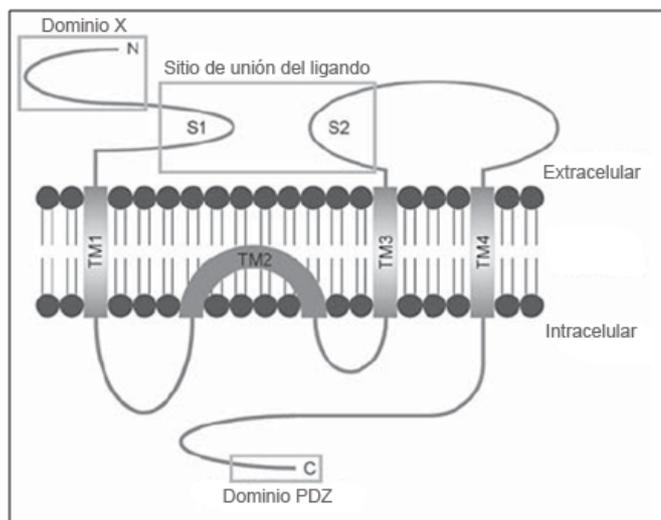


Figura 5: Estructura de las subunidades del receptor de AMPA. Véase explicación en el texto. (Imagen modificada de Jiang et al., 2006).

El ensamblaje del receptor tiene lugar en la membrana del retículo endoplasmático. La maduración del AMPAR así como su transporte intracelular y su función se encuentran sometidos a un control muy estricto (Chen et al., 2000; Ellgaard y Helenius 2003; Ziff 2007), lo que determina el número de canales en las sinapsis (Greger et al., 2007). Además, el receptor puede ser regulado por fosforilaciones, glicosilaciones y otras modificaciones post-traduccionales (revisado por Jiang et al., 2006).

Importancia de la subunidad GluR2

La subunidad GluR2 está presente en la mayoría de los AMPARs (Greger et al., 2002; Wenthold et al., 1996), aunque su expresión es menor que la de GluR1 durante el desarrollo postnatal temprano (Monyer et al., 1991). La importancia de la subunidad GluR2 radica en que su presencia o ausencia determina la permeabilidad al calcio del AMPAR. La primera evidencia en este sentido proviene de estudios electrofisiológicos con AMPARs recombinantes, de forma que los AMPARs que contenían alguna subunidad GluR2 formaban canales impermeables al calcio, mientras que aquellos que carecían de esta subunidad permitían la entrada de calcio (Hollmann et al., 1991; Verdoorn et al., 1991). Esta propiedad de la subunidad GluR2 se atribuye a la presencia de una carga positiva (generada por una arginina) en el poro formado por el dominio TM2 (Burnashev et al., 1992; Hume et al., 1991). Pero esta arginina (R) no se encuentra codificada genéticamente, sino que es debida a la edición post-transcripcional del ARNm (Burnashev et al., 1992). De este modo, el codón que codifica para el aminoácido neutro glutamina (Q) en el exón 11 del pre-ARNm, es editado por una adenosina desaminasa (ADAR2), que transforma la adenosina en inosina (Rueter et al., 1995). La inosina es identificada como una G durante la síntesis proteica, lo que finalmente origina el codón que codifica para la arginina (Greger et al., 2007; Higuchi et al., 1993; Tanaka et al., 2000). Esta edición del ARNm es específica de la subunidad GluR2 y es muy eficiente, ya que casi el 100% del encéfalo de rata adulta presenta esta subunidad GluR2 editada (Burnashev et al., 1992).

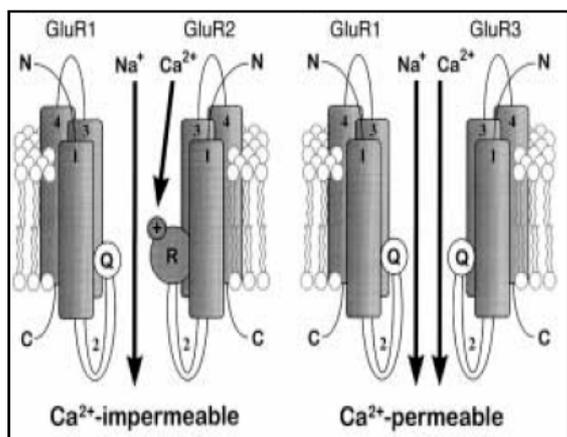


Figura 6: La permeabilidad al calcio de los receptores de AMPA es modificada por la presencia de la subunidad GluR2 en el receptor. La subunidad GluR2 hace al receptor impermeable al Ca^{2+} debido a la carga positiva que se genera en el poro del canal como consecuencia de la edición Q/R de GluR2. (Imagen de Pellegrini-Giampietro et al., 1997).

TRANSPORTADORES DE GLUTAMATO

Los transportadores de aminoácidos excitatorios (EAATs) son los encargados de recaptar el glutamato liberado en la sinapsis, eliminando su acción excitatoria y manteniendo su concentración extracelular por debajo de niveles neurotóxicos (Tzingounis y Wadiche 2007). Además de la recaptación de glutamato en células glutamatérgicas y gliales que se ha señalado en la Figura 2, los EAATs transportan el glutamato dentro de las células que necesitan este aminoácido como precursor del neurotransmisor GABA (Berger y Hediger 1998).

Características funcionales

Los EAATs tienen dos conformaciones, en una de ellas el sitio de unión del glutamato está expuesto al entorno extracelular y en la otra, el sitio de unión del glutamato es accesible desde el citoplasma. La interconversión entre estas dos conformaciones permite la acumulación intracelular de glutamato contra gradiente en un proceso que requiere ATP (Kanner y Schuldiner 1987; Tzingounis y Wadiche 2007). En este proceso, la actividad de los transportadores depende de un gradiente electroquímico de Na^+ que es

generado por ATPasas Na^+/K^+ (Masson et al., 1999). La generación de este gradiente permite la entrada de una molécula de glutamato que se cotransporta con dos iones Na^+ y un H^+ , liberando simultáneamente al espacio extracelular un K^+ . La recuperación del gradiente de Na^+ tras la recaptación del glutamato requiere consumo de ATP por la ATPasa (Attwell et al., 1993; Camacho y Massieu 2006; Szatkowski et al., 1990; Tzingounis y Wadiche 2007).

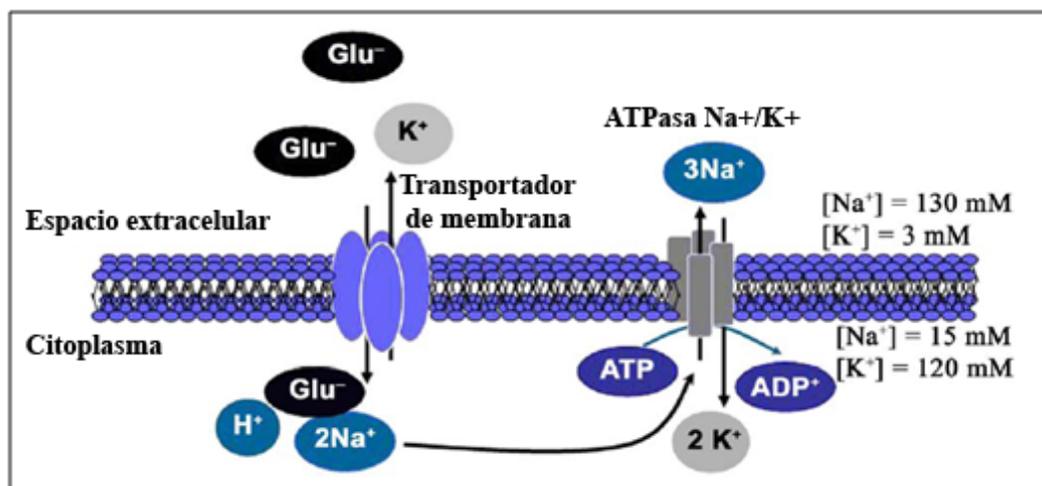


Figura 7. Recaptación del glutamato extracelular. La recaptación de glutamato es un proceso dependiente del gradiente electroquímico de sodio, que es mantenido por ATPasas Na^+/K^+ en un proceso que consume ATP. (Imagen modificada de Camacho and Massieu 2006).

Estructura y topología

Los EAATs son homómeros compuestos por tres subunidades, cada una de las cuales contiene un sitio de unión a glutamato. Sus dominios N-terminal y C-terminal son intracelulares y su topología de transmembrana no está aún bien definida, habiéndose propuesto dos modelos. Ambos proponen 8 dominios de transmembrana, pero difieren en los tipos de dominios situados entre las regiones de transmembrana 6 y 8 (Shigeri et al., 2004b).

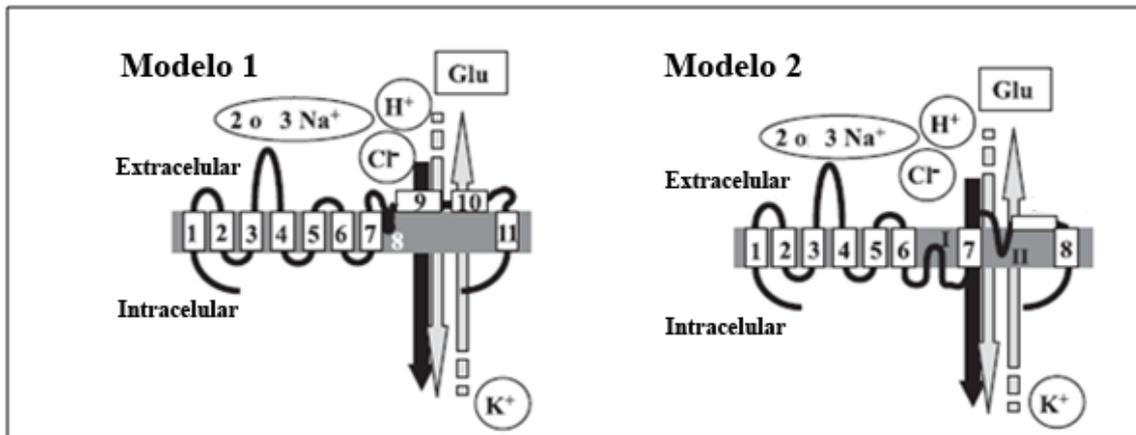


Figura 8: Modelos propuestos de topología de transmembrana de los EAATs. (Imagen modificada de Shigeri et al., 2004a).

Subtipos

Durante los años noventa se aislaron y caracterizaron distintos transportadores de aminoácidos excitatorios (EAATs): EAAT1 o GLAST (Glutamate/Aspartate Transporter) (Storck et al., 1992), cuyo ARNm tiene una localización astrogliar y ependimar (Berger y Hediger 1998); EAAT2 o GLT-1 (Glutamate Transporter-1) (Pines et al., 1992), cuyo ARNm se ha localizado tanto en astrogliar como en neuronas (Berger y Hediger 1998); EAAT3 o EAAC1 (Excitatory Aminoacid Carrier 1) (Kanai y Hediger 1992), cuyo ARNm se localiza principalmente en neuronas (Rothstein et al., 1994); EAAT4, cuya distribución está restringida al cerebelo (Fairman et al., 1995); y EAAT5, que se ha detectado en fotorreceptores y en células bipolares de la retina (Arriza et al., 1997). A diferencia de la restringida localización de EAAT4 y EAAT5, los transportadores EAAT1, EAAT2 y EAAT3 tienen una amplia distribución en el SNC, con niveles elevados en corteza cerebral, hipocampo y estriado (Tzingounis y Wadiche 2007).

Mediante estudios en cultivos se ha demostrado que tanto las neuronas como los astrocitos presentan una gran capacidad de recaptación de glutamato

(Drejer et al., 1982), aunque la astroglía parece ser primordial en la recaptación del glutamato en áreas cerebrales con alta actividad glutamatérgica (Rothstein et al., 1996; Schousboe y Divac 1979; Schousboe 1981). Los mismos astrocitos coexpresan GLT-1 y GLAST (Chaudhry et al., 1995; Lehre et al., 1995), pero dependiendo del tipo celular y del ambiente, la regulación de estos transportadores es diferente (Gegelashvili y Schousboe 1997). Esta regulación diferencial podría ser el resultado de la activación de distintas vías de señalización (Berger y Hediger 1998). En este sentido, mediante estudios *in vitro* se ha señalado que algunos factores neuronales solubles (como el dibutiril AMPc, que mimetiza la influencia del co-cultivo de astrocitos con neuronas) inducen la expresión de GLT-1, pero no la de GLAST, (Gegelashvili et al., 1997; Swanson et al., 1997b).

El transportador EAAC1 se ha descrito como una proteína específica de neuronas (Bjoras et al., 1996; Kanai y Hediger 1992). La mayoría de las neuronas, ya sean glutamatérgicas o no, expresan EAAC1, independientemente de la región cerebral en la que se encuentren (Rothstein et al., 1994). La amplia expresión de este transportador puede estar relacionada con el importante papel del glutamato como intermediario en el metabolismo celular y como precursor en la síntesis de GABA (Berger y Hediger 1998).

Al igual que en el caso de los receptores de glutamato, la actividad de los EAATs también puede regularse mediante fosforilaciones, glicosilaciones, factores neuronales solubles, interacciones con otras proteínas así como con algunas subunidades del NMDAR (Masson et al., 1999; Tzingounis y Wadiche 2007).

NEUROTRANSMISIÓN GLUTAMATÉRGICA EN LA ISQUEMIA CEREBRAL

Se ha señalado que el uso de antagonistas del NMDAR puede reducir el daño ocasionado por la isquemia cerebral (Davis et al., 1995; Mehta et al., 2007), lo que ha convertido a estos receptores en una de las principales dianas de estudio. La neurotoxicidad del NMDAR (Sattler et al., 1999) viene determinada por la formación de canales con gran permeabilidad al Ca^{2+} que se encuentran compuestos por subunidades NR1 y NR2 (Burnashev 1998). Se ha descrito una mayor muerte celular cuando se expresan NMDARs que contienen las subunidades NR2A y NR2B que cuando contienen las subunidades NR2C y NR2D (Lynch y Guttman 2002), por lo que parece que la expresión de las subunidades NR2A y NR2B genera más susceptibilidad al daño excitotóxico. Esta hipótesis es corroborada por datos *in vivo* procedentes de ratones *knock-out* para la subunidad NR2A en los que la zona cerebral infartada tras la isquemia es menos extensa que en ratones no modificados genéticamente (Morikawa et al., 1998). Esta característica excitotóxica de la subunidad NR2A parece depender de su dominio C-terminal (Tymianski et al., 1993), ya que la eliminación de 400 aminoácidos en dicho extremo implica una reducción de la muerte celular (Anegawa et al., 2000). De hecho, en este dominio se producen las interacciones con muchas de las proteínas citoplásmicas que iniciarán la cascada isquémica (Kornau et al., 1995; Scannevin y Huganir 2000).

Los AMPARs están involucrados en el daño excitotóxico debido a su relativa permeabilidad al Ca^{2+} (Ozawa et al., 1998; Stys 2004; Tekkok et al., 2007). En condiciones fisiológicas, la presencia de la subunidad GluR2 en los

AMPARs impide la entrada de calcio. La extensión en la que están presentes isoformas de AMPARs con esta subunidad podría explicar la mayor vulnerabilidad a la isquemia de algunas estructuras. En este sentido, se ha descrito que la isquemia cerebral origina una reducción en la expresión de la subunidad GluR2 en los AMPARs de las neuronas hipocampales del área CA1, descritas como vulnerables al daño isquémico (Dos-Anjos et al., 2009b; Friedman et al., 2001; Gorter et al., 1997; Opitz et al., 2000; Pellegrini-Giampietro et al., 1997). La ausencia de la subunidad GluR2 permite la entrada de iones $\text{Ca}^{2+}/\text{Zn}^{2+}$ (Hollmann et al., 1991) lo que puede desencadenar la muerte neuronal (Soundarapandian et al., 2005), como se ha observado en ratones *knock-down* para la subunidad GluR2 (Oguro et al., 1999). A partir de estos datos, en los años 90, el grupo de Pellegrini-Giampietro propuso la “hipótesis GluR2”, la cual sugiere que tras un daño isquémico, la muerte neuronal retrasada de las células piramidales de la vulnerable región hipocampal CA1, podría deberse a una reducción de la expresión de GluR2 y, por consiguiente, al incremento de la entrada de Ca^{2+} a través de los canales del AMPAR (Pellegrini-Giampietro et al., 1997). Varios estudios posteriores apoyan esta hipótesis, como aquellos donde se observó la muerte de las neuronas piramidales del área hipocampal CA3, descrita como resistente al daño isquémico, como consecuencia de la sobreexpresión de AMPARs permeables al calcio, en contraste con la supervivencia de las neuronas del área hipocampal CA1 que sobreexpresaron AMPARs impermeables al calcio (Liu et al., 2004). Estudios más recientes han implicado a la enzima encargada de la edición Q/R de GluR2, ADAR2, en la vulnerabilidad al daño isquémico, ya que la expresión de esta enzima se reduce como consecuencia de la isquemia

cerebral, y la inducción de su expresión protege a las neuronas vulnerables del daño isquémico (Peng et al., 2006). Finalmente, el papel de la subunidad GluR2 en la isquemia cerebral queda confirmado por la internalización de los AMPARs que contienen la subunidad GluR2 y su sustitución por AMPARs permeables en las regiones sinápticas (Liu et al., 2006).

Como hemos señalado anteriormente, la acumulación de glutamato en la hendidura sináptica juega un papel crucial en los fenómenos de excitotoxicidad. La gran cantidad de glutamato liberado durante la isquemia podría ser debida a una disminución de la recaptación, el transporte reverso de estos transportadores y/o la reducción de su expresión (Camacho y Massieu 2006). La disminución de la recaptación y el transporte reverso de los EAATs están mediados por el fallo bioenergético que se produce durante la isquemia, lo cual impide la acción de las ATPasas Na^+/K^+ alterando el gradiente de Na^+ que no solo impide la recaptación de glutamato, sino que incluso promueve su liberación al medio a través de la reversión de los EAATs. En este sentido se ha señalado que el bloqueo en la recaptación de glutamato antes de la isquemia cerebral, reduce la liberación de aminoácidos excitatorios (Camacho y Massieu 2006; Dawson et al., 2000; Phillis et al., 2000) y parece que durante los primeros minutos de isquemia, cuando todavía no se ha agotado la energía, los EAATs actúan normalmente, eliminando el glutamato liberado. Sin embargo, cuando falta el ATP, se libera glutamato al espacio extracelular a través de los EAATs lo que contribuye a la muerte celular (Mitani y Tanaka 2003). La contribución de los distintos tipos de transportadores (neuronales o gliales) en la liberación de aminoácidos excitatorios no está bien definida (Camacho y Massieu 2006). A pesar de que las células gliales presentan un

mayor número de EAATs que las neuronas (Danbolt 2001) parece que la liberación de glutamato procede principalmente de las neuronas, ya que su concentración de glutamato citosólico es tres veces superior a la encontrada en las células gliales (Attwell et al., 1993). El principal mecanismo relacionado con la excitotoxicidad y eliminación de este neurotransmisor parece ser la recaptación astrogliar de glutamato mediante los transportadores GLT-1 y GLAST (Rothstein et al., 1996), aunque otros transportadores como EAAC1 (Kiyama y Kiryu-Seo 2007) podrían estar implicados.

Además, se ha correlacionado la acidosis láctica provocada por la glucólisis anaerobia con una reducción de la recaptación de glutamato (Swanson et al., 1995; Swanson et al., 1997a). Estudios en ratones transgénicos que carecen del transportador GLT-1 han demostrado el papel de este transportador en la eliminación del glutamato tras el daño isquémico (Camacho y Massieu 2006). También se ha observado una reducción de la expresión de GLT-1 tras la isquemia cerebral (Fukamachi et al., 2001; Raghavendra Rao et al., 2000; Rao et al., 2001; Torp et al., 1995).

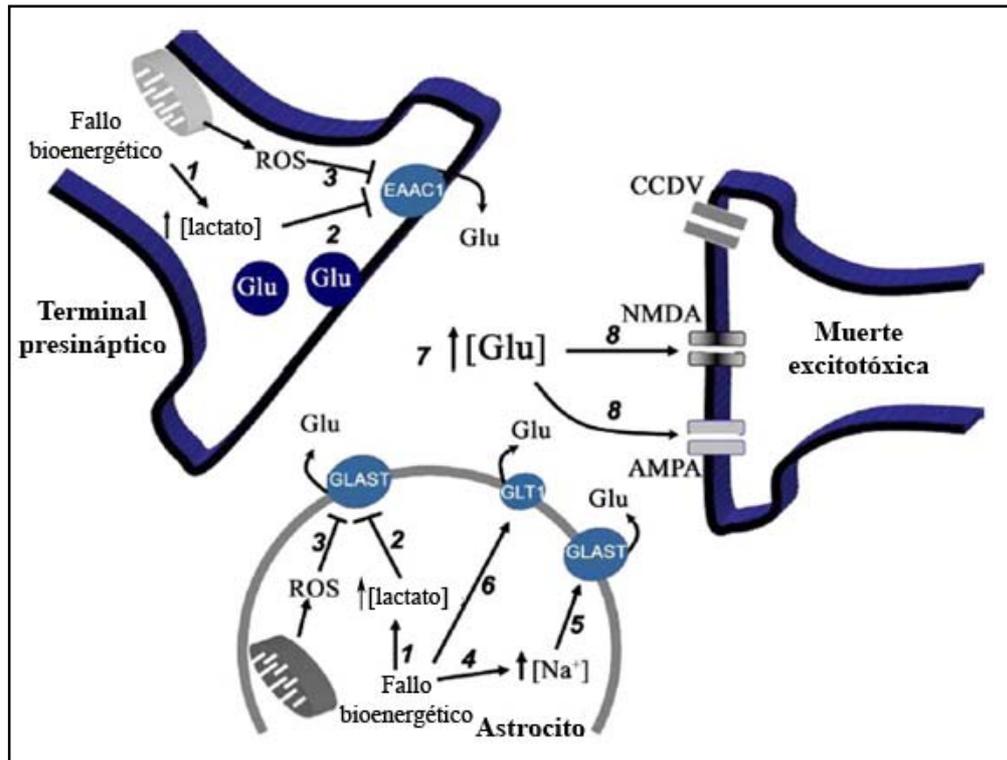


Figura 9: Posibles alteraciones de los EAATs en la isquemia cerebral. El fallo energético y el incremento en la concentración de lactato (1) tras la isquemia cerebral impiden la recaptación de glutamato (2). Los radicales libres (ROS) generados como consecuencia de la activación de los receptores de glutamato inducen la oxidación de residuos de cisteína en los EAATs, lo que también inhibe la recaptación (3). El incremento en la concentración intracelular de sodio (4) como consecuencia del fallo energético hace que estos transportadores inviertan el transporte del glutamato (5) liberándolo al medio. Además, la isquemia reduce la expresión de los EAATs (6). Todas estas alteraciones provocan una elevación de los niveles de glutamato extracelular (7) que desencadena la muerte neuronal por excitotoxicidad (8). (Imagen modificada de Camacho y Massieu 2006).

INFLUENCIA DE LA EDAD EN LA NEUROTRANSMISIÓN GLUTAMATÉRGICA

Varios estudios realizados en roedores han señalado que la edad provoca un descenso en la concentración de glutamato en la corteza cerebral (Davis et al., 1970; Saransaari y Oja 1995; Strolin Benedetti et al., 1990) y el hipocampo

(Banay-Schwartz et al., 1989; Benedetti et al., 1991; Saransaari y Oja 1995; Strolin Benedetti et al., 1990). Se ha sugerido que este descenso podría relacionarse con los déficits cognitivos y la pérdida de memoria (Segovia et al., 2001). Sin embargo, dado que el 70-80% del glutamato es metabólico y sólo el 20-30% está presente en los terminales nerviosos (Fonnum 1993), los descensos observados en el contenido de glutamato parecen relacionarse más con cambios en la actividad metabólica (Segovia et al., 2001) que con la neurotransmisión. Mediante estudios electrofisiológicos en la región prefrontal de la corteza cerebral de mono se ha demostrado un descenso significativo en la transmisión sináptica excitatoria como consecuencia de la edad (Luebke et al., 2004) que se ha asociado a los cambios estructurales que sufren las neuronas envejecidas y a la disminución de su excitabilidad (Cobo et al., 1993). Estos cambios parecen relacionados con las modificaciones dependientes de la edad que sufren los receptores glutamatérgicos ionotrópicos, tanto en su expresión como en su distribución (Dickstein et al., 2007). En este sentido se han descrito descensos en la densidad de los receptores de NMDA y AMPA en la corteza cerebral y el hipocampo (revisado por Segovia et al., 2001) y se ha observado que el número de neuronas que expresan ciertas subunidades de estos receptores (como NR1 o GluR2) se reduce significativamente durante el envejecimiento (Gazzaley et al., 1996; Hof et al., 2002). También se ha demostrado, mediante estudios en cultivos neuronales, que la vulnerabilidad a la excitotoxicidad mediada por el NMDAR se incrementa con la edad del individuo (Marks et al., 2000). Los experimentos de señalización con Ca^{2+} realizados *in vivo* en neuronas individuales muestran el papel del calcio en el incremento de la vulnerabilidad al daño isquémico asociado a la edad. Estos

experimentos muestran que la concentración intracelular de calcio en las neuronas procedentes de animales de mediana edad (12-16 meses) se incrementaba con respecto a la concentración detectada en las neuronas jóvenes (2 meses) y podía incluso duplicarse en las neuronas envejecidas (24 meses) (Hajieva et al., 2009; Raza et al., 2007).

También el sistema de recaptación de glutamato es afectado por la edad, habiéndose descrito que el envejecimiento da lugar a una disminución de la capacidad de las células cerebrales para eliminar el glutamato de la hendidura sináptica (Saransaari y Oja 1995; Vatassery et al., 1998; Wheeler y Ondo 1986), aumentando el tiempo necesario para su eliminación (Nickell et al., 2007). Esto podría interpretarse como un descenso en el número de transportadores (Segovia et al., 2001), aunque podría ser compensado por una mayor afinidad en los transportadores restantes (Price et al., 1981; Saransaari y Oja 1995) o por cambios en la tasa de liberación de glutamato (Segovia et al., 2001). Los cambios en la recaptación de glutamato parecen producirse principalmente en las neuronas (Daniels y Vickroy 1998), aunque la recaptación se realiza principalmente por las células gliales (Gegelashvili y Schousboe 1998; Rothstein et al., 1996). Los astrocitos aumentan en número y/o se vuelven más activos en el encéfalo envejecido (David et al., 1997), lo que podría compensar los descensos en la recaptación de glutamato en las neuronas (Segovia et al., 2001).

MODELOS ANIMALES DE ISQUEMIA CEREBRAL

Para comprender los mecanismos subyacentes al daño celular inducido por los accidentes cerebrovasculares se han desarrollado diferentes modelos

experimentales (Olson y McKeon 2004) que permiten estudiar tanto los mecanismos moleculares como los efectos fisiopatológicos que ocurren tras la isquemia cerebral, con objeto de desarrollar nuevas moléculas susceptibles de ser utilizadas en la clínica (Prieto-Arribas et al., 2008). Básicamente existen dos modelos experimentales de isquemia cerebral *in vivo* que se desarrollan principalmente en roedores, el modelo de isquemia global y el modelo de isquemia focal.

En el modelo de isquemia global se impide el flujo sanguíneo a todo el encéfalo, mimetizando la isquemia cerebral que puede ocasionarse en humanos como consecuencia de una parada cardíaca, una hipotensión grave o procedimientos quirúrgicos que alteran el flujo sanguíneo (Wang-Fisher 2009). Existen dos procedimientos para llevar a cabo este modelo. En uno de ellos se produce la obstrucción de las cuatro arterias (4VO) que llevan la sangre al encéfalo, bloqueando permanentemente las arterias vertebrales y temporalmente las arterias carótidas (Pulsinelli y Brierley 1979). En el modelo de obstrucción de 2 vasos (2VO) se bloquean temporalmente las arterias carótidas (Eklof y Siesjo 1972). El modelo 2VO mimetiza accidentes cerebrovasculares ocasionados por aterosclerosis, trombos y embolia (Wang-Fisher 2009). Los dos modelos de isquemia global producen necrosis neuronal en áreas encefálicas vulnerables específicas (Smith et al., 1984). Las células mueren a los 3-7 días tras la isquemia, lo que deja un margen de actuación para el uso de terapias que eviten esa muerte celular retrasada (Wang-Fisher 2009). Ambos modelos tienen ventajas e inconvenientes. En el modelo 4VO, normalmente, se requieren dos cirugías, una para la obturación de las arterias vertebrales y otra para el bloqueo temporal de las carótidas. El sistema 2VO es

más sencillo quirúrgicamente pero requiere conseguir hipotensión (aproximadamente se reduce a 50 mm Hg la presión arterial media) para impedir que la sangre procedente de las arterias vertebrales irrigue el encéfalo a través del polígono de Willis. Para ello se utilizan hipotensores, como el trimetafán o la fentolamina, que obviamente pueden interferir con los resultados. Alternativamente, se ha producido hipotensión mediante el sangrado controlado, pero esto también conlleva modificaciones que pueden alterar el sistema. En jerbo y en algunas cepas de ratón (C57Bl/6J, BALB/C y CD-1) estos modelos pueden realizarse sin necesidad de realizar la oclusión de las arterias vertebrales ni generar hipotensión en el animal, ya que en estas especies el polígono de Willis es incompleto y no existe el flujo colateral residual (Barone et al., 1993b; Hossmann 2008; Kelly et al., 2001; Levine y Payan 1966; Somova et al., 2000). Sin embargo, la anatomía cerebrovascular y nerviosa de estas especies no es tan similar a la humana como lo es la de la rata (Wang-Fisher 2009), y por ello hemos preferido utilizar la rata como modelo de estudio. Hemos optado por el modelo 2VO para evitar los problemas quirúrgicos del modelo 4VO y se ha utilizado trimetafán como agente hipotensor debido a que no atraviesa la barrera hematoencefálica (Degoute 2007).

Los modelos de isquemia focal inducen isquemia cerebral mediante la oclusión o bloqueo de una de las arterias que suministran sangre al encéfalo, principalmente la arteria cerebral media, reduciendo el flujo sanguíneo en un área cerebral limitada. Esta oclusión puede realizarse de distintas maneras (ligación, cauterización eléctrica, inserción de un filamento intraluminal, trombosis fotoquímica, etc.), pero todas ellas dan lugar a dos áreas definidas

histológicamente, el núcleo isquémico y la zona de penumbra (Wang-Fisher 2009), cuyas características ya se han descrito. A diferencia de la isquemia global, donde la vulnerabilidad selectiva está anatómicamente definida, en la isquemia focal las zonas infartadas se modifican con el tiempo y difieren entre experimentos individuales. Esta variabilidad implica que todos los parámetros de interés tengan que ser medidos en el mismo experimento (Hossmann 2008).

Además de los modelos de isquemia *in vivo*, también se han diseñado modelos *in vitro*. En estos modelos se utilizan cultivos neuronales primarios (Goldberg y Choi 1993), cultivos organotípicos (Vornov et al., 1994) o secciones de tejido cerebral de 350-400 μm (Whittingham et al., 1984), que son incubadas en medios carentes de oxígeno y glucosa para mimetizar la interrupción de oxígeno y nutrientes provocada por la isquemia cerebral *in vivo*. Estos modelos te permiten controlar mejor las condiciones experimentales, pero presentan ciertas desventajas como, por ejemplo, el efecto traumático que sufre el tejido cerebral durante la obtención de secciones mediante el vibratomo. Además, el medio de incubación utilizado difiere sustancialmente del microambiente extracelular que existe *in vivo*. Finalmente, tanto los tejidos como las células se obtienen, principalmente, de individuos jóvenes (Hossmann 2008), por lo que las modificaciones relacionadas con la edad no estarían consideradas en los resultados provenientes de estos modelos.

HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS

HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS

Dada la asociación que existe entre la edad y el incremento de accidentes cerebrovasculares, así como la implicación del sistema glutamatérgico y de la inflamación en los mecanismos de daño neuronal, para realizar este estudio se propuso la siguiente hipótesis de trabajo: **la edad es un factor que aumenta la vulnerabilidad a la isquemia porque modifica la expresión de los genes del sistema glutamatérgico y la respuesta inflamatoria.** Para realizar el estudio se utilizó un modelo de isquemia global seguido de 48 horas de reperfusión que se aplicó a animales jóvenes y viejos, analizándose adicionalmente el efecto del tratamiento con un agente antiinflamatorio. Para verificar esta hipótesis se propusieron los siguientes objetivos:

- 1) Caracterización de la expresión génica de una serie de genes del sistema glutamatérgico:
 - a. las subunidades más relevantes del receptor de NMDA (NR1, NR2A y NR2B).
 - b. las subunidades GluR1 y GluR2 del receptor de AMPA.
 - c. los transportadores de aminoácidos excitatorios GLT-1, GLAST y EAAC1, que son los más relevantes en la recaptación glutamatérgica por células gliales y neuronales.
- 2) Caracterización del efecto de la edad en la expresión génica de los marcadores de la respuesta inflamatoria CD11b y GFAP.
- 3) Caracterización de los genes del sistema glutamatérgico indicados en el objetivo 1 tras el tratamiento con un agente antiinflamatorio.

MATERIAL Y MÉTODOS

MATERIAL Y MÉTODOS

MATERIAL BIOLÓGICO Y EQUIPAMIENTO

ANIMALES

En este trabajo se han utilizado ratas (*Rattus norvegicus*) macho de la cepa *Sprague-Dawley* de 3 meses (n=36) y 18 meses (n=33), con un peso medio de 350-450 g para los animales de 3 meses y de 600-800 g para los de 18 meses. Estos animales se obtuvieron de los laboratorios Charles River (Barcelona, España) y se mantuvieron en el Animalario de la Universidad de León bajo condiciones controladas durante todo el estudio: 3 animales por jaula, fotoperiodo de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad, temperatura de $22 \pm 1^\circ\text{C}$ y humedad relativa del 55%. Los animales tuvieron libre acceso al agua y a pienso de mantenimiento para roedores AO4 (Panlab; Barcelona España). Los animales de cada edad se dividieron de manera aleatoria en dos grupos (*sham* e isquémico). Además, 3 animales de cada edad se utilizaron como animales *naïve*. Los experimentos se llevaron a cabo de acuerdo a las normas contenidas en la Guía del Consejo de la Unión Europea (86/609/EU), siguiendo la regulación española (RD 1201/2005, BOE 252/34367-91, 2005) para el uso de animales de laboratorio. Todos los experimentos fueron aprobados por el Comité Científico de la Universidad de León y, en todo momento, se intentó reducir al mínimo el número de animales, minimizando el sufrimiento de los mismos.

INSTALACIONES Y EQUIPAMIENTO

Este estudio se ha realizado en diferentes instalaciones pertenecientes a la Universidad de León incluyendo el Departamento de Biología Molecular (área de Biología Celular), el Animalario, el Instituto de Biomedicina, el Instituto de Genómica y Proteómica y el Departamento de Medicina, Cirugía y Anatomía Veterinaria (área de Medicina y Cirugía Animal).

En el proceso de isquemia se utilizó un equipo de anestesia inhalatoria modelo Fabius (Dräger, USA) con T (Ayre), un vaporizador de halotano (Ayre), una cámara anestésica de metacrilato para la inducción de la anestesia, un microscopio quirúrgico modelo M690 (Leica, Alemania), una placa térmica modelo Happy Pet Comforter (Challoner Marketing Ltd., UK), un equipo de infusión Syringe pump modelo Sep 11S (Ascor, USA) para la administración del hipotensor y un monitor M1166A modelo 66S (Hewlett-Packard, USA).

Las secciones de tejido se obtuvieron mediante un micrótomo de congelación Microm HM450 (Microm Laborgeräte GmbH, Alemania). Para la obtención de ARN y proteínas se utilizó un homogeneizador modelo T10 basic ULTRA TURRAX (IKA, Alemania) y una centrífuga de mesa modelo 5415R (Eppendorf, Alemania). Hasta el momento de su utilización, el ARN y las proteínas se mantuvieron a -80°C en un arcón de frío profundo Revco ULT1386-5-V12 (Revco Thecnologies Inc., Estados Unidos).

La concentración de ARN se determinó utilizando el espectrofotómetro NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies, US) y su integridad mediante el sistema de electroforesis automatizada Experion (Bio-Rad laboratorios, España). Los ensayos de PCR en tiempo real se realizaron utilizando el termociclador Abi Prism 7000 (Applied Biosystems, Foster City, CA).

La concentración de proteínas se determinó utilizando el espectrofotómetro Synergy HT (Bio-Tek, USA). Los procesos de electroforesis vertical y transferencia se realizaron mediante una cubeta vertical X-Cell Sure Lock (Invitrogen, USA) y fuente de alimentación Modelo 1000/500 (Bio-Rad, Laboratories, Wilmington, USA). Las membranas de nitrocelulosa de *Western Blot* se expusieron a láminas de fotografía en un chasis RPN1629 (Amersham; GE Healthcare). Las láminas obtenidas se digitalizaron en el densitómetro de imagen GS-800 (Bio-Rad Laboratories, Wilmington, USA).

Para la medida de pH de las soluciones utilizadas en los experimentos se utilizó un pHmetro modelo Crison micropH 2000 (Crison Instruments, S.A., España). También se utilizaron un incubador (Ralpe), una báscula de precisión XA110 (Radwag, USA), un agitador orbital con rotación 3D, (Lab-line, USA), un agitador magnético (Agimatic, España) y un agitador Vórtex REAX 2000 (Heidolph, Alemania). El agua desionizada se obtuvo mediante el purificador de agua Millipore Elix 3 (Millipore ibérica S.A., España).

REACTIVOS Y FÁRMACOS

Todos los reactivos utilizados en este estudio fueron suministrados por entidades comerciales o laboratorios farmacéuticos. A continuación, se muestra un listado de los reactivos suministrados por cada una de ellas:

- *High Capacity cDNA Reverse Transcription kit, SYBR® Green PCR Master Mix*, placas de 96 pocillos para PCR en tiempo real, film adhesivo óptico para placas de PCR en tiempo real (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

- Kit de *Experion RNA HighSens Analysis*, kit *DC Protein Assay*, marcador de peso molecular, membrana de nitrocelulosa (Biorad Laboratories, Wilmington, USA).
- Meloxicam (Boehringer Ingelheim, España).
- Pentobarbital Euta-Lender (Normon, España)
- Láminas de fotografía (GE Healthcare, España).
- Ácido clorhídrico, fosfato sódico, fosfato potásico, Tris-base, medio de montaje Entellan, metanol, etanol, xilol, ácido acético (Merck KGaA, Alemania).
- Sustrato de Western blot *Chemiluminescent HRP* (Millipore ibérica S.A., España).
- Proteogel ultra pura (Pronadisa, España).
- Reactivo *Tripure*, trimetafán (Roche, España).
- Halotano, oligonucleótidos de PCR en tiempo real, *RNAse Zap*, ADNasa, paraformaldehído, hidrocloreuro de guanidina, laurel dodecilsulfato de sodio (SDS), glicina, persulfato amónico (APS), TEMED (N,N,N',N'-tetrametiletilen-diamino), ditiotreitól (DTT), azul de bromofenol, Tween-20, Tritón X-100, suero de cabra, extravidina, gelatina, cloruro sódico, fosfato monosódico, fosfato disódico, hidróxido de sodio (Sigma-Aldrich, España).
- Kit de avidina/biotina (Vector Labs, Burlingame, CA, USA).
- Revelador D-19, fijador GBX (Kodak, España).

ANTICUERPOS

Se utilizaron los siguientes anticuerpos primarios:

- Anticuerpo de cabra anti-NR1 (ref. sc1467, Santa Cruz Biotechnology, Inc.).
- Anticuerpo de conejo anti-NR2A (ref. AB1555, Millipore).
- Anticuerpo de ratón anti-NR2B (ref. AB1504, Bionova).
- Anticuerpo de conejo anti-GluR1 (ref. AB1504, Millipore).
- Anticuerpo de cabra anti-GluR2 (ref. sc7610, Santa Cruz Biotechnology, Inc.).
- Anticuerpo de ratón anti-CD11b (ref. MCA275GA, AbD Serotec).
- Anticuerpo de ratón anti- β -actina (ref. A5316, Sigma-Aldrich).
- Anticuerpo de ratón anti-NeuN (ref. MAB377, Millipore).

A continuación, se enumerarán los anticuerpos secundarios utilizados:

- Anticuerpo de cabra anti-conejo conjugado con peroxidasa (ref. P0448, Dako).
- Anticuerpo de cabra anti-ratón conjugado con peroxidasa (ref. AP130P, Millipore).
- Anticuerpo de burro anti-cabra/oveja conjugado con peroxidasa (ref. AB324P, Chemicon; Millipore).
- Anticuerpo de cabra anti-conejo biotinilado (ref. BA-9200, Vector).

RECURSOS INFORMÁTICOS

Las bibliografía y las secuencias génicas se obtuvieron de las bases de datos Pubmed/MEDLINE (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Entrez/>), mantenidas por el NCBI. Los cebadores de la PCR en tiempo real se diseñaron utilizando el programa *Primer Express* (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Los

incrementos en fluorescencia producida durante el proceso de amplificación de la PCR en tiempo real se analizaron con el programa *Sequence Detector* (SDS versión 1.6, Applied Biosystems). La densidad óptica de las láminas de *Western blot* se cuantificó con el programa *Quantity One* (Bio-Rad Laboratories, Wilmington, USA) Los datos obtenidos de los ensayos de PCR en tiempo real fueron procesados en una hoja de cálculo *Microsoft Excel 2007* (Microsoft Corp., Estados Unidos). Para el análisis estadístico de los resultados procedentes tanto de PCR en tiempo real como de *Western blot*, se utilizó el programa *GraphPad Prism 4.0* (GraphPad Software Inc., Estados Unidos). El procesador de texto utilizado fue *Microsoft Word 2007* (Microsoft Corp., Estados Unidos). Para el tratamiento de las imágenes y figuras representadas en esta tesis se utilizó el programa *Adobe PhotoShop CS* (Adobe Systems Incorporated, Estados Unidos). La gestión bibliográfica se llevó a cabo mediante el programa *RefWorks* (ProQuest LLC, UK).

MÉTODOS

ISQUEMIA GLOBAL TRANSITORIA

Para realizar la anestesia el animal es alojado en la cámara de inducción de anestesia, en la cual se introduce halotano al 4% en 100% de oxígeno con un flujo de 3 L/minuto. El animal anestesiado se dispone sobre una manta térmica y se controla su temperatura rectal ($36 \pm 1^\circ\text{C}$) varias veces a lo largo de toda la operación quirúrgica. La anestesia del animal se mantiene con halotano al 1,5-2,5% en 100% de oxígeno con un flujo de 800 mL/minuto suministrado a través de una mascarilla. El procedimiento quirúrgico se inicia con una incisión longitudinal en la parte anterior del cuello para exponer las arterias carótidas

comunes, que se aíslan hasta el momento de su oclusión. A continuación, se expone la arteria femoral, que se cateteriza para monitorizar la presión arterial y para la administración del hipotensor trimetafán (cedido por Roche) a una concentración de 15 mg/mL y un flujo de 0,3 mg/minuto. Este hipotensor se utilizó para generar en la rata una hipotensión moderada (40-50 mm Hg). Una vez alcanzado el nivel de hipotensión, se induce la isquemia global transitoria mediante la oclusión de las arterias carótidas con clips específicos (*atraumatic aneurysm clips*) durante 15 minutos. En este tiempo, la hipotensión se mantiene controlada ajustando el flujo de halotano, el cual tiene un efecto hipotensor intrínseco (Bendel et al., 2005a; Degoute 2007). Una vez finalizado el proceso isquémico, y tras la recuperación de la presión arterial, se elimina el catéter y se suturan las incisiones. Cuando el animal se recupera de la anestesia, se mantiene en las condiciones estándar ya señaladas durante un periodo de reperfusión de 48 horas. Los animales operados se mantienen aislados. En el caso de los animales *sham*, el procedimiento se realiza exactamente igual con la excepción de la oclusión de las arterias carótidas.

TRATAMIENTO ANTIINFLAMATORIO

Como agente antiinflamatorio se utilizó meloxicam. Este antiinflamatorio se ensayó en 13 animales de 3 meses, de los cuales 5 fueron *sham* y 8 fueron sometidos a isquemia-reperfusión (I/R). Tres de los animales sometidos a I/R murieron entre las 24 y 48 horas después de la operación. El tratamiento antiinflamatorio fue también probado en 10 animales de 18 meses (5 *sham* y 5 sometidos a I/R). Todos los animales de 18 meses sometidos a I/R murieron en las 30 horas siguientes a la operación y todos los *sham* sobrevivieron. El

tratamiento se realizó mediante inyección subcutánea (0,5 mg/kg) una hora y veinticuatro horas después de finalizado el procedimiento quirúrgico.

PROCESAMIENTO DEL TEJIDO

Tras 48 horas de reperfusión después de la isquemia global transitoria, los animales fueron decapitados, los cerebros se extrajeron rápidamente utilizando material quirúrgico esterilizado y tratado con la solución *RNAse Zap* para evitar la contaminación con RNAsas. Se disecaron las regiones hipocampales CA1 y CA3, el giro dentado (GD) y la corteza cerebral (CC), que se congelaron en nieve carbónica y se almacenaron a -80°C hasta su procesamiento.

El procedimiento que se sigue en los animales cuyos cerebros son destinados a estudios morfológicos es el siguiente. El animal se anestesia profundamente con pentobarbital (inyección intraperitoneal, 150 mg/kg), se expone el corazón, se secciona la aurícula derecha y se procede a la canulación del ventrículo izquierdo haciendo pasar una solución salina (NaCl 140 mM) a temperatura ambiente, seguida de paraformaldehído al 4% en tampón fosfato salino (PBS), pH 7,4 a 4°C. El encéfalo se extrae y se mantiene toda la noche en paraformaldehído al 4% en PBS, pH 7,4 a 4°C. Pasado ese tiempo de fijación, el encéfalo se mantiene en sacarosa al 30% en PBS, pH 7,4, a 4°C durante 48 horas, para asegurar que el encéfalo ha llegado al fondo de esta solución crioprotectora, y se procede a congelarlo en nieve carbónica. Las muestras se almacenaron a -80°C hasta la obtención de secciones de 40 micras mediante microtomo de congelación.

EXTRACCIÓN DE ARN Y RETROTRANSCRIPCIÓN (RT)

El ARN total se extrajo mediante el reactivo *Tripure* siguiendo las recomendaciones del fabricante y se incubó con ADNasa I (0,5 mg/ml) durante 30 minutos a 37°C para prevenir la posible contaminación de ADN. La integridad del ARN obtenido se midió utilizando el kit *Experion RNA HighSens Analysis* y siguiendo las recomendaciones del fabricante. En todas las muestras, tanto de animales de 3 como de 18 meses y tanto *sham* como isquémicos, el ratio 28S/18S se mantuvo entre 1,8-2, valor indicativo de la buena integridad del ARN. La cantidad de ARN total se determinó midiendo el ratio de absorbancia 260/280 nm de las alícuotas de ARN precipitadas con etanol, utilizando el espectrofotómetro NanoDrop ND-1000. Nuevamente, la cantidad de ARN obtenida fue similar (0,5-0,7 µg/mg de tejido) en todas las muestras. La retrotranscripción se realizó mediante cebadores aleatorios (*random hexamer primers*) utilizando 600 ng de ARN total como molde y el kit *High Capacity cDNA Reverse*, donde se siguieron las recomendaciones del fabricante.

PCR EN TIEMPO REAL

Tras la retrotranscripción, el ADN complementario (ADNc) se diluyó (1/10) en agua milliQ estéril y se utilizó como molde en los ensayos de PCR en tiempo real. Las secuencias de ARNm se obtuvieron del *GeneBank* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/>). Los cebadores se diseñaron utilizando el programa *Primer Express* y todos ellos se seleccionaron de modo que entre el cebador directo y el inverso hubiera una secuencia intrónica para asegurar la

ausencia de contaminación genómica. Las secuencias de los cebadores utilizados en esta tesis se indican en la tabla 1.

GEN	CEBADOR DIRECTO	CEBADOR REVERSO	NÚMERO DE ACCESO
NR1	5'-cagccgtgaacgtgtggag	5'-tgctctaccactcttctatcc	NM_017010
NR2A	5'-cagtgatgtgtatatttcagagcatgta	5'-acactcgtctattgtgcaggaa	NM_012573
NR2B	5'-tccgtcttctatgtggatgct	5'-cctctaggcggacagattaagg	NM_012574
CD11b	5'-gatgcttactgggttatgctt	5'-cgaggcggcctaaaacca	NM_012711
GFAP	5'cagaagctccaagatgaaaccaa	5'tctcctcctccagcgactcaac	NM_017009
GAPDH/G3PDH	5'-ggcagccagaaacatca	5'-tgacctgcccacagcct	NM_017008
18S rRNA	5'-gattaagtcctgccccttgta	5'-gatccgagggcctcactaaac	V01270
β -actin	5'-ccctggctcctagcaccat	5'-tagagccaccaatccacacag	NM_031144
GluR1	5'-cgagttctgctacaaatcccg	5'-tgtccgtatggctcattgatg	NM_031608
GluR2	5'-ccaaggactcgggaagtaagg	5'-ccccgacaaggatgtagaa	NM_017261
ADAR2	5'-cttaccagctacaaagagataaagga	5'-ccagattgcggtttcttaaca	NM_012894.1
EAAC1	5'-ggttcaagccctaaagcagaa	5'-aggagcttgacctgatgt	NM013032
GLAST	5'-catccaggccaacgaaca	5'-gagctccatggcctctgaca	NM019225
GLT-1	5'-aaccgaggggtccaaca	5'-tgaggtggctgtcgtgcat	NM017215
γ -enolase	5'tgaaggctgtggaccacatc	5'cacagagaggcctgagctgat	NM_139325

Tabla 1: Secuencias de los cebadores utilizados en este estudio así como su número de acceso en *GeneBank*.

Como marcador de fluorescencia en los ensayos de PCR en tiempo real se utilizó *SYBR® Green PCR Master Mix* y la amplificación se realizó en el termociclador *Abi Prism 7000*. Antes de realizar los ensayos se determinó la eficiencia para cada pareja de cebadores con cantidades crecientes de una muestra de ADNc. La eficiencia se calcula representando los valores de ciclo umbral (Ct: *cycle threshold*) frente al logaritmo de las concentraciones de ADNc utilizadas, siendo el valor Ct el número del ciclo en el que la señal fluorescente cruza el umbral. Esto da una recta cuya pendiente se utiliza en el cálculo de la eficiencia mediante la ecuación:

$$\text{Eficiencia} = (10^{-1/\text{pendiente} - 1}) \times 100$$

Solo se utilizaron las parejas de cebadores cuya eficiencia fue superior al 90%.

En los ensayos de PCR en tiempo real se utilizaron las siguientes condiciones:

1. 50°C durante 2 minutos (activación de la Taq polimerasa).
2. 95°C durante 10 minutos (desnaturalización del ADN).
3. 40 ciclos de 15 minutos a 95°C y 1 minuto a 60°C (desnaturalización, elongación e hibridación).
4. 15 segundos a 95°C, 20 segundos a 60°C y 15 segundos a 95°C (curva de disociación para comprobar que los cebadores son específicos del fragmento que se desea amplificar).

Los incrementos en fluorescencia producidos durante el proceso de amplificación se analizaron con el programa *Sequence Detector*. Como genes de referencia se ensayaron tres genes *housekeeping*: gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), subunidad 18S del ARN ribosómico y β -actina. Para cada uno de ellos se obtuvo el coeficiente de variación, calculado como la desviación estándar de las desviaciones estándar de las Cts dividida por la media de las desviaciones estándar de las Cts (Banda et al., 2008; Silver et al., 2006). La normalización se realizó con el gen que obtuvo el coeficiente de variación más estable en nuestras condiciones experimentales, que fue GAPDH.

Los resultados se compararon por el “método del $\Delta\Delta C_t$ ” (Pfaffl 2001). De este modo, los niveles de ARNm de cada gen, normalizados frente a GAPDH se expresaron como $2^{-\Delta C_t}$, mientras que el cambio relativo como consecuencia de la I/R en los niveles de ARNm de los genes estudiados frente a los de los animales *sham* se expresó como $2^{-\Delta\Delta C_t}$ siendo

$\Delta Ct = (Ct_{gen} - Ct_{GAPDH})$

$\Delta\Delta Ct = (Ct_{gen} - Ct_{GAPDH})_{\text{animales isquémicos}} - (Ct_{gen} - Ct_{GAPDH})_{\text{animales sham}}$ (Livak y Schmittgen 2001).

ENSAYOS DE WESTERN BLOT

La proteína total también se extrajo utilizando el reactivo *Tripure*, siguiendo las recomendaciones del fabricante. Para la cuantificación de las proteínas extraídas se realizó una recta patrón de proteína con concentraciones crecientes de albúmina sérica bovina y se utilizó el kit *DC Protein Assay*, cuya reacción es similar al ensayo de Lowry (Lowry et al., 1951). Tras varias pruebas con distintas cantidades de proteína, los ensayos se realizaron cargando 30 μg de proteína por pocillo en geles de poliacrilamida al 10%. La electroforesis (SDS-PAGE) se realizó a 100 V durante 90 minutos, tras lo cual las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa mediante transferencia húmeda a 75 V durante 120 minutos, refrigerando la cubeta con hielo picado. Tras la transferencia de proteínas, las membranas se incubaron a temperatura ambiente durante 1 hora en tampón tris salino (TBS) conteniendo el detergente Tween-20 al 0,2% (TBS-T) y 5% de leche desnatada, para bloquear la fijación inespecífica de anticuerpos. A continuación, las membranas se incubaron a 4°C durante toda la noche con los anticuerpos primarios señalados en la tabla 2, diluidos en una solución de leche desnatada al 2,5% en TBS-T.

Anticuerpo	Dilución utilizada	Peso molecular de la proteína
Anticuerpo de cabra anti-NR1	1/200	~115 kDa
Anticuerpo de conejo anti-NR2A	1/1000	~165 kDa
Anticuerpo de ratón anti-NR2B	1/800	~170 kDa
Anticuerpo de conejo anti-GluR1	1/1000	~110 kDa
Anticuerpo de cabra anti-GluR2	1/500	~110 kDa
Anticuerpo de ratón anti- β -actina	1/5000	~42 kDa

Tabla 2: Anticuerpos primarios utilizados en los ensayos de *Western blot*, incluyendo la dilución utilizada para cada uno de ellos y el peso molecular de la proteína que identifican.

Tras una noche de incubación se realizaron tres lavados de 5 minutos cada uno en TBS-T, las membranas se incubaron durante 90 minutos con los correspondientes anticuerpos secundarios (cabra anti-conejo, cabra anti-ratón y burro anti-cabra/oveja) conjugados con peroxidasa, que se encontraban diluidos (1/3000) en una solución de leche desnatada al 2,5% en TBS-T.

Tras tres lavados de 5 minutos cada uno en TBS-T, las membranas de nitrocelulosa se aclararon en TBS durante 5 minutos y se incubaron con el sustrato *Chemiluminescent HRP*, en presencia de luz ambiente, durante 5 minutos y en agitación. La exposición y revelado de las membranas se realizó en oscuridad. Las membranas, yuxtapuestas con láminas de fotografía en un chasis apropiado durante un tiempo de 1–5 minutos (dependiendo del anticuerpo) se revelaron en revelador D-19 durante 2 minutos a 25°C y agitación; la reacción se detuvo por inmersión de las láminas en una solución de ácido acético al 2% y, finalmente, se procedió a la inmersión de las mismas en solución fijadora durante 5 minutos seguido de un abundante aclarado en agua corriente.

ENSAYOS DE INMUNOCITOQUÍMICA

Los ensayos de inmunocitoquímica se realizaron por el sistema de secciones libres flotantes utilizando secciones de 40 μ m obtenidas mediante

micrótomo de congelación. Tras tres lavados en PBS se procedió a inhibir las peroxidasas endógenas mediante una incubación de 20 minutos en una solución de H₂O₂ al 3% y metanol al 3% en PBS, pH 7,4 a temperatura ambiente. Tras tres lavados de 5 minutos en agitación con PBS, las secciones se incubaron durante 30 minutos con avidina diluida en PBS para bloquear las biotinas endógenas. Seguidamente, y tras un aclarado en PBS para eliminar el exceso de avidina, se bloquearon los sitios de unión libres de la avidina mediante la incubación de las secciones en biotina diluida en PBS durante otros 30 minutos. La unión inespecífica del anticuerpo secundario se bloqueó incubando las secciones durante 60 minutos en una solución de Tritón X-100 al 0,2% y suero de cabra al 20% en PBS, pH 7,4 a temperatura ambiente. El inmunomarcado se realizó diluyendo en solución de incubación (PBS + Triton X-100 al 0,2% + suero de cabra al 2%) los siguientes anticuerpos primarios:

- Anticuerpo monoclonal de ratón frente a núcleos neuronales (NeuN) (1/1000)
- Anticuerpo monoclonal de ratón frente a CD11b (1/1000)

La incubación con el anticuerpo primario se realizó a 4°C en agitación durante toda la noche. Pasado el tiempo de incubación las secciones se lavaron en PBS (3 lavados de 5 minutos cada uno en agitación) y se incubaron durante 60 minutos con sus correspondientes anticuerpos secundarios diluidos en solución de incubación. Como anticuerpo secundario se utilizó un cabra anti-ratón biotinilado a una dilución 1/500. Tras los lavados, las secciones se incubaron durante 90 minutos en extravidina conjugada con peroxidasa de rábano picante (HRP) a una dilución 1/2000. Finalmente, y después de lavar el

exceso de extravidina, la peroxidasa se hizo reaccionar con una solución de tetrahidrocloruro de 3,3'-diaminobenzidina (DAB) al 0,05%, sulfato amónico de níquel al 0,03% y peróxido de hidrógeno al 0,01% en PBS, pH 7,4 a temperatura ambiente. En esta reacción se produce la reducción del H₂O₂, el sustrato de la peroxidasa, actuando como donante de electrones el DAB, que forma un precipitado de color marrón que es estabilizado por las sales de níquel para intensificar la reacción. La peroxidasa se dejó reaccionar con su sustrato durante 3 minutos, tras lo cual se paró la reacción aclarando las secciones en PBS (3 lavados de 5 minutos cada uno). Estas secciones se montaron sobre portaobjetos gelatinizados y se dejaron secar en una estufa a 37°C durante 2 horas. A continuación, fueron deshidratados en un gradiente creciente de etanol, aclarados en xilol y, finalmente, se montaron en medio de montaje Entellan. La especificidad de la reacción fue controlada mediante la ausencia del anticuerpo primario en varias secciones de tejido.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados están expresados como la media \pm error estándar de la media (SEM) de los niveles de ARNm de cada uno de los genes estudiados normalizados con respecto al gen de referencia (GAPDH) y, en algunos casos, normalizados a su vez con los valores de los animales *sham*. Nuestros datos se ajustan a una distribución normal según el test de *Kurtosis* estandarizado. Las diferencias referentes al efecto de la edad o de la I/R se analizaron mediante el test *t de Student* de datos no pareados y doble cola. El nivel de significación mínima se fijó en un 95% de confianza. Para el análisis estadístico se utilizó el programa *Graph Pad Prism 4*.

RESULTADOS

RESULTADOS

EFECTO DE LA EDAD

En este apartado se muestran de forma comparativa los datos de los dos grupos de edad estudiados para valorar el efecto de la edad en la expresión de una serie de genes del sistema glutamatérgico en el hipocampo y la corteza cerebral. La expresión se ha valorado midiendo los niveles de ARNm de los distintos genes, que incluyen las subunidades de los receptores de NMDA y AMPA, así como los transportadores GLT-1, GLAST y EAAC1. Los resultados obtenidos se presentan normalizados con respecto a los niveles de ARNm del gen *housekeeping* GAPDH. En el caso de los receptores de NMDA y AMPA se ha cuantificado también la expresión de proteína de los diferentes genes mediante la técnica de *Western blot*. En el estudio se valoró el efecto de la edad tanto en animales sometidos a isquemia como en animales *sham*. Conviene señalar que en nuestros datos preliminares no se observaron diferencias significativas en los niveles de ARNm de animales *sham* y animales *naïve*. También se incluye en este apartado el efecto de la edad en los marcadores de niveles de inflamación y la γ -enolasa.

SUBUNIDADES DEL RECEPTOR DE NMDA

La Figura 10 muestra los resultados de los ARNm normalizados de las subunidades NR1, NR2A y NR2B del receptor de NMDA. Se observa que en la mayoría de las estructuras cerebrales estudiadas, los niveles de ARNm de la mayor parte de las subunidades son más altos en los animales *sham* de 18 meses que en los animales *sham* de 3 meses.

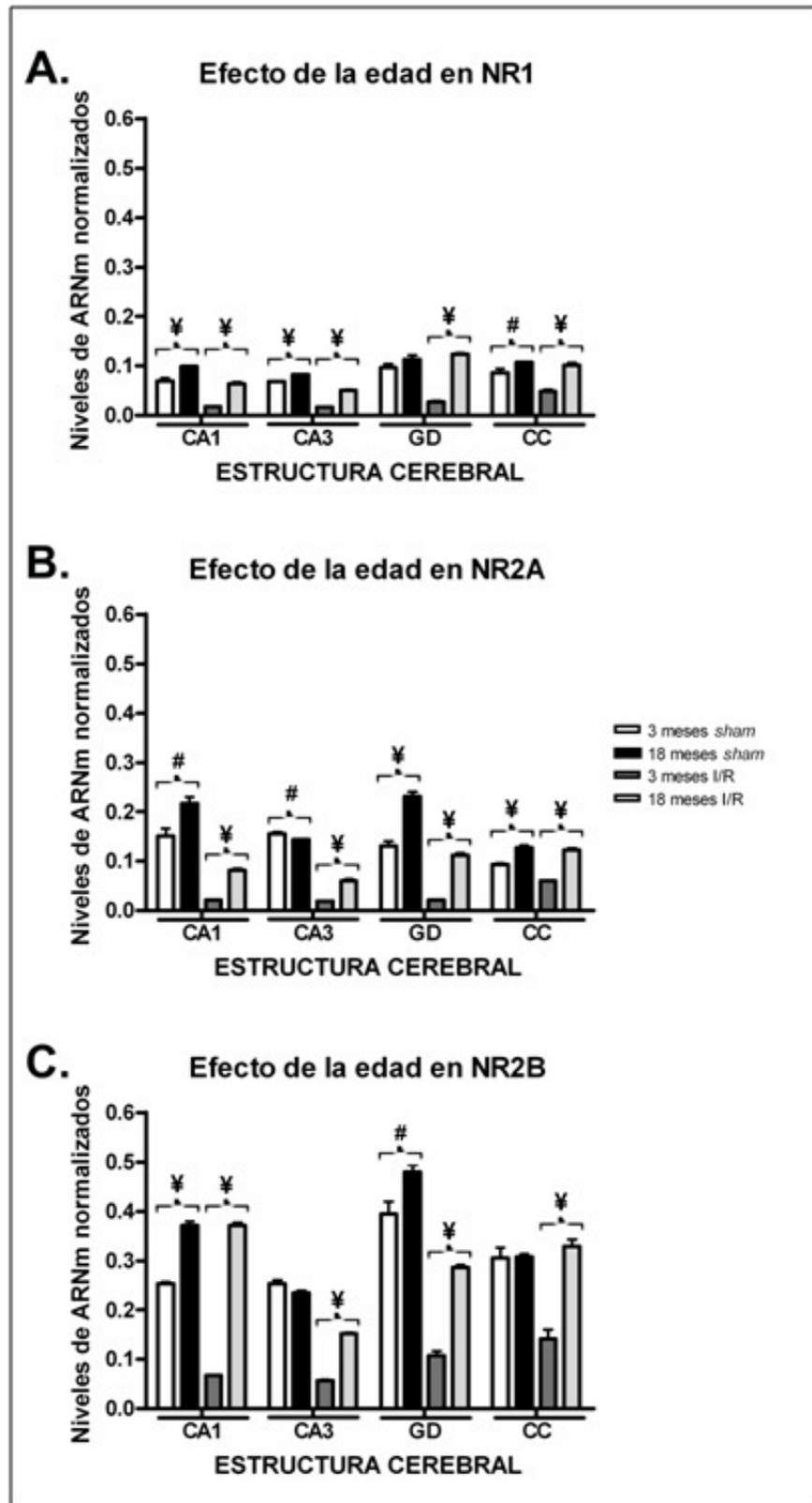


Figura 10: Efecto de la edad en los niveles de ARNm de las subunidades NR1 (A), NR2A (B) y NR2B (C) del receptor de NMDA, normalizados con respecto a los niveles de ARNm del gen *housekeeping* GAPDH ($2^{-\Delta Ct}$). Existen diferencias significativas (# $p < 0,05$; ¥ $p < 0,01$) entre los dos grupos de edad, tanto en los animales sham como en los isquémicos (I/R), en todas las estructuras estudiadas: CA1, CA3, giro dentado (GD) y corteza cerebral (CC). Test *t* de Student de datos no pareados y doble cola ($n=5$).

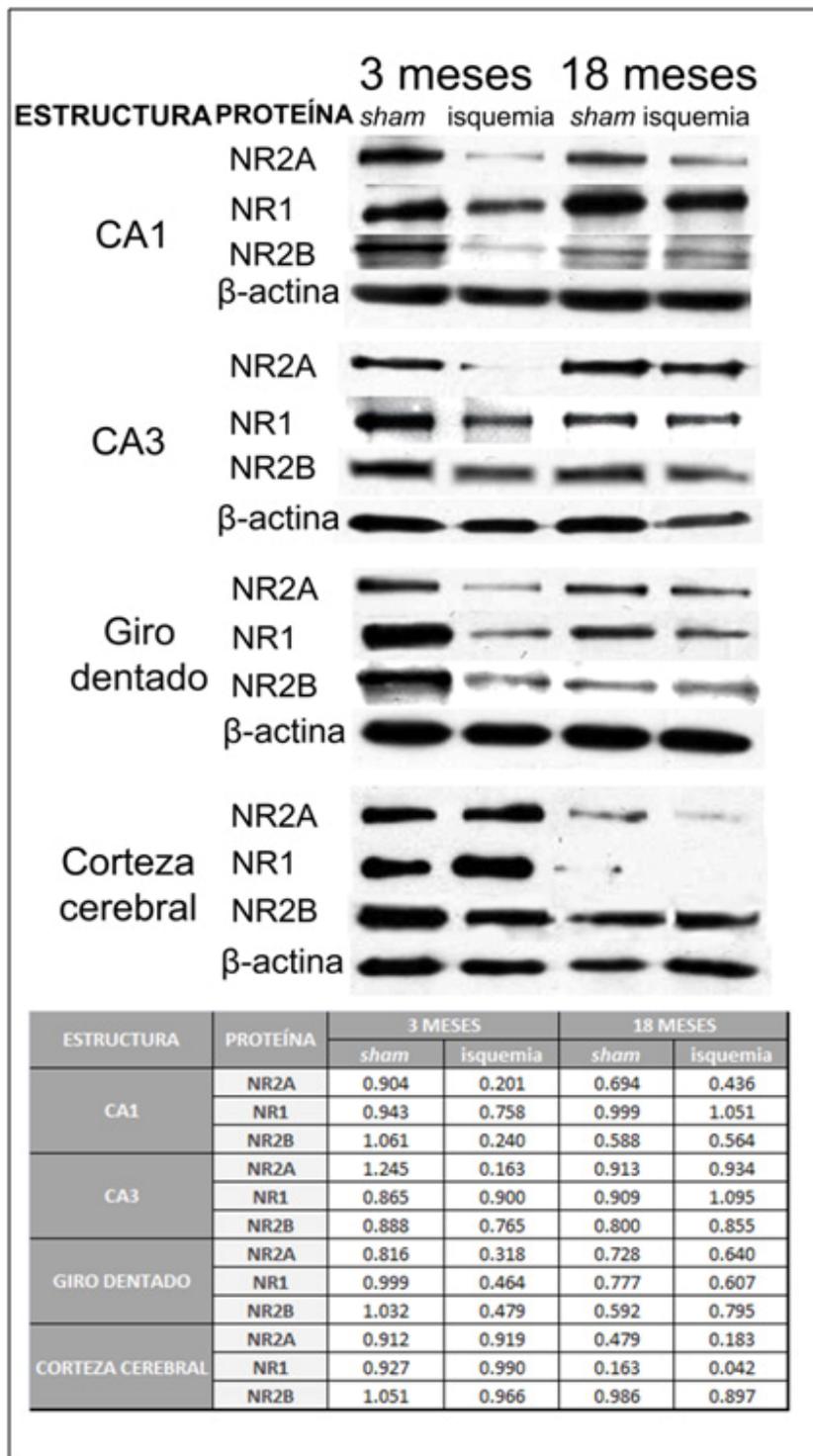


Figura 11: Resultados de Western blot del receptor de NMDA. En la tabla se muestra el valor de densidad óptica de cada una de las subunidades NR2A, NR1 y NR2B normalizado frente al valor de densidad óptica de la β -actina.

Los ensayos de *Western blot* (Figura 11) muestran niveles de proteína similares o más bajos en los animales *sham* de 18 meses que en los animales *sham* de 3 meses en todas las estructuras estudiadas. En la corteza cerebral, destaca la baja expresión de las subunidades NR1 y NR2A en los animales *sham* de 18 meses.

La Figura 10 también muestra el efecto de la edad en los niveles de ARNm de las subunidades estudiadas de los animales sometidos a I/R. En este caso se puede observar que, en todas las estructuras, los genes estudiados presentaron niveles más altos de ARNm en los animales de 18 meses que en los animales de 3 meses. En general, también se observa que los niveles de proteína de los animales de 18 meses son más altos que los de los animales de 3 meses (Figura 11).

SUBUNIDADES DEL RECEPTOR DE AMPA Y ADAR2

La Figura 12 muestra, en los dos grupos de edad, los niveles de ARNm de las subunidades GluR1 y GluR2 del receptor de AMPA, así como de la enzima ADAR2 (responsable de la edición de GluR2). Se observan diferencias en la expresión de los genes GluR1 y GluR2. Así, los niveles de ARNm de la subunidad GluR1 en los animales *sham* de 18 meses son más altos que los observados en los animales *sham* de 3 meses en la región hipocampal CA1 ($p < 0,01$), mientras que en la corteza cerebral estos niveles son menores en los animales de 18 meses ($p < 0,05$) permaneciendo invariables en el resto de estructuras estudiadas. En contraste, los niveles de ARNm de la subunidad GluR2 son menores en los animales *sham* de 18 meses en todas las estructuras estudiadas salvo en CA1, donde estos niveles son similares a los

detectados en los animales *sham* de 3 meses. Los niveles de ARNm de ADAR2 fueron mayores en los animales *sham* de 18 meses en todas las estructuras estudiadas, con la excepción de giro dentado, donde no se encontraron diferencias significativas entre los animales *sham* de 3 y de 18 meses de edad. Los ensayos de *Western blot* (Figura 13) muestran niveles de GluR1 similares, entre los animales *sham* de 3 y 18 meses, tanto en corteza cerebral como en hipocampo, y niveles de GluR2 similares entre los dos grupos de edad en CA1, pero más bajos en CA3, giro dentado y corteza cerebral.

En la Figura 12 se muestran también los niveles de ARNm en los animales sometidos a I/R. Para la subunidad GluR1 se observan niveles de ARNm más altos en los animales de 18 meses en todas las áreas hipocampales, pero no se detectaron cambios significativos asociados a la edad en el caso de la corteza cerebral. En contraste, los niveles de ARNm de la subunidad GluR2 son significativamente más altos en los animales de 18 meses que en los de 3 meses en todas las áreas estudiadas. Los niveles de ARNm de la enzima ADAR2 son significativamente más altos en CA3 y corteza cerebral en los animales de 18 meses con respecto a los de 3 meses. En el resto de las estructuras no se observaron diferencias significativas entre ambos grupos de edad. Los ensayos de *Western blot* (Figura 13) muestran niveles de GluR1 más altos en el hipocampo de los animales de 18 meses sometidos a I/R y niveles similares a los de los animales de 3 meses en la corteza cerebral. Los niveles de GluR2 aparecen más altos en la corteza cerebral de los animales de 18 meses que en la de los animales de 3 meses, pero ambos grupos presentan niveles similares en el hipocampo.

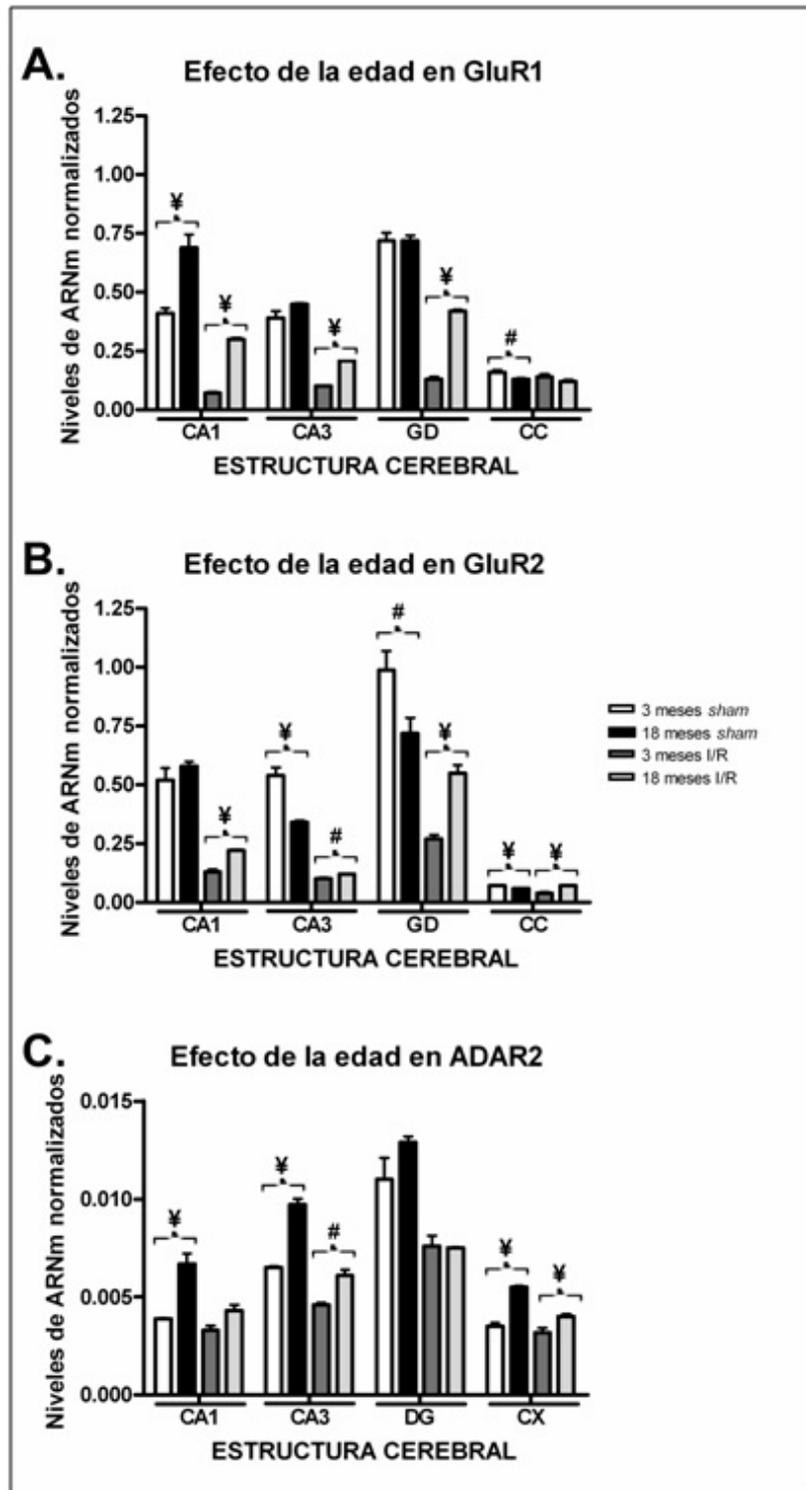


Figura 12: Efecto de la edad en los niveles de ARNm de las subunidades GluR1 (A) y GluR2 (B) del receptor de AMPA, así como de la enzima ADAR2 (C), normalizados con respecto a los niveles de ARNm del gen *housekeeping* GAPDH ($2^{-\Delta C_t}$). Existen diferencias significativas (# $p < 0,05$; ¥ $p < 0,01$) entre los dos grupos de edad, tanto en los animales *sham* como en los isquémicos (I/R), en todas las estructuras estudiadas: CA1, CA3, giro dentado (GD) y corteza cerebral (CC). Test *t* de Student de datos no pareados y doble cola ($n=5$).

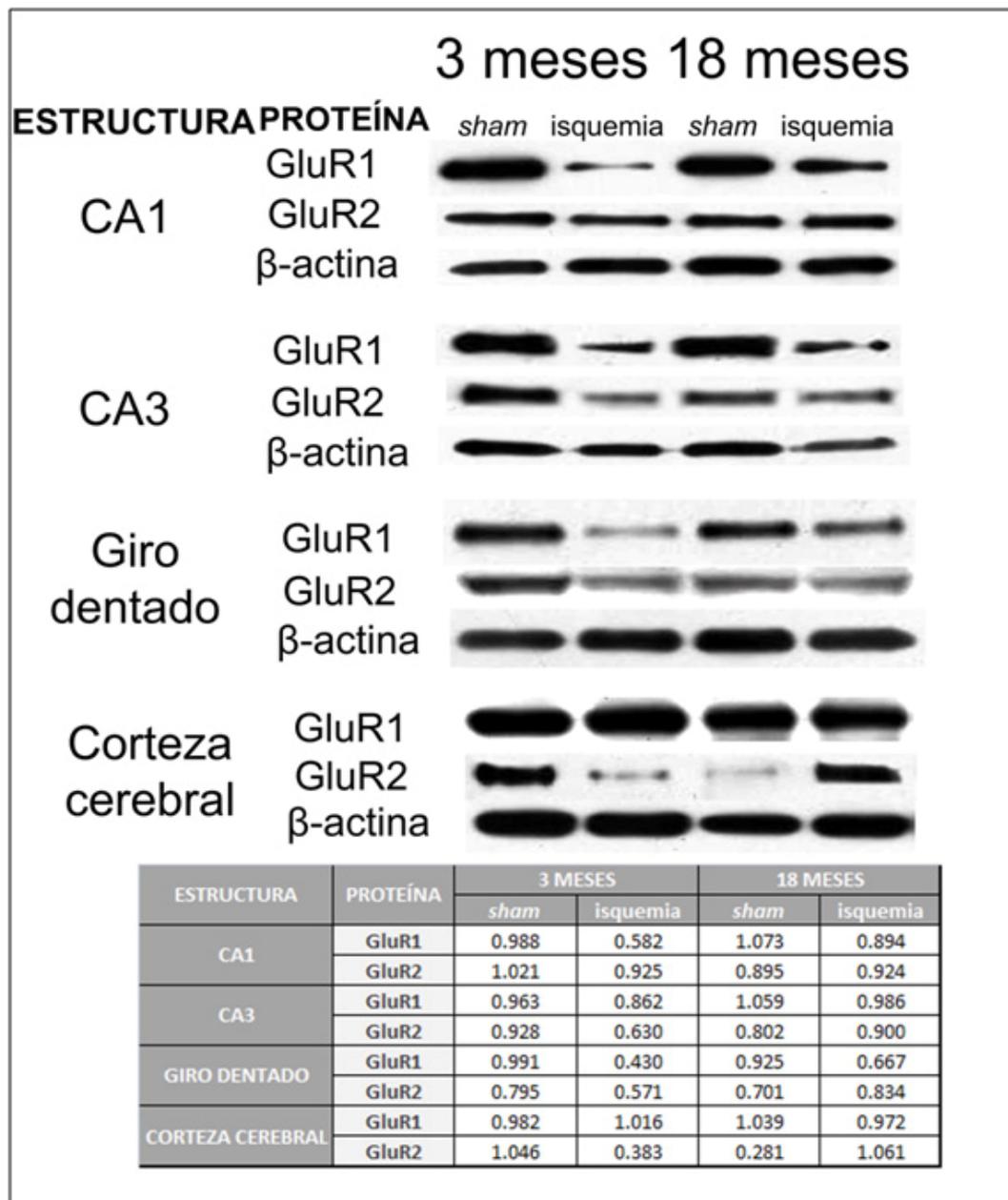


Figura 13: Resultados de Western blot del receptor de AMPA. En la tabla se muestra el valor de densidad óptica de las subunidades GluR1 y GluR2 normalizado frente al valor de densidad óptica de la β -actina.

Adicionalmente, se estudio el ratio GluR1/GluR2, cuyos resultados se muestran en la Tabla 3. En el caso de los animales *sham* podemos apreciar como el ratio se incrementa con la edad en todas las áreas hipocampales, mientras que en la corteza cerebral este ratio no se modifica con la edad en los animales *sham* y se reduce en los animales de 18 meses sometidos a I/R.

Estructura	Ratio GluR1/GluR2			
	<i>sham</i>		Isquemia	
	3 meses	18 meses	3 meses	18 meses
CA1	0,792	1,176	0,584	1,372
CA3	0,725	1,338	1,021	1,721
giro dentado	0,724	1,002	0,486	0,763
corteza cerebral	1,316	1,321	2,895	0,986

Tabla 3: Ratio de las subunidades GluR1/GluR2, utilizado como medida indirecta de las modificaciones en la permeabilidad al Ca^{2+} del receptor de AMPA.

TRANSPORTADORES DE GLUTAMATO

Cuando se compararon los niveles de ARNm de cada uno de los transportadores estudiados entre los animales *sham* de los dos grupos de edad, se observó como los animales de 18 meses presentaban niveles similares o ligeramente menores que los detectados en los animales de 3 meses en la mayoría de las estructuras estudiadas (Figura 14).

En el caso de los animales sometidos a I/R, los niveles de ARNm de los distintos transportadores varían dependiendo de la edad o la estructura estudiada. Así, en la Figura 14 puede observarse que los animales de 18 meses presentan niveles más altos de ARNm para el transportador GLT-1 en giro dentado y corteza cerebral, y para el transportador EAAC1 en CA1 y giro dentado. Se observan niveles de ARNm similares en los dos grupos de edad para GLT-1 en CA1 y CA3, para GLAST en CA1 y para EAAC1 en CA3. En el

resto de las estructuras aparecen niveles más altos de ARNm para GLAST y EAAC1 en los animales de 3 meses.

MARCADORES DE INFLAMACIÓN Y γ -ENOLASA

La Figura 15 muestra que los niveles de ARNm de los marcadores de inflamación CD11b y GFAP son más altos en los animales *sham* de 18 meses que en los de 3 meses. Se presenta cierta variabilidad dependiendo del marcador utilizado, por ejemplo, GFAP no muestra diferencias significativas en CA3 mientras que CD11b no muestra diferencias significativas en giro dentado y en corteza cerebral. El efecto de la edad en la γ -enolasa depende de la estructura, como se muestran en la Figura 15. Los niveles de ARNm de esta enzima en giro dentado y corteza cerebral fueron mayores en los animales de 18 meses que en los de 3 meses, pero ambos grupos de edad presentaron niveles similares en las áreas hipocampales CA1 y CA3.

En el caso de los animales sometidos a I/R, se observó que los niveles de ARNm de los marcadores de inflamación son más bajos en los animales de 18 meses que en los de 3 meses, con la única excepción de GFAP en CA1 donde no se observaron cambios significativos. Los niveles de ARNm de la γ -enolasa en los animales isquémicos fueron mayores en los animales de 18 meses que en los de 3 meses en todas las estructuras estudiadas, con la excepción de CA1, donde no se detectaron diferencias.

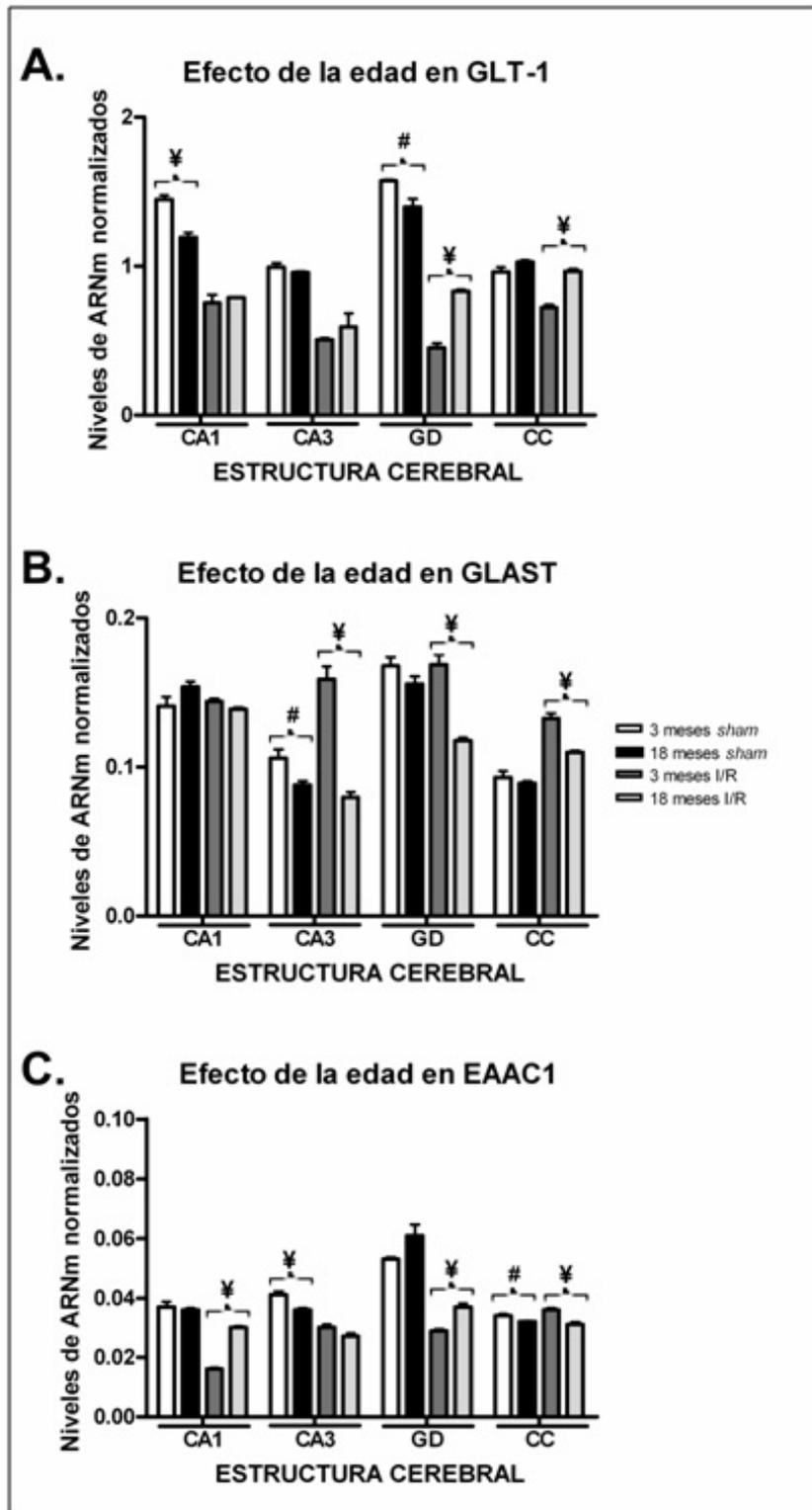


Figura 14: Efecto de la edad en los niveles de ARNm de los transportadores de membrana GLT-1 (A), GLAST (B) y EAAC1 (C), normalizados con respecto a los niveles de ARNm del gen *housekeeping* GAPDH ($2^{-\Delta Ct}$). Nótese la diferencia en el orden de magnitud de los niveles de ARNm entre los tres transportadores. Existen diferencias significativas (# $p < 0,05$; ¥ $p < 0,01$) entre los dos grupos de edad, tanto en los animales *sham* como en los isquémicos (I/R), en la mayoría de las estructuras estudiadas: CA1, CA3, giro dentado (GD) y corteza cerebral (CC). Test *t de Student* de datos no pareados y doble cola ($n=5$).

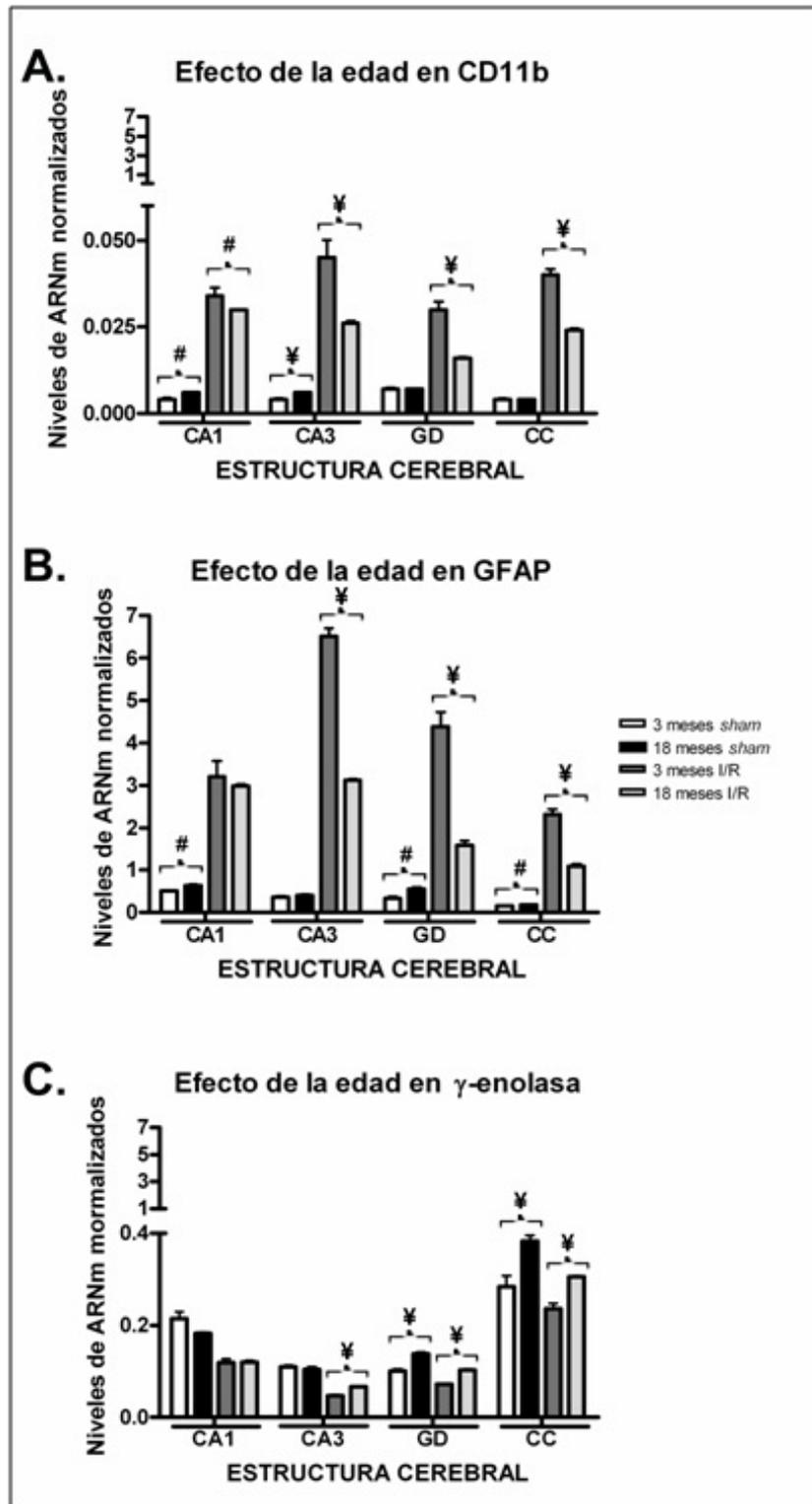


Figura 15: Efecto de la edad en los niveles de ARNm de los marcadores de inflamación CD11b (A) y GFAP (B), y de la γ -enolasa (C), normalizados con respecto a los niveles de ARNm del gen *housekeeping* GAPDH ($2^{-\Delta Ct}$). Nótese el gran aumento en los niveles de ARNm del marcador de inflamación GFAP tras la isquemia. Existen diferencias significativas (# $p < 0,05$; ¥ $p < 0,01$) entre los dos grupos de edad, tanto en los animales *sham* como en los isquémicos (I/R), en la mayoría de las estructuras estudiadas: CA1, CA3, giro dentado (GD) y corteza cerebral (CC). Test *t* de Student de datos no pareados y doble cola ($n=5$).

EFECTO DE LA ISQUEMIA REPERFUSIÓN (I/R)

Para estudiar el efecto de la isquemia, los niveles de ARNm de cada gen normalizados con respecto a los niveles de ARNm de GAPDH del mismo animal ($2^{-\Delta Ct}$) fueron, a su vez, normalizados con los niveles ($2^{-\Delta Ct}$) de los respectivos animales *sham* ($2^{-\Delta\Delta Ct}$). Este estudio se realizó en los animales de 3 y 18 meses para comparar la respuesta dependiente de la edad. En las figuras 16-19 se representa el cambio relativo (*Fold change*) en los niveles de ARNm que sufren los animales sometidos a I/R con respecto a los animales *sham* en cada una de las estructuras estudiadas.

SUBUNIDADES DEL RECEPTOR DE NMDA

La Figura 16 muestra la respuesta a la I/R de ambos grupos de edad. Se observó un descenso significativo en la transcripción de todas las subunidades del receptor de NMDA en todas las estructuras estudiadas en los animales de 3 meses. En los animales de 18 meses el descenso fue menos acusado e incluso, no se detectaron cambios significativos en la respuesta a la I/R en los niveles de ARNm de algunas subunidades en estructuras como giro dentado y corteza cerebral (Figura 16). Los niveles de proteína (Figura 11) fueron similares a los observados para el ARNm en los animales de 3 meses, con descensos acusados en los niveles de proteína en los animales isquémicos. En los animales de 18 meses, los descensos no fueron tan evidentes y en algún caso no se correspondieron con los niveles de ARNm.

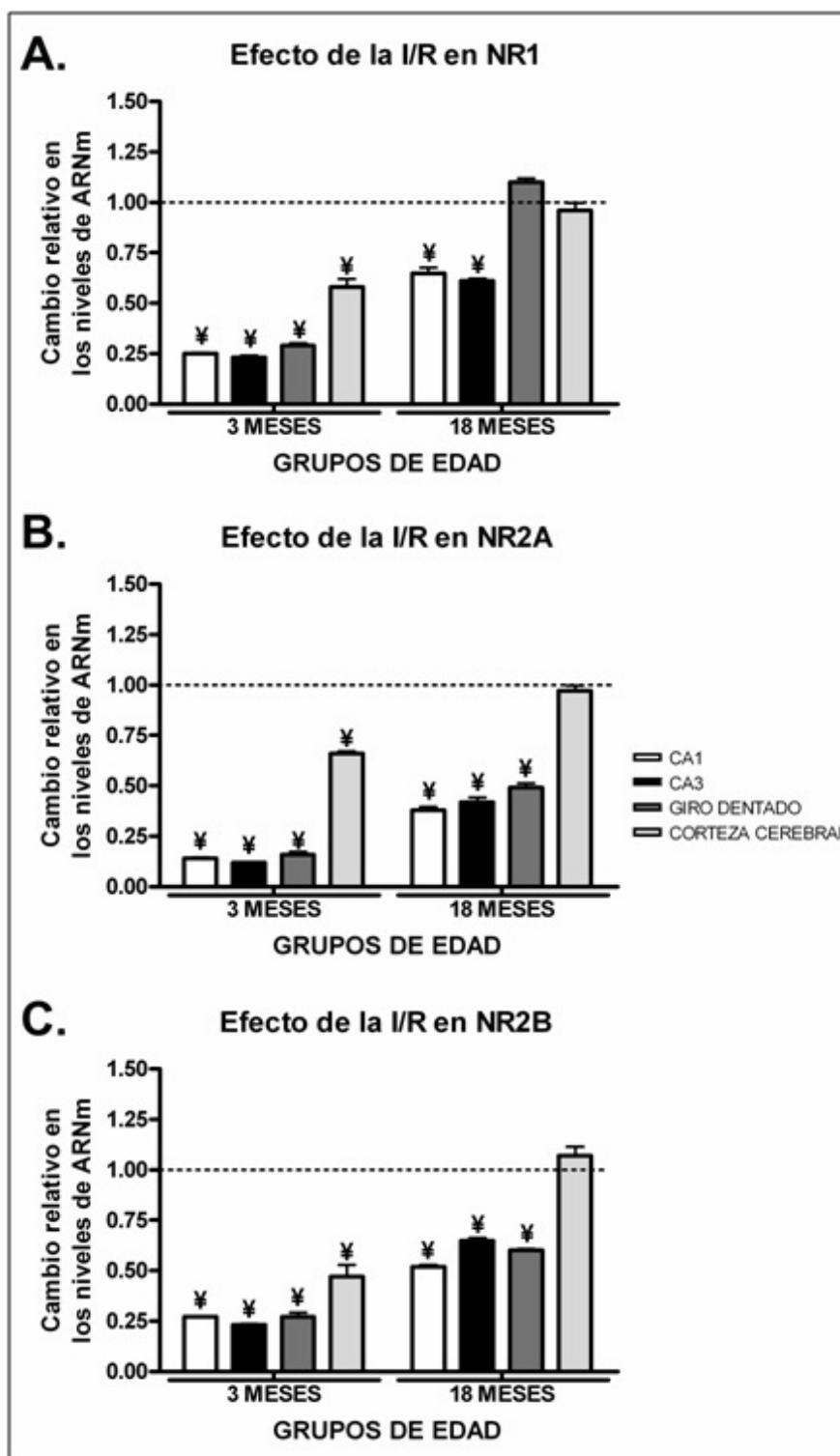


Figura 16: Efecto de la isquemia-reperfusión (I/R). Cambio relativo ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) en los niveles de ARNm (normalizados con GAPDH) de las subunidades NR1 (A), NR2A (B) y NR2B (C) del receptor de NMDA entre los animales *sham* (línea de puntos) y los animales isquémicos. Como consecuencia de la I/R, los animales sufren un descenso significativo ($\text{¥ } p < 0,01$) en los niveles de ARNm de estas subunidades, en los dos grupos de edad y en la mayoría de las estructuras estudiadas. Test *t* de Student de datos no pareados y doble cola ($n=5$).

SUBUNIDADES DEL RECEPTOR DE AMPA Y ADAR2

En la Figura 17 se puede observar que, tanto en los animales de 3 meses como de 18 meses, la transcripción de los genes GluR1 y GluR2 desciende significativamente como consecuencia del daño isquémico en la mayoría de las estructuras estudiadas, aunque los descensos fueron más acusados en los animales de 3 meses que en los de 18 meses. Sorprendentemente, se observó un mayor descenso en los animales de 18 meses cuando se valoró la transcripción del ARNm de la enzima ADAR2. De hecho, en algunas estructuras de animales jóvenes no se observaron diferencias en los niveles de transcripción de esta enzima entre animales sometidos a I/R y sus correspondientes animales *sham*. En el caso de los niveles de proteína (Figura 13) de las subunidades GluR1 y GluR2, los descensos observados se correlacionaron con los observados para el ARNm en la mayoría de las estructuras estudiadas.

Por otro lado, los resultados del ratio GluR1/GluR2 (Tabla 3) en los animales de 3 meses muestran incrementos en dicho ratio en los animales sometidos a I/R con respecto a los animales *sham* en CA3 y corteza cerebral, mientras que en CA1 y giro dentado aparecen descensos en dicho ratio como consecuencia de la I/R. En los animales de 18 meses, los resultados son diferentes, ya que la isquemia provoca incrementos en el ratio GluR1/GluR2 en CA1 y CA3, ocasionando descensos en giro dentado y corteza cerebral.

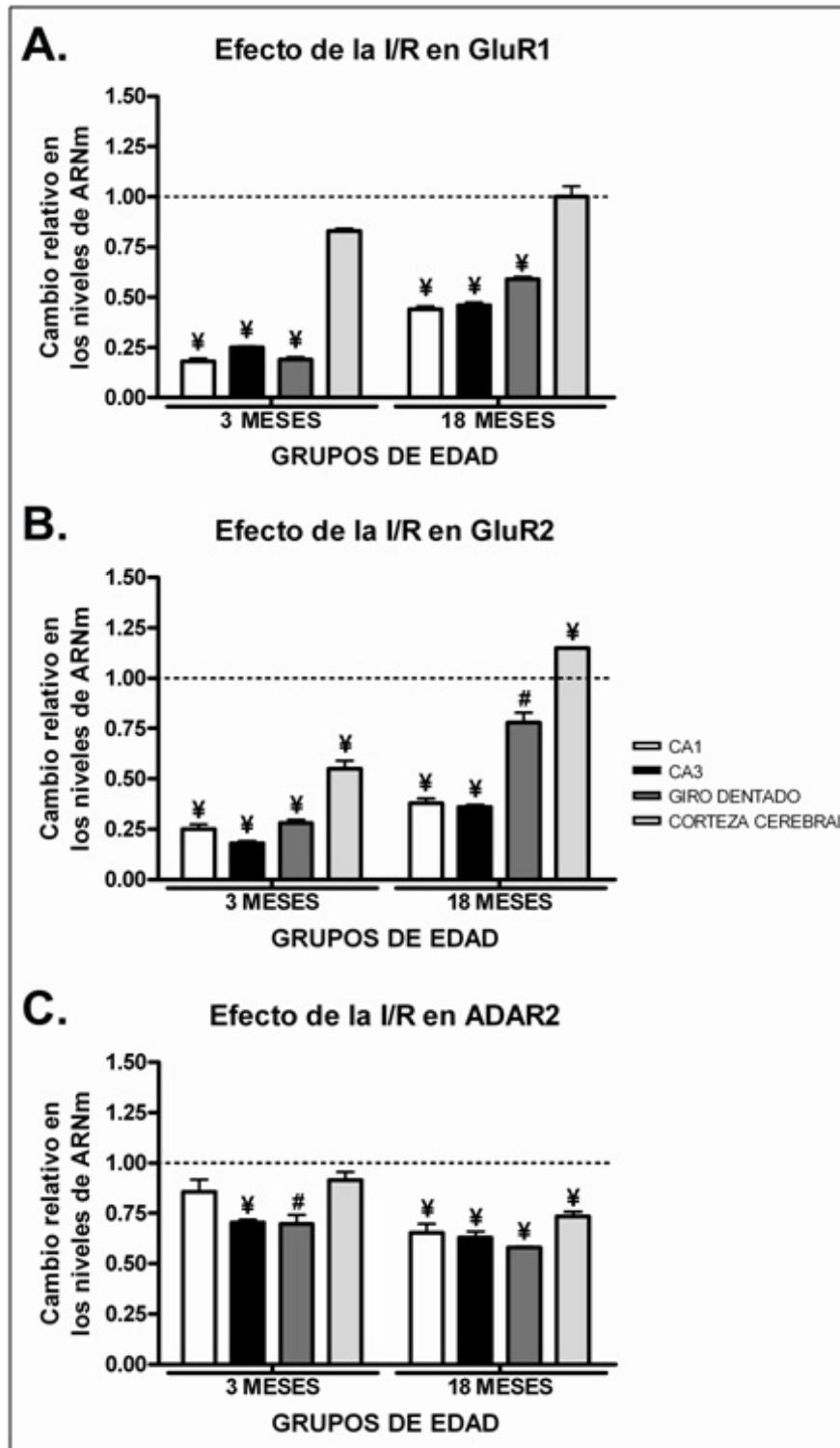


Figura 17: Efecto de la isquemia-reperfusión (I/R). Cambio relativo ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) en los niveles de ARNm (normalizados con GAPDH) de las subunidades GluR1 (A) y GluR2 (B) del receptor de AMPA, así como de la enzima ADAR2 (C), entre los animales *sham* (línea de puntos) y los animales isquémicos. Como consecuencia de la I/R, los animales sufren un descenso significativo (# $p < 0,05$; ¥ $p < 0,01$) en los niveles de ARNm de las subunidades y de la enzima ADAR2, en los dos grupos de edad y en la mayoría de las estructuras estudiadas. Test *t de Student* de datos no pareados y doble cola ($n=5$).

TRANSPORTADORES DE GLUTAMATO

El efecto de la I/R sobre la transcripción de los genes de EAATs se muestra en la Figura 18. En los animales de 3 meses se observa que la I/R induce un descenso significativo ($p < 0,01$) en la transcripción del gen GLT-1 en todas las estructuras estudiadas. La transcripción de EAAC1 desciende en el hipocampo, pero en la corteza cerebral se observa un incremento significativo ($p < 0,05$). Tras la I/R, no se observaron cambios en la transcripción en el caso del transportador glial GLAST en CA1 y giro dentado, pero se observó un incremento significativo en CA3 y corteza cerebral.

En los animales de 18 meses, la I/R dio lugar a una respuesta atenuada con respecto a la observada en los animales de 3 meses, es decir, descensos e incrementos menos acusados y, en muchos casos, una respuesta similar a la observada en los animales *sham*.

MARCADORES DE INFLAMACIÓN Y NEURONALES

La Figura 19 muestra el efecto de la I/R en la transcripción de genes utilizados como marcadores de inflamación (GFAP y CD11b) y de γ -enolasa. En los animales de 3 meses, la I/R indujo incrementos muy significativos en la transcripción de GFAP y CD11b en la totalidad de las estructuras estudiadas. En los animales de 18 meses estos incrementos, a pesar de ser también significativos, no fueron tan acusados.

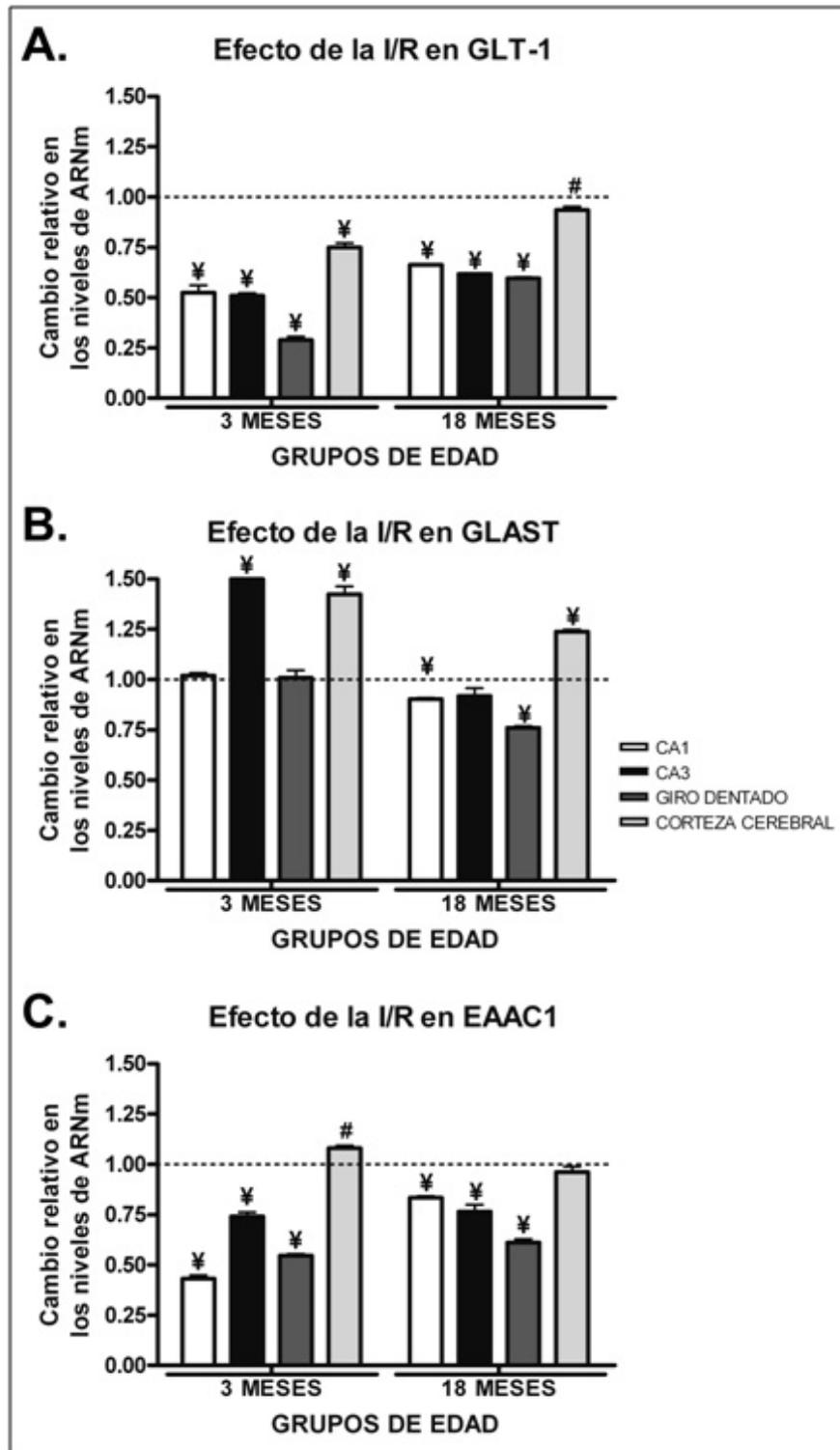


Figura 18: Efecto de la isquemia-reperfusión (I/R). Cambio relativo ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) en los niveles de ARNm (normalizados con GAPDH) de los transportadores de membrana GLT-1 (A), GLAST (B) y EAAC1 (C), entre los animales *sham* (línea de puntos) y los animales isquémicos. Como consecuencia de la I/R, los animales sufren un descenso significativo (# $p < 0,05$; ¥ $p < 0,01$) en los niveles de ARNm de estos transportadores, en los dos grupos de edad y en la mayoría de las estructuras estudiadas. Test *t de Student* de datos no pareados y doble cola ($n=5$).

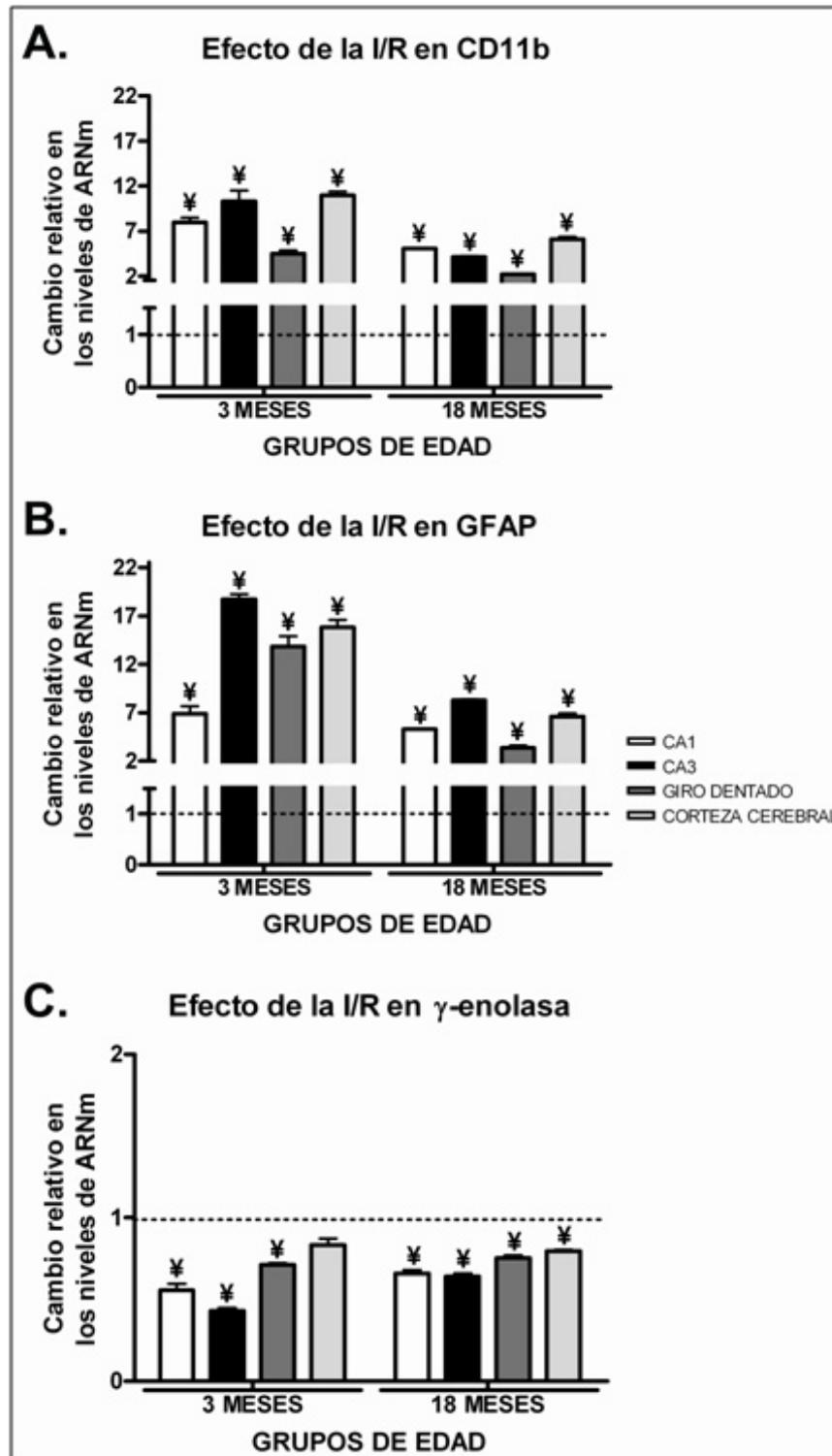


Figura 19: Efecto de la isquemia-reperfusión (I/R). Cambio relativo ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) en los niveles de ARNm (normalizados con GAPDH) de los marcadores de inflamación CD11b (A) y GFAP (B), así como de la enzima γ -enolasa (C), entre los animales *sham* (línea de puntos) y los animales isquémicos. Como consecuencia de la I/R, los animales sufren un aumento muy significativo ($\neq p < 0,01$) en los niveles de ARNm de los marcadores de inflamación, en los dos grupos de edad y en la mayoría de las estructuras estudiadas. Por el contrario, los niveles de ARNm de la γ -enolasa descendieron significativamente ($\neq p < 0,01$) en los animales sometidos a I/R. Test *t de Student* de datos no pareados y doble cola ($n=5$).

Además de los estudios de ARNm, se realizaron ensayos de inmunohistoquímica con el marcador de microglía CD11b (Figura 20). En estos ensayos se observó un incremento los niveles de CD11b tras el proceso isquémico. El incremento es más evidente en los animales jóvenes. Además, los animales *sham* de 18 meses muestran un ligero aumento del marcado con CD11b con respecto al observado en los animales *sham* de 3 meses.

Tras la I/R, la transcripción de la enzima γ -enolasa descendió significativamente en los animales de 3 meses en el hipocampo, pero en la corteza cerebral no se observaron cambios significativos. En los animales de 18 meses se observaron descensos significativos en todas las estructuras, pero curiosamente, los descensos en CA1 y CA3 fueron menores que en los animales de 3 meses. Los ensayos de inmunohistoquímica utilizando como marcador neuronal NeuN (Figura 21) mostraron diferencias en CA1 entre los animales *sham* y los sometidos a I/R, tanto en los animales de 3 como de 18 meses de edad. Estas diferencias son casi indetectables en el caso de la corteza cerebral.

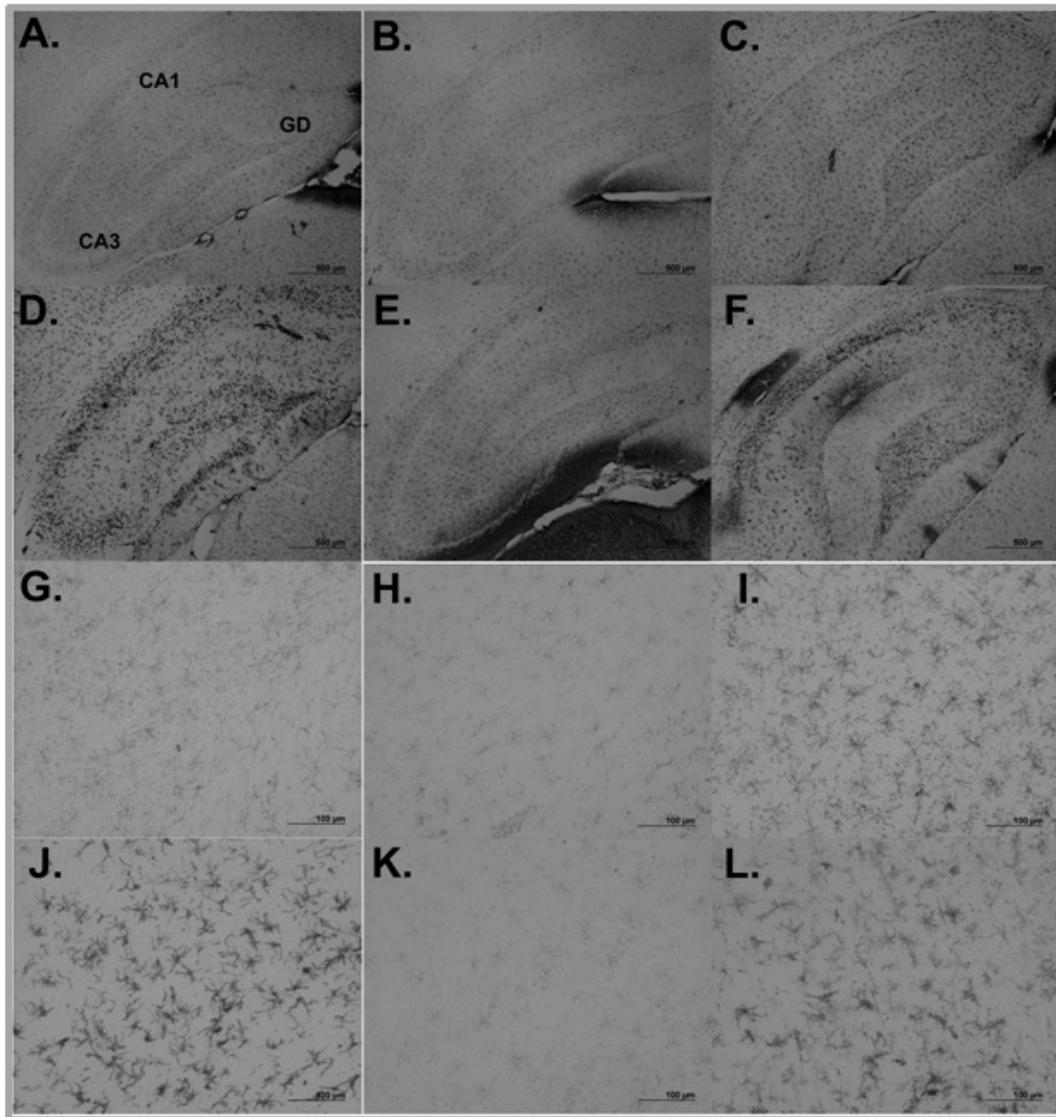


Figura 20: Respuesta inflamatoria. Visualización de la respuesta microglial mediante el marcador CD11b en hipocampo (A-F) y corteza cerebral (G-L) en los animales, *sham* (A-C y G-I) e isquémicos (D-F y J-L), de 3 meses, tratados (B, E, H, K) y no tratados (A, D, G, J) con el agente antiinflamatorio meloxicam, así como en los animales de 18 meses (C, F, I, L). Nótese el incremento de la microglía en los animales isquémicos y como el tratamiento con el agente antiinflamatorio inhibe la respuesta microglial.

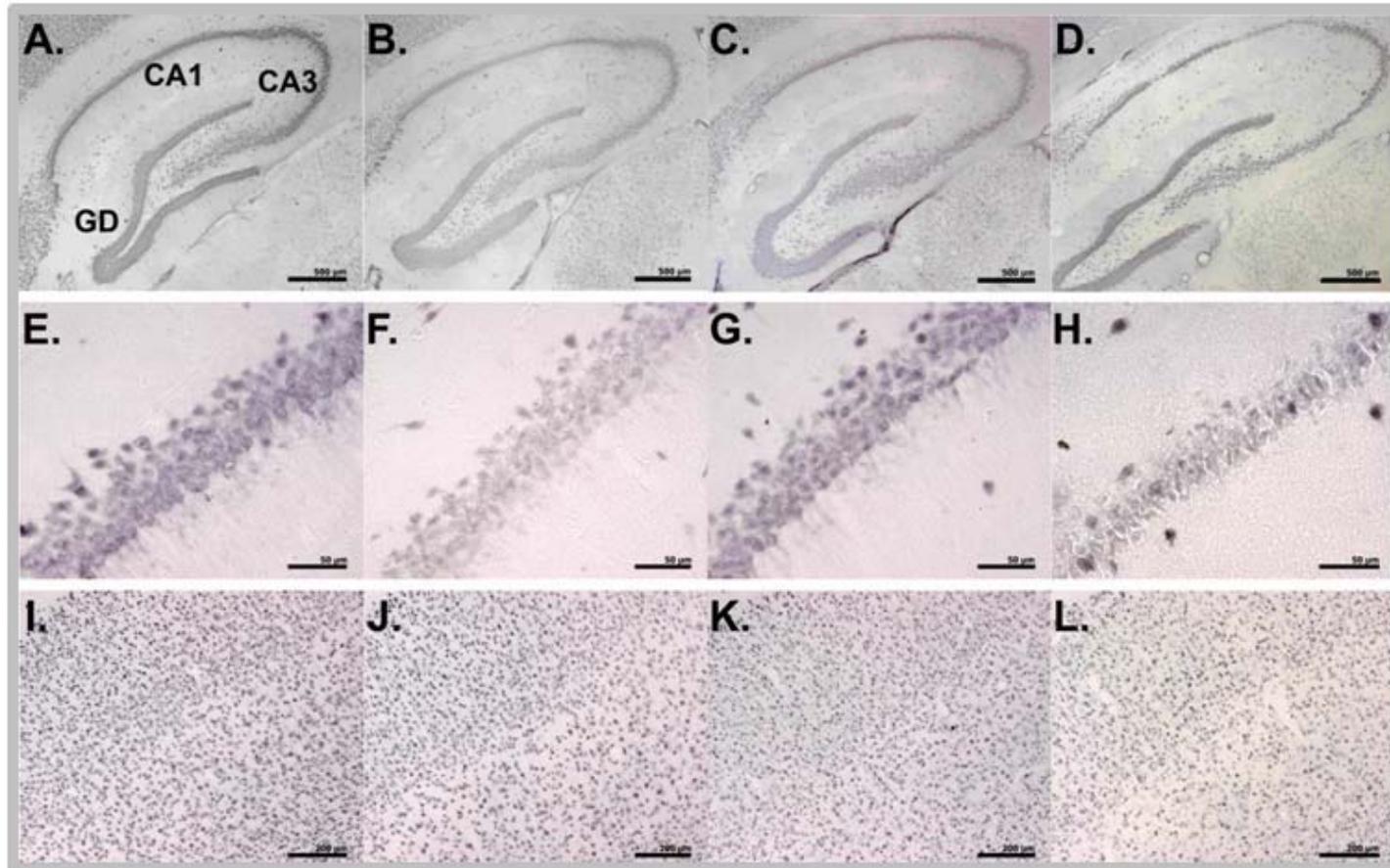


Figura 21: Visualización de los núcleos neuronales (NeuN) en hipocampo (A-D), con las neuronas piramidales del área CA1 en detalle (E-H), y en corteza cerebral (I-L) de los animales *sham* (A, E, I) e isquémicos (B, F, J) de 3 meses y de los animales *sham* (C, G, K) e isquémicos (D, H, L) de 18 meses. Obsérvese la pérdida de neuronas piramidales en el área CA1 de los animales sometidos a isquemia, en especial en los animales de 18 meses.

EFECTO DEL TRATAMIENTO ANTIINFLAMATORIO

Las Figuras 22-25 muestran los datos de la respuesta transcripcional de los diferentes genes estudiados en animales de 3 meses sometidos a I/R, así como sus correspondientes *sham*, tratados o no con el antiinflamatorio meloxicam tras la cirugía. En la mayoría de los genes estudiados se observa que, en los animales tratados, los niveles de transcripción de los animales sometidos a I/R son más parecidos a los de los animales *sham* que en el caso de los animales no tratados, donde las diferencias entre los animales *sham* e isquémicos son más acusadas. Así, por ejemplo, en animales isquémicos tratados con el agente antiinflamatorio el nivel de transcripción observado para la subunidad NR2A en CA1 es un 70% de la transcripción observada en los animales *sham*, mientras que en los animales no tratados el nivel de transcripción desciende drásticamente hasta quedar en un 14% con respecto al observado en los animales *sham*. Curiosamente, en CA3, el tratamiento con el agente antiinflamatorio provocó aumentos en el nivel de transcripción tras la I/R en GluR1, GluR2, ADAR2 (Figura 23). El transportador GLAST presentó un comportamiento inverso al resto de los genes glutamatérgicos, disminuyendo su transcripción tras el tratamiento con meloxicam en todas las estructuras, salvo en CA3, donde no presentó cambios significativos con respecto a la transcripción observada en los animales *sham*.

El tratamiento de los animales con el agente antiinflamatorio muestra que la respuesta a la I/R de los marcadores de inflamación CD11b y GFAP, es similar a la observada en los animales *sham* o los incrementos observados no son tan acusados como en los animales no tratados (Figura 25). Estos datos se confirman con los ensayos de inmunohistoquímica utilizando CD11b (Figura 20).

El tratamiento con meloxicam resultó en aumentos significativos en la respuesta a la I/R de la enzima γ -enolasa en algunas estructuras como CA1 y giro dentado, no se detectaron cambios en la corteza cerebral, y en CA3 se observó un descenso más moderado que en los animales no tratados (Figura 25).

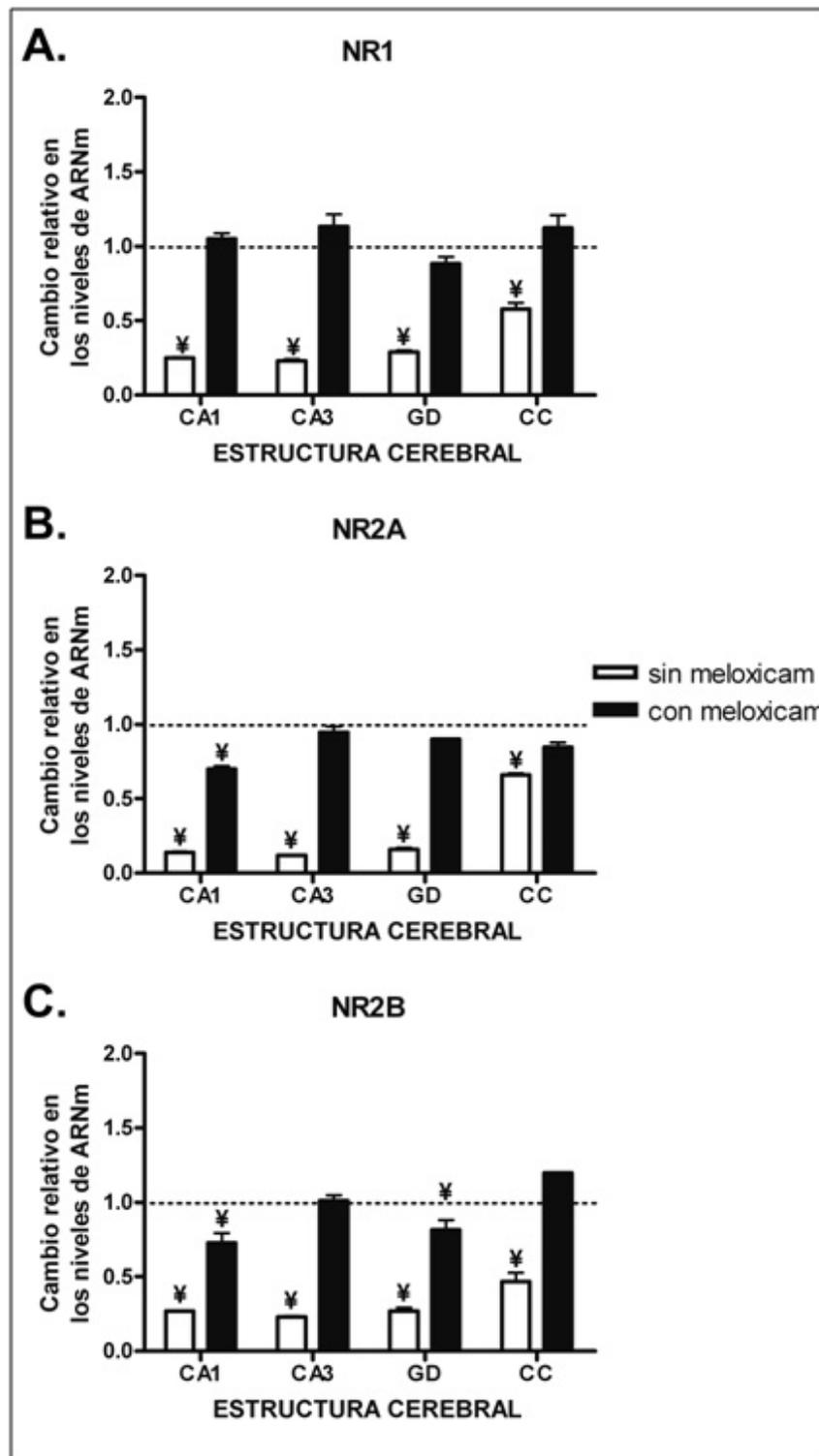


Figura 22: Efecto del tratamiento con meloxicam tras la isquemia-reperfusión (I/R). Cambio relativo ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) en los niveles de ARNm (normalizados con GAPDH) de las subunidades NR1 (A), NR2A (B) y NR2B (C) del receptor de NMDA entre los animales *sham* (línea de puntos) y los animales isquémicos tratados o no con meloxicam. Los descensos significativos (¥ $p < 0,01$) en los niveles de ARNm de estas subunidades observados en los animales no tratados, se atenúan en los animales tratados con meloxicam en todas las estructuras estudiadas. GD (giro dentado); CC (corteza cerebral). Test *t* de Student de datos no pareados y doble cola ($n=5$).

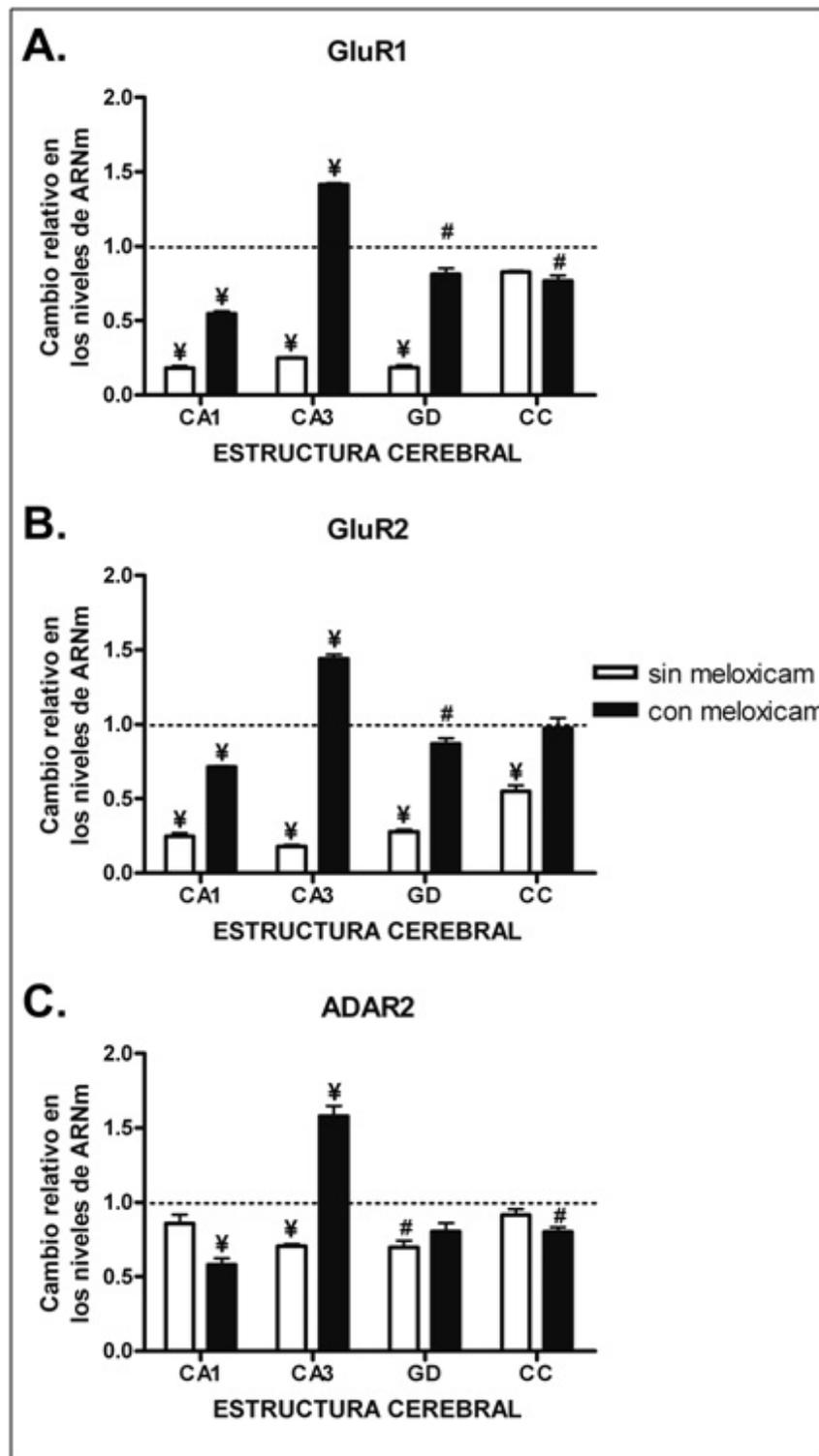


Figura 23: Efecto del tratamiento con meloxicam tras la isquemia-reperfusión (I/R). Cambio relativo ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) en los niveles de ARNm (normalizados con GAPDH) de las subunidades GluR1 (A) y GluR2 (B) del receptor de AMPA, así como de la enzima ADAR2 (C) entre los animales *sham* (línea de puntos) y los animales isquémicos, tratados o no con meloxicam. Los descensos significativos (# $p < 0,05$; ¥ $p < 0,01$) en los niveles de ARNm de las subunidades del receptor de AMPA observados en los animales no tratados, se atenúan en los animales tratados con meloxicam en la mayoría de las estructuras estudiadas, incluso hay un incremento de dichos niveles en CA3. GD (giro dentado); CC (corteza cerebral). Test *t de Student* de datos no pareados y doble cola ($n=5$).

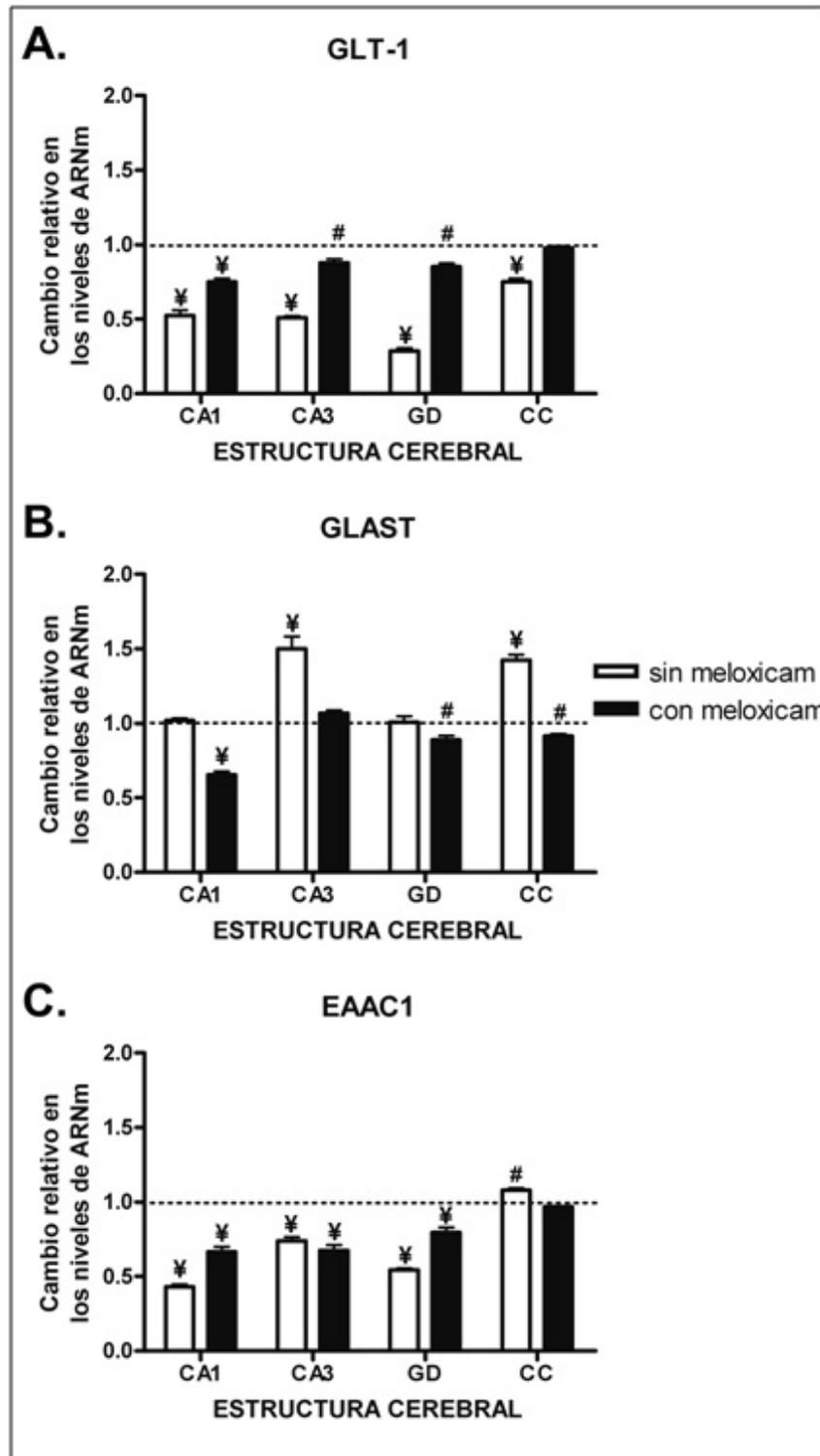


Figura 24: Efecto del tratamiento con meloxicam tras la isquemia-reperfusión (I/R). Cambio relativo ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) en los niveles de ARNm (normalizados con GAPDH) de los transportadores de membrana GLT-1 (A), GLAST (B) y EAAC1 (C) entre los animales sham (línea de puntos) y los animales isquémicos, tratados o no con meloxicam. En varias estructuras, el tratamiento con meloxicam atenuó la respuesta de los transportadores observada en los animales no tratados, pero esta atenuación no se observó en otras estructuras para el transportador EAAC1. GD (giro dentado); CC (corteza cerebral). Test *t* de Student de datos no pareados y doble cola (# $p < 0,05$; ¥ $p < 0,01$; $n = 5$).

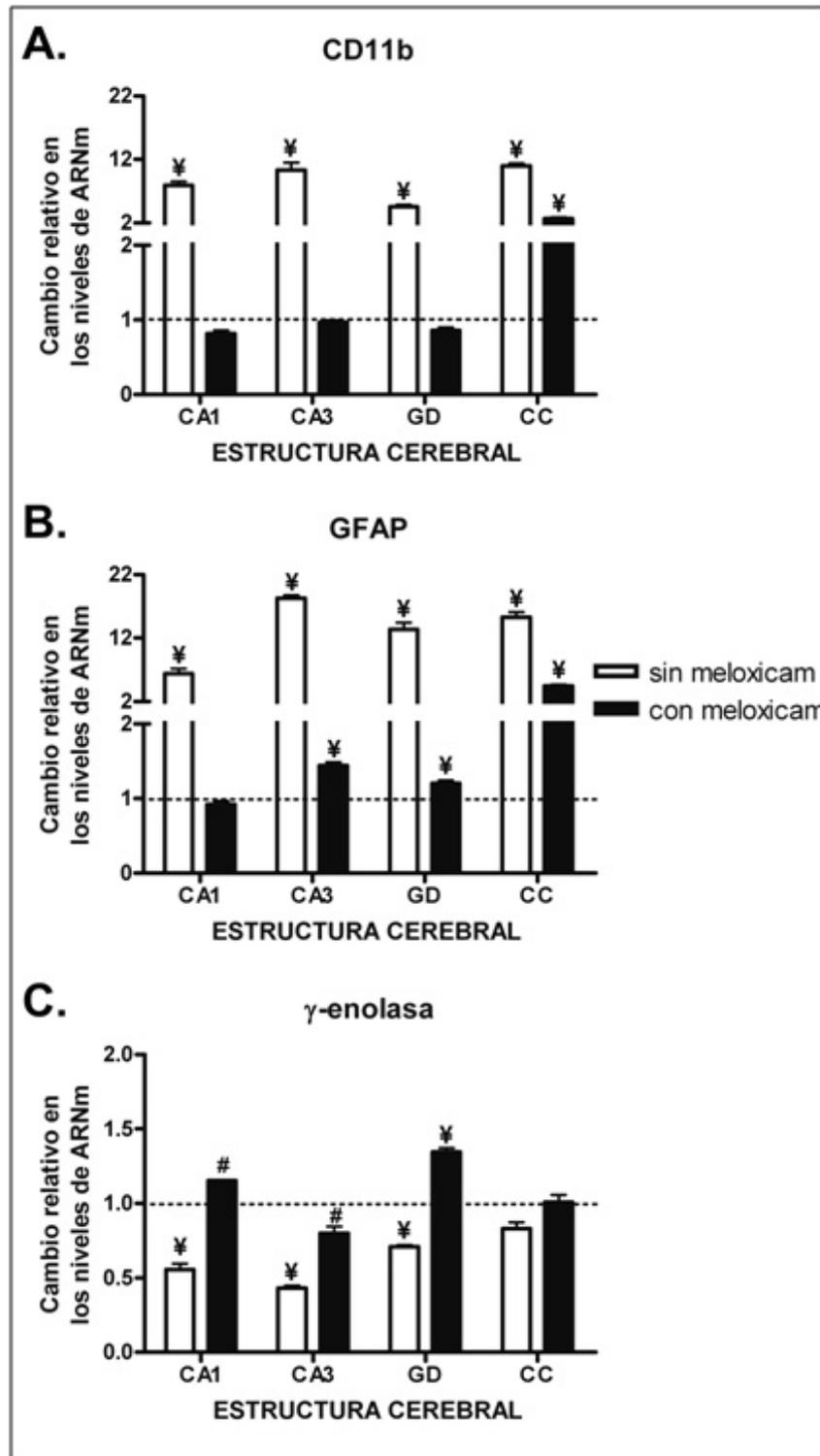


Figura 25: Efecto del tratamiento con meloxicam tras la isquemia-reperfusión (I/R). Cambio relativo ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) en los niveles de ARNm (normalizados con GAPDH) de los marcadores de inflamación CD11b (A) y GFAP (B), así como de la enzima γ -enolasa (C) entre los animales *sham* (línea de puntos) y los animales isquémicos, tratados o no con meloxicam. En todas las estructuras estudiadas, el tratamiento con meloxicam atenúa enormemente los incrementos significativos (# $p < 0,05$; ¥ $p < 0,01$) en los niveles de ARNm de los marcadores de inflamación observados en los animales no tratados. Los descensos observados en los niveles de ARNm de la γ -enolasa también se atenúan, o incluso aumentan, como consecuencia del tratamiento con meloxicam. GD (giro dentado); CC (corteza cerebral). Test *t* de Student de datos no pareados y doble cola ($n=5$).

DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

EFECTO DE LA EDAD

RECEPTOR DE NMDA

El uso de distintas técnicas muestra que los niveles del receptor de NMDA parecen disminuir con la edad. En este sentido, estudios de unión de radioligandos con homogeneizados de membrana (Bonhaus et al., 1990; Magnusson y Cotman 1993; Magnusson 1995; Tamaru et al., 1991; Wenk et al., 1991; Wenk y Barnes 2000), así como estudios de autorradiografía (Magnusson et al., 2006) describen descensos dependientes de la edad en los niveles del receptor de NMDA. Sin embargo, en otros estudios no se han encontrado evidencias de disminución en los niveles del receptor de NMDA asociada a la edad (Liu et al., 2008; Maffucci et al., 2009). Los resultados de *Western blot* del presente estudio muestran descensos en la mayoría de las subunidades del receptor de NMDA, siendo estos descensos muy notables en la corteza cerebral en el caso de las subunidades NR1 y NR2A. Esto contrasta con los resultados obtenidos para los niveles de ARNm, en los cuales no se detectan cambios o aparecen incrementos en las subunidades NR1, NR2A y NR2B cuando se comparan los datos de los animales *sham* de 3 y de 18 meses en las diferentes estructuras estudiadas (Figura 10). Estos resultados sugieren que en los animales de mayor edad se requieren mayores niveles de ARNm de las subunidades del receptor de NMDA para mantener la expresión de los mismos. Hay que señalar que algunos estudios de hibridación *in situ* realizados en ratones de 3, 10 y 30 meses de edad, describen descensos

dependientes de la edad en el gen $\epsilon 2$ (NR2B) en algunas áreas hipocampales, sin detectar diferencias significativas para los genes $\epsilon 1$ (NR2A) ni $\zeta 1$ (NR1) (Magnusson et al., 2006). Las diferencias existentes entre especies y las diferentes edades utilizadas en cada estudio podrían explicar las diferencias encontradas entre los datos de nuestro estudio y los observados por Magnusson y colaboradores en ratones.

RECEPTOR DE AMPA Y ADAR2

Los receptores de AMPA parecen disminuir de una manera dependiente de la edad. Los estudios de autorradiografía (Miyoshi et al., 1991; Tamaru et al., 1991) y de unión de radioligandos con homogeneizados de membrana (Wardas et al., 1997; Wenk y Barnes 2000) describen descensos o falta de modificaciones en el receptor de AMPA, mientras que mediante técnicas de hibridación *in situ* se ha observado que los niveles de ARNm de las subunidades GluR1 y GluR2 disminuyen en el hipocampo de ratas de 24 meses de edad (Pagliusi et al., 1994). Estudios previos realizados en animales de 3 meses de edad indicaron niveles hipocampales de ARNm y proteína de las subunidades GluR1 y GluR2 más altos que los observados en la corteza cerebral (Dos-Anjos et al., 2009b). El presente estudio confirma esta relación hipocampo/corteza cerebral en los animales de 18 meses. Hemos de señalar que nuestros datos comparando el efecto de la edad provienen de animales *sham*, pero previamente hemos realizado estudios comparativos de los niveles ARNm de GluR1 y GluR2 entre animales *sham* y animales *naïve* y no hemos observado diferencias significativas ni en animales de 3 meses ni en animales de 18 meses. Las diferencias dependientes de la edad en los niveles de ARNm

de las subunidades GluR1 y GluR2, así como en los niveles de proteína de la subunidad GluR2, en todas las estructuras salvo en CA1, indican que la expresión de estos genes se modifica con la edad de una manera dependiente de la estructura. Este hecho sugiere que las distintas áreas presentan una regulación diferencial de la traducción y de las modificaciones post-traduccionales, incluyendo, por ejemplo, modificaciones en el recambio de proteínas. Además, aunque se han señalado descensos dependientes de la edad en los niveles de ARNm de las subunidades del receptor de AMPA, también se han descrito incrementos en el ratio GluR1/GluR2 en el hipocampo de animales de 24 meses de edad (Pagliusi et al., 1994), lo cual puede observarse también en nuestros datos de hipocampo de las ratas de 18 meses, especialmente en CA3. Esto sugiere que, en el hipocampo, el declive dependiente de la edad de la subunidad GluR2 sería anterior al de la subunidad GluR1. Sin embargo, en la corteza cerebral el ratio GluR1/GluR2 en los animales de 18 meses no se modifica. Por tanto, parece que la disminución en la expresión del receptor de AMPA asociada a la edad es diferente en el hipocampo y en la corteza cerebral.

Para tratar de correlacionar las modificaciones de la subunidad GluR2 con las de su mecanismo de expresión, se analizaron también los niveles de ARNm de la enzima ADAR2, la cual participa en la edición del ARNm de la subunidad GluR2. Curiosamente, los mayores niveles de ARNm de esta enzima en los animales de 18 meses en relación a los animales de 3 meses contrastan con la disminución de los niveles de ARNm de su sustrato, GluR2. Discrepancias en la expresión de ADAR2 y GluR2 han sido descritas previamente en estudios de desarrollo mediante técnicas de hibridación *in situ*, los cuales mostraron como

el patrón de expresión de la enzima ADAR2 en ratas de 3 meses de edad presentaba poca o nula correspondencia con los patrones de expresión de sus sustratos, GluR2 y el receptor de serotonina 5-HT_{2C} (Paupard et al., 2000). Otros estudios de hibridación *in situ* realizados en ratas de 22-24 meses de edad indicaron que se mantenían niveles similares del ARNm de 5-HT_{2C} a los observados en ratas adultas de 8 meses de edad (Yau et al., 1999), por lo que la expresión de este receptor serotoninérgico no explicaría los incrementos asociados a la edad en los niveles de ARNm de la enzima ADAR2 observados en este trabajo y, hasta el momento, no tenemos una explicación satisfactoria para estas discrepancias.

TRANSPORTADORES DE GLUTAMATO

Los niveles de los ARNm de los distintos transportadores estudiados parecen mantenerse o disminuir con la edad, en contraste con los incrementos asociados a la edad en los niveles de ARNm de algunas subunidades de los receptores de NMDA y AMPA discutidos en los apartados anteriores. Algunos estudios realizados en estriado indican que el tiempo necesario para la eliminación del glutamato en la sinapsis se alarga con la edad (Nickell et al., 2007), lo cual estaría de acuerdo con una disminución dependiente de la edad en el número (o eficacia) de los transportadores. En varias cepas de roedores, se han descrito descensos dependientes de la edad en el contenido de glutamato tanto en la corteza cerebral como en el hipocampo (Banay-Schwartz et al., 1989; Benedetti et al., 1991; Saransaari y Oja 1995; Strolin Benedetti et al., 1990). Esto podría ser interpretado como un déficit metabólico en el glutamato o como un reflejo de la pérdida neuronal (Segovia et al., 2001). Por

tanto, es posible que con la edad se produzca una disminución en la liberación glutamatérgica, de modo que se requerirían menos transportadores, pero sería preciso un mayor número de receptores glutamatérgicos para mantener la respuesta al glutamato.

En términos generales, la edad conduce a niveles más altos de expresión en los ARNm de GLT-1 y EAAC1 en los animales sometidos a I/R y a niveles más bajos de GLAST, lo que sugiere que la gliosis inducida por I/R no lleva aparejado un aumento en la transcripción de los transportadores glutamatérgicos gliales.

EFECTO DE LA I/R EN LOS DOS GRUPOS DE EDAD

RECEPTOR DE NMDA

Hemos descrito previamente que, en animales de 3 meses la isquemia global transitoria seguida de 48 horas de reperfusión produce un descenso notable de la transcripción de las principales subunidades que conforman el receptor de NMDA y que este descenso es más acusado en el hipocampo que en la corteza cerebral (Dos-Anjos et al., 2009a). Tras este tiempo de reperfusión puede observarse una muerte neuronal retrasada tanto en los animales de 3 como de 18 meses (Figura 21). Los datos de este estudio muestran que la edad juega un importante papel en la respuesta transcripcional del receptor de NMDA inducida por el daño isquémico, de modo que los animales de 18 meses no responden o lo hacen más débilmente. Esto contrasta con la fuerte respuesta observada en los animales de 3 meses. Los resultados de los ensayos de *Western blot* confirman que los descensos observados en los niveles de ARNm como consecuencia del daño isquémico

se corresponden con descensos en los niveles de proteína de estas subunidades, permitiéndonos concluir que la I/R da lugar a una *down-regulation* de la expresión del receptor de NMDA. Se ha sugerido que esta *down-regulation* podría ser un mecanismo mediante el cual las células serían menos receptivas a la sobreactivación por glutamato (Wong et al., 2001). Asimismo, se ha sugerido la hipótesis de una “parada traduccional” como mecanismo de respuesta a la isquemia (DeGracia et al., 2008). Los datos del descenso en la transcripción en el receptor de NMDA descrito en animales de 3 meses (Dos-Anjos et al., 2009a) y los datos aquí presentados indican que la *down-regulation* que sigue al episodio isquémico está controlada a nivel transcripcional, por lo que podríamos hablar de una “parada transcripcional”. Sin embargo, no podemos descartar los efectos que podría tener la I/R en etapas posteriores de la expresión proteica, por ejemplo en la estabilidad del ARNm, la traducción o en el ensamblaje y clasificación de proteínas entre otros.

En los animales de 18 meses, esta “parada transcripcional” es más débil, pero los resultados del marcado con NeuN indican mayor daño neuronal. Esto sugiere que la “parada transcripcional” podría estar actuando como un mecanismo de protección frente al proceso isquémico, de modo que a mayor “parada transcripcional”, mayor protección frente al daño isquémico. Sin embargo, esta idea contrasta con la diferente vulnerabilidad descrita para la I/R en las distintas áreas del cerebro aquí estudiadas, tanto en los animales de 3 como de 18 meses. Así, áreas descritas como más vulnerables a la isquemia (como es el caso del hipocampo) presentan una mayor “parada transcripcional” que la observada en las estructuras más resistentes (como la corteza cerebral).

Además, áreas hipocampales con diferencias en la vulnerabilidad al daño isquémico (CA1 y CA3) (Jamison et al., 2008; Martone et al., 2000; Zou et al., 2005), presentan una “parada transcripcional” similar tanto en los animales de 3 meses como en los de 18 meses. Por tanto, el control transcripcional del receptor de NMDA no parece explicar todos los aspectos de la vulnerabilidad diferencial a la isquemia. No obstante, parece evidente que el control de la transcripción de los genes del receptor de NMDA está implicado en la respuesta a la isquemia, probablemente para proteger de la sobreactivación provocada por el glutamato tras el episodio isquémico. La mayor vulnerabilidad asociada a la edad podría explicarse por un descenso en la eficiencia del control transcripcional.

RECEPTOR DE AMPA Y ADAR2

También hemos descrito previamente descensos acusados en los niveles de ARNm y proteína de las subunidades del receptor de AMPA, GluR1 y GluR2, tanto en hipocampo como en corteza cerebral en animales de 3 meses de edad (Dos-Anjos et al., 2009b). Los resultados del presente estudio muestran que la edad también juega un papel importante en la transcripción de estos receptores, atenuando o incluso produciendo una reversión de los efectos de la I/R observados en los animales de 3 meses de edad. Así, en la corteza cerebral, la edad puede atenuar los efectos de la I/R impidiendo observar diferencias entre animales *sham* y animales sometidos a isquemia (por ejemplo en GluR1), o incluso provocar un aumento en la expresión de los animales sometidos a isquemia (por ejemplo GluR2) con respecto a los *sham*. Estos datos proporcionan soporte adicional a la hipótesis indicada

anteriormente de que la “parada transcripcional” ocasionada por la I/R se debilita con la edad. Los datos de hipocampo dan soporte a la hipótesis de que el proceso isquémico activa algún mecanismo encargado de reducir la expresión de algunos genes, como por ejemplo una disminución de su transcripción, una mayor tasa de degradación de sus ARNm, o la “parada traduccional” descrita por DeGracia y colaboradores (DeGracia et al., 2008). En este sentido, la “parada traduccional” podría proporcionar protección frente al daño isquémico y su eficacia dependería de la edad del individuo y de la estructura afectada, lo que podría explicar las diferencias en la vulnerabilidad a la isquemia y por qué los animales de mayor edad, con un mecanismo de respuesta menos eficiente, son más vulnerables a la I/R.

Se ha señalado que los cambios en los niveles de calcio intracelular en neuronas envejecidas pueden jugar un papel en la mayor vulnerabilidad a la neurodegeneración. Así, los experimentos de señalización de niveles de Ca^{2+} realizados *in vivo* en neuronas individuales, mostraron que la concentración intracelular de calcio en las neuronas procedentes de animales de 24 meses podía duplicarse con respecto a la concentración detectada en las neuronas procedentes de animales de 2 meses (Hajieva et al., 2009). De acuerdo con la “hipótesis GluR2”, se observa un descenso ocasionado por la I/R en la expresión de GluR2 en todas las estructuras estudiadas. Sin embargo, esa *down-regulation* transcripcional también se observa en otros genes, como los que codifican para las subunidades del receptor de NMDA (Dos-Anjos et al., 2009a) y para algunos transportadores glutamatérgicos. Aunque en la corteza cerebral esa *down-regulation* es menor que en el hipocampo, no se han observado diferencias entre las distintas áreas hipocampales, en las que

también se ha descrito una vulnerabilidad diferencial. Además, la respuesta transcripcional de la enzima ADAR2, que cataliza la edición de Q/R de la subunidad GluR2 impidiendo el paso de calcio a través del canal del receptor de AMPA (Jonas y Burnashev 1995), no muestra tampoco diferencias evidentes entre las distintas áreas hipocampales. Sin embargo, las modificaciones en la proporción GluR1/GluR2, que podrían en cierto modo ser indicativas de la vulnerabilidad diferencial, parecen estar claramente modificadas por la I/R y la edad, sugiriendo que la “hipótesis GluR2” (Pellegrini-Giampietro et al., 1997) podría estar jugando un papel en la vulnerabilidad. Estudios electrofisiológicos en animales jóvenes 42 horas después de la isquemia, indican que las corrientes post-sinápticas excitatorias del receptor de AMPA muestran una rectificación hacia adentro más pronunciada y un incremento de la sensibilidad para bloqueantes selectivos de los receptores de AMPA que no contienen la subunidad GluR2 en CA1, sugiriendo que estos receptores permeables al calcio son dianas terapéuticas importantes para prevenir la muerte neuronal retrasada (Noh et al., 2005). Todos estos datos apoyan la idea de que la isquemia induce cambios a largo plazo en la permeabilidad de los receptores de AMPA mediante cambios en la expresión génica, por lo que su control podría ser una importante diana terapéutica. Sin embargo, parece que la “hipótesis GluR2” por sí misma no explicaría la vulnerabilidad diferencial entre corteza cerebral e hipocampo o entre las diferentes áreas del hipocampo, y parece que la “parada transcripcional” de los genes del sistema glutamatérgico explicaría mejor estas diferencias, aunque ninguno de estos mecanismos explica completamente la vulnerabilidad diferencial en el hipocampo.

TRANSPORTADORES DE GLUTAMATO

En contraste con la homogeneidad observada en la respuesta a la I/R de los receptores glutamatérgicos de AMPA y NMDA indicada previamente, los transportadores de glutamato presentan una gran diversidad en su respuesta. El carácter glial o neuronal de estos transportadores (Berger y Hediger 1998; Danbolt 2001) podría reflejar las diferencias observadas en la respuesta a la I/R en los transportadores estudiados en este trabajo, especialmente notables cuando se compara GLAST frente a GLT-1 y EAAC1.

Efecto de la I/R en el transportador GLT-1

Mediante diversas técnicas de marcado con anticuerpos se ha demostrado que GLT-1 es el EAAT dominante en el individuo adulto (Furuta et al., 1997; Northington et al., 1999). Estos datos de proteínas concuerdan con nuestros datos, en los que los niveles de ARNm para este transportador son un orden superior al de los observados en los otros dos EAATs estudiados. Esto sugiere un papel más relevante de GLT-1 en la recaptación del glutamato extracelular y sería esperable que este transportador jugara el papel principal en la eliminación del glutamato tras la I/R.

El cambio inducido por la I/R en los niveles de ARNm de GLT-1 es comparable al observado en los receptores de NMDA y AMPA en animales de 3 meses (Dos-Anjos et al., 2009a; Dos-Anjos et al., 2009b) y 18 meses, como se ha señalado anteriormente. Esto sugiere que el efecto del daño isquémico no sólo se asocia a los receptores ionotrópicos sino a todo el sistema de transmisión glutamatérgica. Esta respuesta es opuesta a la observada, en los animales de 3 meses, en los niveles de ARNm de la proteína glial GFAP

(Figura 15), lo que indica una correlación inversa en la transcripción de GFAP y GLT-1. Se ha descrito que el ARNm de GLT-1 se encuentra tanto en astrogliá como en neuronas (Berger y Hediger 1998; Chen et al., 2004; Torp et al., 1994) y que las neuronas son más vulnerables a la deficiencia de oxígeno que los astrocitos, la oligodendroglía o la microglía (Vallet y Charpiot 1994), lo que sugiere que la respuesta a la I/R del transportador GLT-1 estaría más relacionada con cambios neuronales que gliales. La respuesta opuesta entre GLT-1 y GFAP se observa también en los animales de 18 meses, aunque atenuada, es decir, los descensos y los aumentos son de menor magnitud que en los animales de 3 meses. Los datos de los animales de 18 meses, por tanto, proporcionan soporte adicional a la hipótesis de que la respuesta de GLT-1 a la I/R se relaciona con cambios en las neuronas.

Efecto de la I/R en el transportador GLAST

En contraposición a la respuesta descrita para el transportador GLT-1, el efecto de la I/R en los niveles de ARNm del transportador GLAST en los animales de 3 meses de edad depende de la estructura. En este sentido, se observaron incrementos en los niveles de ARNm de GLAST como consecuencia del daño isquémico en CA3 y corteza cerebral, regiones descritas como más resistentes a la I/R (Gee et al., 2006; Jiang et al., 2004; Kumari Naga et al., 2007; Stanika et al., 2009), mientras que en las zonas más vulnerables, como CA1 (Jamison et al., 2008; Martone et al., 2000; Zou et al., 2005) , no se observaron cambios dependientes de la I/R en dichos niveles. En los animales de 18 meses se observa en términos generales este patrón de respuesta a la I/R, aunque de forma menos acusada. Así, GLAST responde de forma opuesta a GLT-1 en los animales de 3 meses y de forma diferente,

aunque no exactamente opuesta, en los animales de 18 meses. La regulación diferencial para cada uno de los transportadores dentro de la misma célula glial (Berger y Hediger 1998; Gegelashvili y Schousboe 1997) podría explicar las diferencias en la respuesta a la I/R entre los transportadores GLT-1 y GLAST. La expresión de GLT-1 requiere varios factores neuronales que no son necesarios para la expresión de GLAST (Gegelashvili et al., 1997; Swanson et al., 1997b), y GFAP es esencial para el mantenimiento el transportador GLAST en la membrana de los astrocitos tras un episodio isquémico (Sullivan et al., 2007). El gran aumento de los niveles de GFAP debido a la gliosis que sigue a la I/R podría explicar el aumento de los niveles de GLAST, pero incluso considerando una diferente regulación, parece difícil que el aumento en la gliosis dé lugar a una disminución de transportadores gliales. Parece más lógico pensar que el daño neuronal es el principal responsable de la disminución de los transportadores GLT-1 y la gliosis la responsable del aumento de los transportadores GLAST.

Efecto de la I/R en el transportador EAAC1

La mayoría de las neuronas expresan EAAC1, al menos en pequeñas cantidades, e independientemente de la región del cerebro donde se encuentren (Rothstein et al., 1994), debido al importante papel del glutamato en el metabolismo celular como precursor en la síntesis de GABA (Berger y Hediger 1998). Dado que EAAC1 es un transportador específico de neuronas (Berger y Hediger 1998; Bjoras et al., 1996; Kanai and Hediger 1992; Rothstein et al., 1994), sus cambios en respuesta a la I/R reflejan modificaciones neuronales. La similitud en el patrón de respuesta a la I/R de EAAC1 y GLT-1,

tanto en animales de 3 meses como de 18 meses, apoya la hipótesis de que las modificaciones en GLT-1 son debidas a cambios neuronales y no a gliosis.

Las neuronas liberan glutamato como neurotransmisor, el cual es transportado hacia el citosol de las células gliales, donde es transformado en glutamina. Esta glutamina es liberada de nuevo al espacio extracelular, desde donde es transportada al citosol de las neuronas para la síntesis de glutamato (Segovia et al., 2001). Tanto las neuronas como los astrocitos presentan una alta capacidad de recaptación de glutamato (Segovia et al., 2001), pero la astroglía se considera el sitio más importante en la recaptación de glutamato en regiones de alta actividad glutamatérgica (Rothstein et al., 1996; Schousboe y Divac 1979; Schousboe 1981). Los resultados obtenidos en este trabajo concuerdan con estos datos y sugieren que tras la I/R se produce una *up-regulation* de GLAST en las células gliales que actúa como mecanismo principal en la eliminación del glutamato extracelular. Los descensos en los niveles de ARNm de EAAC1 y GLT-1 podrían ser el reflejo de la muerte neuronal retrasada, o quizá una *down-regulation* de estos transportadores para reducir la recaptación de glutamato al citosol de las neuronas. Esto podría conducir a una disminución de la transmisión glutamatérgica, lo que también estaría en concordancia con la *down-regulation* de los receptores ionotrópicos de NMDA y de AMPA tras el episodio isquémico.

γ -ENOLASA

La γ -enolasa es una enzima que cataliza la transformación de 2-fosfoglicerato a fosfoenolpiruvato durante la glucólisis y que se libera como consecuencia del daño neuronal, por lo que ha sido utilizada como marcador

de daño tras un episodio isquémico (Hardemark et al., 1988), ya que una concentración elevada de esta proteína en líquido cefalorraquídeo indica daño en las células que expresan esta proteína (Barone et al., 1993a; Hay et al., 1984). Más recientemente, se ha indicado que, además de sus funciones enzimáticas, esta proteína puede jugar otros papeles. Por ejemplo, se ha señalado que actúa como factor neurotrófico, proteína de estrés hipóxico, proteína de unión a c-Myc, factor de transcripción o proteína de unión a plasminógeno, y algunas de estas funciones no glicolíticas parecen estar implicadas en hipoxia, isquemia y enfermedad de Alzheimer (revisado por Butterfield y Lange 2009). La pérdida de integridad de la membrana en las neuronas dañadas permite la salida de la proteína γ -enolasa, y se ha señalado la existencia de picos de esta proteína a las 48 horas de la I/R, que se han correlacionado con muerte neuronal retrasada {{260 Barone,F.C. 1993}}. Los niveles de transcripción observados en nuestro estudio corresponden a neuronas supervivientes en este tiempo de reperfusión, dado que el ARNm de las neuronas muertas se degrada rápidamente. Por tanto, los niveles de ARNm de esta enzima podrían ser usados como marcadores de las neuronas que están vivas en el momento de la obtención de la muestra. La similitud en la respuesta entre la γ -enolasa y GLT-1 proporciona apoyo adicional a la hipótesis previamente discutida de que la respuesta de GLT-1 a la I/R es de carácter más neuronal que glial.

RESPUESTA INFLAMATORIA

Para detectar la respuesta inflamatoria que sigue al daño isquémico, en este trabajo se han utilizado un marcador astrogial (GFAP) y un marcador

microglial (CD11b) (Kim y de Vellis 2005; McGeer y McGeer 1995; Yatsiv et al., 2005), ya que son los marcadores más utilizados para cuantificar la inflamación cerebral ocasionada por procesos como el daño isquémico (Giovannoni 2006; Hamby et al., 2007; Khairnar et al., 2009; Massaro et al., 1990). Nuestros datos confirman que la inflamación aumenta tras la isquemia (Block et al., 2005; Harting et al., 2008; Stoll et al., 1998; Yamashita et al., 1996) y con la edad (Prolla y Mattson 2001; Sparkman y Johnson 2008). El incremento en los marcadores de la respuesta inflamatoria como consecuencia de la I/R parece correlacionarse con la vulnerabilidad diferencial a este daño en los animales de 3 meses. Así, tras la I/R, el incremento en los niveles de ARNm de estos marcadores es menor en CA1, área más vulnerable a la isquemia, que en CA3 y corteza cerebral, áreas más resistentes (Davolio y Greenamyre 1995; Ordly et al., 1993; Wilde et al., 1997; Yang et al., 2000).

En los animales de 18 meses esta correlación es menos evidente para GFAP, aunque sus niveles de ARNm siguen incrementándose más tras el proceso isquémico en las áreas más resistentes, pero esta correlación ya no es tan clara para el marcador CD11b. Los datos obtenidos en los animales de 3 meses, sugieren que las áreas más vulnerables al daño isquémico tienen una menor respuesta inflamatoria tras la I/R que las áreas menos vulnerables, lo que sugiere que la inflamación podría actuar como un mecanismo de protección frente a la isquemia más que como un mecanismo adicional de daño. Los resultados de los animales de 18 meses apoyan esta idea, dado que los niveles de ARNm de GFAP y CD11b muestran un incremento menos acusado que el observado en los animales de 3 meses, lo que concuerda con la mayor vulnerabilidad de los animales de edad avanzada al daño isquémico

(Ay et al., 2005). Se ha señalado una pérdida de la microglía y de las funciones neuroprotectoras de la misma en el cerebro de animales viejos (Streit et al., 2008) lo que podría explicar la menor respuesta inflamatoria de los animales de 18 meses.

EFFECTO DEL TRATAMIENTO ANTIINFLAMATORIO

Para inhibir el efecto de la respuesta inflamatoria tras el daño isquémico, se utilizó un agente antiinflamatorio (meloxicam) durante el periodo de reperusión en los animales de 3 meses. Los estudios de inmunohistoquímica con el marcador de microglía CD11b demuestran que el tratamiento con este agente es capaz de inhibir el incremento en la respuesta inflamatoria tras la I/R (Figura 20). La inhibición de la inflamación dio lugar a una notable atenuación de los cambios observados inducidos por la I/R en los niveles de ARNm de todos los genes estudiados (Figuras 22-25), sugiriendo que la inflamación podría estar involucrada en el control de la transcripción de dichos genes tras el proceso de isquemia. Es decir, el uso de este agente antiinflamatorio tras la I/R atenúa el incremento de los marcadores de inflamación y bloquea la *down-regulation* inducida por la I/R en el resto de genes en la mayoría de las estructuras estudiadas. Este trabajo indica que los niveles de ARNm de GFAP y CD11b son parámetros que permiten cuantificar los niveles de inflamación, en este sentido, el meloxicam parece producir un mayor efecto antiinflamatorio en todas las áreas del hipocampo que en la corteza cerebral.

Uno de los resultados más interesantes del tratamiento con meloxicam es que la atenuación de la respuesta a la I/R en la transcripción de las subunidades del receptor de AMPA es incluso invertida en CA3, donde el

tratamiento con meloxicam dio lugar a un incremento en la transcripción en vez de la reducción observada en los animales no tratados tras la I/R. La misma inversión se observa en el caso de ADAR2, por lo que es posible que el control transcripcional en este área del hipocampo podría relacionarse con su menor vulnerabilidad a la isquemia (Gee et al., 2006; Jamison et al., 2008). De todos modos, la corteza cerebral, estructura también considerada resistente al daño isquémico, no responde de la misma manera que CA3. Esto nos lleva a pensar que las diferencias en el control transcripcional entre las diferentes estructuras parece ser sólo una pequeña pieza más del puzle multifactorial responsable de la vulnerabilidad a la isquemia.

La inhibición de COX-2 por meloxicam (Nogawa et al., 1998) proporciona datos adicionales sobre la diferencia en la regulación de la expresión de GLAST frente a GLT-1, EAAC1 y γ -enolasa. El notable descenso en los niveles de ARNm de GFAP y GLAST en respuesta a la I/R en los animales tratados con meloxicam que apoya la correlación entre GFAP y GLAST mencionada en párrafos anteriores. La localización neuronal de EAAC1 (Berger and Hediger 1998; Bjoras et al., 1996; Kanai and Hediger 1992; Rothstein et al., 1994) y γ -enolasa (Barone et al., 1993a; Hay et al., 1984) permiten considerarlos como marcadores neuronales. La atenuación de la respuesta de EAAC1 y γ -enolasa tras el tratamiento antiinflamatorio mostrado en este estudio sugiere que el tratamiento con meloxicam impide la muerte neuronal retrasada. Los datos sobre GLT-1 en los animales tratados con meloxicam están en concordancia con la hipótesis indicada previamente de que su modificación por la I/R es fundamentalmente neuronal y no glial. Dado que el tratamiento con meloxicam aumenta la mortalidad en los animales sometidos a I/R se plantea la cuestión

de si la prevención de la muerte neuronal con agentes antiinflamatorios como el meloxicam es ventajosa o contraproducente para la supervivencia de los animales sometidos al daño isquémico. Aunque no hemos hecho un estudio detallado, se observó una mayor mortalidad en los animales de 3 meses sometidos a I/R tratados con meloxicam que en los no tratados. Solamente se realizaron 5 ensayos en animales de 18 meses sometidos a I/R, pero todos ellos murieron tras el tratamiento con meloxicam, lo que nos disuadió de usar este tratamiento en los animales de 18 meses (al menos en nuestra condición experimental). Es posible que el bloqueo de COX-2 inhiba la “parada transcripcional” que, hipotéticamente, sería un mecanismo protector frente al daño isquémico, esto inhibiría la muerte neuronal retrasada pero disminuiría las posibilidades de supervivencia del animal.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

- 1) La isquemia produce un importante descenso en la transcripción de los genes de los receptores de NMDA y AMPA al cual nos referimos como "parada transcripcional", un mecanismo que probablemente protege de la sobreactivación provocada por el glutamato tras el episodio isquémico. Este mecanismo parece ser menos eficaz en los animales de viejos que en los jóvenes.

Ischemia results in an outstanding decrease in the NMDA and AMPA receptor gene transcription, here referred to as "transcriptional arrest", which we consider as a protective mechanism for glutamatergic overexcitation triggered by ischemia-reperfusion. This mechanism seems to be less efficient in aged than in young animales

- 2) Este mecanismo de "parada transcripcional" no es una respuesta generalizada para todos los genes del sistema glutamatérgico, ya que algunos transportadores de glutamato pueden incluso aumentar la transcripción tras el proceso de isquemia-reperusión.

The "transcriptional arrest" mechanism is not a general response for all the glutamatergic system genes, since some glutamate transporters can even increase their transcription following ischemia-reperfusion.

- 3) El mayor o menor nivel de transcripción de muchos de los genes del sistema glutamatérgico puede explicar, al menos en parte, la vulnerabilidad diferencial entre la corteza cerebral y el hipocampo, aunque no es suficiente para explicar la vulnerabilidad diferencial de las diferentes áreas hipocampales.

Differences in the transcriptional activity for many of the glutamatergic system genes may explain, at least partially, the differential vulnerability between cerebral cortex and hippocampus, although it does not account for the differential vulnerability among the hippocampal areas.

4) La respuesta en la expresión génica de los receptores glutamatérgicos y de los marcadores gliales que se produce tras la isquemia-reperfusión en los animales jóvenes aparece atenuada en los animales viejos, lo que puede explicar parcialmente la mayor vulnerabilidad de éstos a la isquemia. Sin embargo, las modificaciones dependientes de la edad en la relación entre las subunidades GluR1 y GluR2 del receptor de AMPA, indican que la permeabilidad de este receptor al calcio también juega un papel importante en la mayor vulnerabilidad de los animales viejos a la isquemia.

The glutamatergic receptor and glial marker gene response to the ischemia-reperfusion injury in young animals is attenuated in aged animals, which can partially explain the age-dependent increased vulnerability to ischemia. However, the age dependent modifications in the AMPA receptor GluR1/GluR2 ratio indicates that calcium permeability of this channel also plays an important role in the age-dependent increased vulnerability to ischemia.

5) La respuesta a la isquemia-reperfusión observada en la transcripción de la γ -enolasa y los transportadores GLT-1 y EAAC1, indican que la respuesta del transportador GLT-1, que se expresa tanto en neuronas como células gliales, parece debida principalmente a cambios en las

neuronas más que a cambios en las células gliales, y podría ser utilizado como marcador de la respuesta neuronal a la isquemia.

The response to ischemia-reperfusion observed for γ -enolase, and for the GLT-1 and EAAC1 transporters, indicates that the response of the glial and neuronal GLT-1 seems to be mainly neuronal rather than glial, and this transporter could be used as a marker in the neuronal response to the ischemia.

- 6) Tras el tratamiento con el agente antiinflamatorio meloxicam se observó un aumento en la mortalidad de los animales sometidos a isquemia-reperfusion lo que sugiere que la inflamación favorece la supervivencia del individuo al daño isquémico.

The treatment with the antiinflammatory agent meloxicam increased the mortality of the ischemia-reperfusion injured animals. This suggests that inflammation favors animal survival to the ischemic damage.

- 7) Los datos de los niveles de ARNm de los distintos genes analizados en este estudio en los animales sometidos a tratamiento con meloxicam indican que este agente impide que se produzca la “parada transcripcional”, lo que apoya la hipótesis de que la *down-regulation* es un mecanismo que juega un papel crucial en la vulnerabilidad a la isquemia.

The mRNA data from the different genes analyzed in this study in animals treated with meloxicam indicate that this agent prevents the “transcriptional arrest”, supporting the hypothesis that the transcriptional down-regulation is a protective mechanism that plays a crucial role in the vulnerability to ischemia.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

- Abraham, H., Lazar, G., 2000. Early microglial reaction following mild forebrain ischemia induced by common carotid artery occlusion in rats. *Brain Res.* 862, 63-73.
- Akazawa, C., Shigemoto, R., Bessho, Y., Nakanishi, S., Mizuno, N., 1994. Differential expression of five N-methyl-D-aspartate receptor subunit mRNAs in the cerebellum of developing and adult rats. *J Comp Neurol.* 347, 150-160.
- Al-Hallaq, R.A., Conrads, T.P., Veenstra, T.D., Wenthold, R.J., 2007. NMDA di-heteromeric receptor populations and associated proteins in rat hippocampus. *J Neurosci.* 27, 8334-8343.
- Aliev, G., Smith, M.A., Seyidov, D., Neal, M.L., Lamb, B.T., Nunomura, A., Gasimov, E.K., Vinters, H.V., Perry, G., LaManna, J.C., Friedland, R.P., 2002. The role of oxidative stress in the pathophysiology of cerebrovascular lesions in alzheimer's disease. *Brain Pathol.* 12, 21-35.
- Alvarez-Diaz, A., Hilario, E., de Cerio, F.G., Valls-i-Soler, A., Alvarez-Diaz, F.J., 2007. Hypoxic-ischemic injury in the immature brain--key vascular and cellular players. *Neonatology.* 92, 227-235.
- Amantea, D., Nappi, G., Bernardi, G., Bagetta, G., Corasaniti, M.T., 2009. Post-ischemic brain damage: Pathophysiology and role of inflammatory mediators. *FEBS J.* 276, 13-26.
- Anegawa, N.J., Guttman, R.P., Grant, E.R., Anand, R., Lindstrom, J., Lynch, D.R., 2000. N-methyl-D-aspartate receptor mediated toxicity in nonneuronal cell lines: Characterization using fluorescent measures of cell viability and reactive oxygen species production. *Brain Res Mol Brain Res.* 77, 163-175.
- Antezana, D.F., Clatterbuck, R.E., Alkayed, N.J., Murphy, S.J., Anderson, L.G., Frazier, J., Hurn, P.D., Traystman, R.J., Tamargo, R.J., 2003. High-dose ibuprofen for reduction of striatal infarcts during middle cerebral artery occlusion in rats. *J Neurosurg.* 98, 860-866.
- Arriza, J.L., Eliasof, S., Kavanaugh, M.P., Amara, S.G., 1997. Excitatory amino acid transporter 5, a retinal glutamate transporter coupled to a chloride conductance. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94, 4155-4160.
- Attwell, D., Barbour, B., Szatkowski, M., 1993. Nonvesicular release of neurotransmitter. *Neuron.* 11, 401-407.
- Ay, H., Koroshetz, W.J., Vangel, M., Benner, T., Melinosky, C., Zhu, M., Menezes, N., Lopez, C.J., Sorensen, A.G., 2005. Conversion of ischemic brain tissue into infarction increases with age. *Stroke.* 36, 2632-2636.
- Ayalon, G., Segev, E., Elgavish, S., Stern-Bach, Y., 2005. Two regions in the N-terminal domain of ionotropic glutamate receptor 3 form the subunit oligomerization interfaces that control subtype-specific receptor assembly. *J Biol Chem.* 280, 15053-15060.

- Back, T., 1998. Pathophysiology of the ischemic penumbra--revision of a concept. *Cell Mol Neurobiol.* 18, 621-638.
- Balmaseda, R., León-Carrión, J., Barroso y Martín, J.M., 2003. Epidemiología del trastorno cerebrovascular. *Revista Española de Neuropsicología* 5, 251-266.
- Baltan, S., Besancon, E.F., Mbow, B., Ye, Z., Hamner, M.A., Ransom, B.R., 2008. White matter vulnerability to ischemic injury increases with age because of enhanced excitotoxicity. *J Neurosci.* 28, 1479-1489.
- Banasiak, K.J., Xia, Y., Haddad, G.G., 2000. Mechanisms underlying hypoxia-induced neuronal apoptosis. *Prog Neurobiol.* 62, 215-249.
- Banay-Schwartz, M., Lajtha, A., Palkovits, M., 1989. Changes with aging in the levels of amino acids in rat CNS structural elements. I. glutamate and related amino acids. *Neurochem Res.* 14, 555-562.
- Banda, M., Bommineni, A., Thomas, R.A., Luckinbill, L.S., Tucker, J.D., 2008. Evaluation and validation of housekeeping genes in response to ionizing radiation and chemical exposure for normalizing RNA expression in real-time PCR. *Mutat Res.* 649, 126-134.
- Barnett, H.J., 2002. Stroke prevention in the elderly. *Clin Exp Hypertens.* 24, 563-571.
- Baron, J.C., 1999. Mapping the ischaemic penumbra with PET: Implications for acute stroke treatment. *Cerebrovasc Dis.* 9, 193-201.
- Barone, F.C., Feuerstein, G.Z., 1999. Inflammatory mediators and stroke: New opportunities for novel therapeutics. *J Cereb Blood Flow Metab.* 19, 819-834.
- Barone, F.C., Clark, R.K., Price, W.J., White, R.F., Feuerstein, G.Z., Storer, B.L., Ohlstein, E.H., 1993a. Neuron-specific enolase increases in cerebral and systemic circulation following focal ischemia. *Brain Res.* 623, 77-82.
- Barone, F.C., Knudsen, D.J., Nelson, A.H., Feuerstein, G.Z., Willette, R.N., 1993b. Mouse strain differences in susceptibility to cerebral ischemia are related to cerebral vascular anatomy. *J Cereb Blood Flow Metab.* 13, 683-692.
- Beal, M.F., 1992a. Mechanisms of excitotoxicity in neurologic diseases. *FASEB J.* 6, 3338-3344.
- Beal, M.F., 1992b. Role of excitotoxicity in human neurological disease. *Curr Opin Neurobiol.* 2, 657-662.
- Belachew, S., Gallo, V., 2004. Synaptic and extrasynaptic neurotransmitter receptors in glial precursors' quest for identity. *Glia.* 48, 185-196.
- Bendel, O., Alkass, K., Bueters, T., von Euler, M., von Euler, G., 2005a. Reproducible loss of CA1 neurons following carotid artery occlusion combined with halothane-induced hypotension. *Brain Res.* 1033, 135-142.
- Bendel, O., Prunell, G., Stenqvist, A., Mathiesen, T., Holmin, S., Svendgaard, N.A., Euler, G., 2005b. Experimental subarachnoid hemorrhage induces changes in the levels of hippocampal NMDA receptor subunit mRNA. *Brain Res Mol Brain Res.* 137, 119-125.

- Benedetti, M.S., Russo, A., Marrari, P., Dostert, P., 1991. Effects of ageing on the content in sulfur-containing amino acids in rat brain. *J Neural Transm Gen Sect.* 86, 191-203.
- Berger, U.V., Hediger, M.A., 1998. Comparative analysis of glutamate transporter expression in rat brain using differential double in situ hybridization. *Anat Embryol (Berl).* 198, 13-30.
- Bjoras, M., Gjesdal, O., Erickson, J.D., Torp, R., Levy, L.M., Ottersen, O.P., Degree, M., Storm-Mathisen, J., Seeberg, E., Danbolt, N.C., 1996. Cloning and expression of a neuronal rat brain glutamate transporter. *Brain Res Mol Brain Res.* 36, 163-168.
- Block, F., Dihne, M., Loos, M., 2005. Inflammation in areas of remote changes following focal brain lesion. *Prog Neurobiol.* 75, 342-365.
- Bonhaus, D.W., Perry, W.B., McNamara, J.O., 1990. Decreased density, but not number, of N-methyl-D-aspartate, glycine and phencyclidine binding sites in hippocampus of senescent rats. *Brain Res.* 532, 82-86.
- Bonita, R., 1992. Epidemiology of stroke. *Lancet.* 339, 342-344.
- Borges, K., Dingledine, R., 1998. AMPA receptors: Molecular and functional diversity. *Prog Brain Res.* 116, 153-170.
- Bouvier, M., Szatkowski, M., Amato, A., Attwell, D., 1992. The glial cell glutamate uptake carrier countertransports pH-changing anions. *Nature.* 360, 471-474.
- Brini, M., Carafoli, E., 2000. Calcium signalling: A historical account, recent developments and future perspectives. *Cell Mol Life Sci.* 57, 354-370.
- Broderick, J.P., 2004. William M. feinberg lecture: Stroke therapy in the year 2025: Burden, breakthroughs, and barriers to progress. *Stroke.* 35, 205-211.
- Brouns, R., De Deyn, P.P., 2009. The complexity of neurobiological processes in acute ischemic stroke. *Clin Neurol Neurosurg.* 111, 483-495.
- Brouns, R., Sheorajpanday, R., Wauters, A., De Surgeloose, D., Marien, P., De Deyn, P.P., 2008. Evaluation of lactate as a marker of metabolic stress and cause of secondary damage in acute ischemic stroke or TIA. *Clin Chim Acta.* 397, 27-31.
- Brown, A.W., Marlowe, K.J., Bjelke, B., 2003. Age effect on motor recovery in a post-acute animal stroke model. *Neurobiol Aging.* 24, 607-614.
- Burnashev, N., 1998. Calcium permeability of ligand-gated channels. *Cell Calcium.* 24, 325-332.
- Burnashev, N., Monyer, H., Seeburg, P.H., Sakmann, B., 1992. Divalent ion permeability of AMPA receptor channels is dominated by the edited form of a single subunit. *Neuron.* 8, 189-198.
- Butterfield, D.A., Lange, M.L., 2009. Multifunctional roles of enolase in alzheimer's disease brain: Beyond altered glucose metabolism. *J Neurochem.* 111, 915-933.
- Camacho, A., Massieu, L., 2006. Role of glutamate transporters in the clearance and release of glutamate during ischemia and its relation to neuronal death. *Arch Med Res.* 37, 11-18.

- Chamorro, A., Hallenbeck, J., 2006. The harms and benefits of inflammatory and immune responses in vascular disease. *Stroke*. 37, 291-293.
- Chan, P.H., 2001. Reactive oxygen radicals in signaling and damage in the ischemic brain. *J Cereb Blood Flow Metab*. 21, 2-14.
- Chatterton, J.E., Awobuluyi, M., Premkumar, L.S., Takahashi, H., Talantova, M., Shin, Y., Cui, J., Tu, S., Sevarino, K.A., Nakanishi, N., Tong, G., Lipton, S.A., Zhang, D., 2002. Excitatory glycine receptors containing the NR3 family of NMDA receptor subunits. *Nature*. 415, 793-798.
- Chaudhry, F.A., Lehre, K.P., van Lookeren Campagne, M., Ottersen, O.P., Danbolt, N.C., Storm-Mathisen, J., 1995. Glutamate transporters in glial plasma membranes: Highly differentiated localizations revealed by quantitative ultrastructural immunocytochemistry. *Neuron*. 15, 711-720.
- Chen, B.S., Roche, K.W., 2007. Regulation of NMDA receptors by phosphorylation. *Neuropharmacology*. 53, 362-368.
- Chen, L., Chetkovich, D.M., Petralia, R.S., Sweeney, N.T., Kawasaki, Y., Wenthold, R.J., Brecht, D.S., Nicoll, R.A., 2000. Stargazin regulates synaptic targeting of AMPA receptors by two distinct mechanisms. *Nature*. 408, 936-943.
- Chen, M., Lu, T.J., Chen, X.J., Zhou, Y., Chen, Q., Feng, X.Y., Xu, L., Duan, W.H., Xiong, Z.Q., 2008. Differential roles of NMDA receptor subtypes in ischemic neuronal cell death and ischemic tolerance. *Stroke*. 39, 3042-3048.
- Chen, W., Mahadomrongkul, V., Berger, U.V., Bassan, M., DeSilva, T., Tanaka, K., Irwin, N., Aoki, C., Rosenberg, P.A., 2004. The glutamate transporter GLT1a is expressed in excitatory axon terminals of mature hippocampal neurons. *J Neurosci*. 24, 1136-1148.
- Choi, D.W., 1996. Ischemia-induced neuronal apoptosis. *Curr Opin Neurobiol*. 6, 667-672.
- Choi, D.W., 1995. Calcium: Still center-stage in hypoxic-ischemic neuronal death. *Trends Neurosci*. 18, 58-60.
- Chong, Z.Z., Xu, Q.P., Sun, J.N., 2001. Effects and mechanisms of triacetylshikimic acid on platelet adhesion to neutrophils induced by thrombin and reperfusion after focal cerebral ischemia in rats. *Acta Pharmacol Sin*. 22, 679-684.
- Chopp, M., Zhang, R.L., Chen, H., Li, Y., Jiang, N., Rusche, J.R., 1994. Postischemic administration of an anti-mac-1 antibody reduces ischemic cell damage after transient middle cerebral artery occlusion in rats. *Stroke*. 25, 869-75; discussion 875-6.
- Clayton, D.A., Mesches, M.H., Alvarez, E., Bickford, P.C., Browning, M.D., 2002. A hippocampal NR2B deficit can mimic age-related changes in long-term potentiation and spatial learning in the fischer 344 rat. *J Neurosci*. 22, 3628-3637.
- Clements, J.D., Lester, R.A., Tong, G., Jahr, C.E., Westbrook, G.L., 1992. The time course of glutamate in the synaptic cleft. *Science*. 258, 1498-1501.

- Cobo, M., Exposito, I., Mora, F., 1993. Aging, prefrontal cortex, and amino acid neurotransmitters: Differential effects produced by electrical stimulation. *Neurobiol Aging*. 14, 187-190.
- Cole, D.J., Patel, P.M., Reynolds, L., Drummond, J.C., Marcantonio, S., 1993. Temporary focal cerebral ischemia in spontaneously hypertensive rats: The effect of ibuprofen on infarct volume. *J Pharmacol Exp Ther*. 266, 1713-1717.
- Collingridge, G.L., Lester, R.A., 1989. Excitatory amino acid receptors in the vertebrate central nervous system. *Pharmacol Rev*. 41, 143-210.
- Cotman, C.W., Geddes, J.W., Bridges, R.J., Monaghan, D.T., 1989. N-methyl-D-aspartate receptors and alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*. 10, 603-5; discussion 618-20.
- Coyle, J.T., Puttfarcken, P., 1993. Oxidative stress, glutamate, and neurodegenerative disorders. *Science*. 262, 689-695.
- Craig, A.M., Blackstone, C.D., Haganir, R.L., Banker, G., 1993. The distribution of glutamate receptors in cultured rat hippocampal neurons: Postsynaptic clustering of AMPA-selective subunits. *Neuron*. 10, 1055-1068.
- Cull-Candy, S., Brickley, S., Farrant, M., 2001. NMDA receptor subunits: Diversity, development and disease. *Curr Opin Neurobiol*. 11, 327-335.
- Danbolt, N.C., 2001. Glutamate uptake. *Prog Neurobiol*. 65, 1-105.
- Daniels, K.K., Vickroy, T.W., 1998. Simultaneous isolation of glial and neuronal fractions from rat brain homogenates: Comparison of high-affinity L-glutamate transport properties. *Neurochem Res*. 23, 103-113.
- Das, S., Sasaki, Y.F., Rothe, T., Premkumar, L.S., Takasu, M., Crandall, J.E., Dikkes, P., Conner, D.A., Rayudu, P.V., Cheung, W., Chen, H.S., Lipton, S.A., Nakanishi, N., 1998. Increased NMDA current and spine density in mice lacking the NMDA receptor subunit NR3A. *Nature*. 393, 377-381.
- David, J.P., Ghazali, F., Fallet-Bianco, C., Watez, A., Delaine, S., Boniface, B., Di Menza, C., Delacourte, A., 1997. Glial reaction in the hippocampal formation is highly correlated with aging in human brain. *Neurosci Lett*. 235, 53-56.
- Davies, N.M., Skjodt, N.M., 1999. Clinical pharmacokinetics of meloxicam. A cyclooxygenase-2 preferential nonsteroidal anti-inflammatory drug. *Clin Pharmacokinet*. 36, 115-126.
- Davis, J.M., Himwich, W.A., Pederson, V.C., 1970. Hypoglycemia and developmental changes in free amino acids of rat brain. *J Appl Physiol*. 29, 219-222.
- Davis, M., Mendelow, A.D., Perry, R.H., Chambers, I.R., James, O.F., 1995. Experimental stroke and neuroprotection in the aging rat brain. *Stroke*. 26, 1072-1078.
- Davolio, C., Greenamyre, J.T., 1995. Selective vulnerability of the CA1 region of hippocampus to the indirect excitotoxic effects of malonic acid. *Neurosci Lett*. 192, 29-32.

- Dawson, L.A., Djali, S., Gonzales, C., Vinegra, M.A., Zaleska, M.M., 2000. Characterization of transient focal ischemia-induced increases in extracellular glutamate and aspartate in spontaneously hypertensive rats. *Brain Res Bull.* 53, 767-776.
- Degoute, C.S., 2007. Controlled hypotension: A guide to drug choice. *Drugs.* 67, 1053-1076.
- DeGracia, D.J., Jamison, J.T., Szymanski, J.J., Lewis, M.K., 2008. Translation arrest and ribonucleic acids in post-ischemic brain: Layers and layers of players. *J Neurochem.* 106, 2288-2301.
- del Zoppo, G.J., Hallenbeck, J.M., 2000. Advances in the vascular pathophysiology of ischemic stroke. *Thromb Res.* 98, 73-81.
- del Zoppo, G.J., von Kummer, R., Hamann, G.F., 1998. Ischaemic damage of brain microvessels: Inherent risks for thrombolytic treatment in stroke. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 65, 1-9.
- Diaz-Guzman, J., Egido-Herrero, J.A., Gabriel-Sanchez, R., Barbera, G., Fuentes, B., Fernandez-Perez, C., Abilleira, S., Proyecto Ictus del Grupo de Estudio de Enfermedades Cerebrovasculares de la Sociedad Espanola de Neurologia, 2008. Incidence of strokes in Spain. methodological foundations of the iberictus study. *Rev Neurol.* 47, 617-623.
- Dickstein, D.L., Kabaso, D., Rocher, A.B., Luebke, J.I., Wearne, S.L., Hof, P.R., 2007. Changes in the structural complexity of the aged brain. *Aging Cell.* 6, 275-284.
- Dietrich, W.D., 1994. Morphological manifestations of reperfusion injury in brain. *Ann N Y Acad Sci.* 723, 15-24.
- Dingledine, R., Borges, K., Bowie, D., Traynelis, S.F., 1999. The glutamate receptor ion channels. *Pharmacol Rev.* 51, 7-61.
- Dirnagl, U., Iadecola, C., Moskowitz, M.A., 1999. Pathobiology of ischaemic stroke: An integrated view. *Trends Neurosci.* 22, 391-397.
- Dohmen, C., Bosche, B., Graf, R., Reithmeier, T., Ernestus, R.I., Brinker, G., Sobesky, J., Heiss, W.D., 2007. Identification and clinical impact of impaired cerebrovascular autoregulation in patients with malignant middle cerebral artery infarction. *Stroke.* 38, 56-61.
- Donnan, G.A., Fisher, M., Macleod, M., Davis, S.M., 2008. Stroke. *Lancet.* 371, 1612-1623.
- Dos-Anjos, S., Martinez-Villayandre, B., Montori, S., Regueiro-Purrinos, M.M., Gonzalo-Orden, J.M., Fernandez-Lopez, A., 2009a. Transient global ischemia in rat brain promotes different NMDA receptor regulation depending on the brain structure studied. *Neurochem Int.* 54, 180-185.
- Dos-Anjos, S., Martinez-Villayandre, B., Montori, S., Regueiro-Purrinos, M.M., Gonzalo-Orden, J.M., Fernandez-Lopez, A., 2009b. Global ischemia-induced modifications in the expression of AMPA receptors and inflammation in rat brain. *Brain Res.* 1287, 20-27.

- Drejer, J., Larsson, O.M., Schousboe, A., 1982. Characterization of L-glutamate uptake into and release from astrocytes and neurons cultured from different brain regions. *Exp Brain Res.* 47, 259-269.
- D'Souza, S.W., McConnell, S.E., Slater, P., Barson, A.J., 1993. Glycine site of the excitatory amino acid N-methyl-D-aspartate receptor in neonatal and adult brain. *Arch Dis Child.* 69, 212-215.
- Dubner, R., 2004. The neurobiology of persistent pain and its clinical implications. *Suppl Clin Neurophysiol.* 57, 3-7.
- Eklof, B., Siesjo, B.K., 1972. The effect of bilateral carotid artery ligation upon the blood flow and the energy state of the rat brain. *Acta Physiol Scand.* 86, 155-165.
- Ellgaard, L., Helenius, A., 2003. Quality control in the endoplasmic reticulum. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 4, 181-191.
- Evans, M.D., Cooke, M.S., 2004. Factors contributing to the outcome of oxidative damage to nucleic acids. *Bioessays.* 26, 533-542.
- Fairman, W.A., Vandenberg, R.J., Arriza, J.L., Kavanaugh, M.P., Amara, S.G., 1995. An excitatory amino-acid transporter with properties of a ligand-gated chloride channel. *Nature.* 375, 599-603.
- Feuerstein, G.Z., Wang, X., Barone, F.C., 1997. Inflammatory gene expression in cerebral ischemia and trauma. potential new therapeutic targets. *Ann N Y Acad Sci.* 825, 179-193.
- Fisher, M., Bastan, B., 2008. Treating acute ischemic stroke. *Curr Opin Drug Discov Devel.* 11, 626-632.
- Floyd, R.A., Hensley, K., 2000. Nitron inhibition of age-associated oxidative damage. *Ann N Y Acad Sci.* 899, 222-237.
- Fonnum, F., 1993. Regulation of the synthesis of the transmitter glutamate pool. *Prog Biophys Mol Biol.* 60, 47-57.
- Friedman, L.K., Ginsberg, M.D., Belayev, L., Busto, R., Alonso, O.F., Lin, B., Globus, M.Y., 2001. Intraischemic but not postischemic hypothermia prevents non-selective hippocampal downregulation of AMPA and NMDA receptor gene expression after global ischemia. *Brain Res Mol Brain Res.* 86, 34-47.
- Fukamachi, S., Furuta, A., Ikeda, T., Ikenoue, T., Kaneoka, T., Rothstein, J.D., Iwaki, T., 2001. Altered expressions of glutamate transporter subtypes in rat model of neonatal cerebral hypoxia-ischemia. *Brain Res Dev Brain Res.* 132, 131-139.
- Furukawa, K., Fu, W., Li, Y., Witke, W., Kwiatkowski, D.J., Mattson, M.P., 1997. The actin-severing protein gelsolin modulates calcium channel and NMDA receptor activities and vulnerability to excitotoxicity in hippocampal neurons. *J Neurosci.* 17, 8178-8186.
- Furuta, A., Rothstein, J.D., Martin, L.J., 1997. Glutamate transporter protein subtypes are expressed differentially during rat CNS development. *J Neurosci.* 17, 8363-8375.
- Garcia, J.H., 1984. Experimental ischemic stroke: A review. *Stroke.* 15, 5-14.

- Gates, B.J., Nguyen, T.T., Setter, S.M., Davies, N.M., 2005. Meloxicam: A reappraisal of pharmacokinetics, efficacy and safety. *Expert Opin Pharmacother.* 6, 2117-2140.
- Gazzaley, A.H., Siegel, S.J., Kordower, J.H., Mufson, E.J., Morrison, J.H., 1996. Circuit-specific alterations of N-methyl-D-aspartate receptor subunit 1 in the dentate gyrus of aged monkeys. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93, 3121-3125.
- Gee, C.E., Benquet, P., Raineteau, O., Rietschin, L., Kirbach, S.W., Gerber, U., 2006. NMDA receptors and the differential ischemic vulnerability of hippocampal neurons. *Eur J Neurosci.* 23, 2595-2603.
- Gegelashvili, G., Schousboe, A., 1998. Cellular distribution and kinetic properties of high-affinity glutamate transporters. *Brain Res Bull.* 45, 233-238.
- Gegelashvili, G., Danbolt, N.C., Schousboe, A., 1997. Neuronal soluble factors differentially regulate the expression of the GLT1 and GLAST glutamate transporters in cultured astroglia. *J Neurochem.* 69, 2612-2615.
- Gegelashvili, G., Schousboe, A., 1997. High affinity glutamate transporters: Regulation of expression and activity. *Mol Pharmacol.* 52, 6-15.
- Gil de Castro, R., Gil-Nunez, A.C., 2000. Risk factors for ischemic stroke. I. conventional risk factors. *Rev Neurol.* 31, 314-323.
- Giovannoni, G., 2006. Multiple sclerosis cerebrospinal fluid biomarkers. *Dis Markers.* 22, 187-196.
- Goldberg, M.P., Choi, D.W., 1993. Combined oxygen and glucose deprivation in cortical cell culture: Calcium-dependent and calcium-independent mechanisms of neuronal injury. *J Neurosci.* 13, 3510-3524.
- Gorelick, P.B., 2002. Stroke prevention therapy beyond antithrombotics: Unifying mechanisms in ischemic stroke pathogenesis and implications for therapy: An invited review. *Stroke.* 33, 862-875.
- Gorter, J.A., Petrozzino, J.J., Aronica, E.M., Rosenbaum, D.M., Opitz, T., Bennett, M.V., Connor, J.A., Zukin, R.S., 1997. Global ischemia induces downregulation of Glur2 mRNA and increases AMPA receptor-mediated Ca²⁺ influx in hippocampal CA1 neurons of gerbil. *J Neurosci.* 17, 6179-6188.
- Grady, C.L., Craik, F.I., 2000. Changes in memory processing with age. *Curr Opin Neurobiol.* 10, 224-231.
- Greenamyre, J.T., Maragos, W.F., 1993. Neurotransmitter receptors in alzheimer disease. *Cerebrovasc Brain Metab Rev.* 5, 61-94.
- Greger, I.H., Ziff, E.B., Penn, A.C., 2007. Molecular determinants of AMPA receptor subunit assembly. *Trends Neurosci.* 30, 407-416.
- Greger, I.H., Khatri, L., Ziff, E.B., 2002. RNA editing at arg607 controls AMPA receptor exit from the endoplasmic reticulum. *Neuron.* 34, 759-772.
- Gudermann, T., Nurnberg, B., Schultz, G., 1995. Receptors and G proteins as primary components of transmembrane signal transduction. part 1. G-protein-coupled receptors: Structure and function. *J Mol Med.* 73, 51-63.

- Hajjeva, P., Kuhlmann, C., Luhmann, H.J., Behl, C., 2009. Impaired calcium homeostasis in aged hippocampal neurons. *Neurosci Lett.* 451, 119-123.
- Hamby, A.M., Suh, S.W., Kauppinen, T.M., Swanson, R.A., 2007. Use of a poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor to suppress inflammation and neuronal death after cerebral ischemia-reperfusion. *Stroke.* 38, 632-636.
- Hara, M.R., Snyder, S.H., 2007. Cell signaling and neuronal death. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 47, 117-141.
- Hardemark, H.G., Persson, L., Bolander, H.G., Hillered, L., Olsson, Y., Pahlman, S., 1988. Neuron-specific enolase is a marker of cerebral ischemia and infarct size in rat cerebrospinal fluid. *Stroke.* 19, 1140-1144.
- Harting, M.T., Jimenez, F., Adams, S.D., Mercer, D.W., Cox, C.S., Jr, 2008. Acute, regional inflammatory response after traumatic brain injury: Implications for cellular therapy. *Surgery.* 144, 803-813.
- Hata, R., Maeda, K., Hermann, D., Mies, G., Hossmann, K.A., 2000. Dynamics of regional brain metabolism and gene expression after middle cerebral artery occlusion in mice. *J Cereb Blood Flow Metab.* 20, 306-315.
- Hay, E., Royds, J.A., Davies-Jones, G.A., Lewtas, N.A., Timperley, W.R., Taylor, C.B., 1984. Cerebrospinal fluid enolase in stroke. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 47, 724-729.
- He, Z., Meschia, J.F., Brott, T.G., Dickson, D.W., McKinney, M., 2006. Aging is neuroprotective during global ischemia but leads to increased caspase-3 and apoptotic activity in hippocampal neurons. *Curr Neurovasc Res.* 3, 181-186.
- He, Z., Crook, J.E., Meschia, J.F., Brott, T.G., Dickson, D.W., McKinney, M., 2005. Aging blunts ischemic-preconditioning-induced neuroprotection following transient global ischemia in rats. *Curr Neurovasc Res.* 2, 365-374.
- Hervas-Angulo, A., Cabases-Hita, J.M., Forcen-Alonso, T., 2006. Costs deriving from strokes from a social perspective. A retrospective incidence approach with a follow-up at three years. *Rev Neurol.* 43, 518-525.
- Higuchi, M., Single, F.N., Kohler, M., Sommer, B., Sprengel, R., Seeburg, P.H., 1993. RNA editing of AMPA receptor subunit GluR-B: A base-paired intron-exon structure determines position and efficiency. *Cell.* 75, 1361-1370.
- Hof, P.R., Duan, H., Page, T.L., Einstein, M., Wicinski, B., He, Y., Erwin, J.M., Morrison, J.H., 2002. Age-related changes in GluR2 and NMDAR1 glutamate receptor subunit protein immunoreactivity in corticocortically projecting neurons in macaque and patas monkeys. *Brain Res.* 928, 175-186.
- Hollmann, M., Heinemann, S., 1994. Cloned glutamate receptors. *Annu Rev Neurosci.* 17, 31-108.
- Hollmann, M., Hartley, M., Heinemann, S., 1991. Ca²⁺ permeability of KA-AMPA-gated glutamate receptor channels depends on subunit composition. *Science.* 252, 851-853.

- Hossmann, K.A., 2008. Cerebral ischemia: Models, methods and outcomes. *Neuropharmacology*. 55, 257-270.
- Hossmann, K.A., 1994. Viability thresholds and the penumbra of focal ischemia. *Ann Neurol*. 36, 557-565.
- Hossmann, K.A., 1982. Cerebral vascular disorders: Circulation and metabolism. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2 Suppl 1, S2-4.
- Hume, R.I., Dingledine, R., Heinemann, S.F., 1991. Identification of a site in glutamate receptor subunits that controls calcium permeability. *Science*. 253, 1028-1031.
- Iadecola, C., Alexander, M., 2001. Cerebral ischemia and inflammation. *Curr Opin Neurol*. 14, 89-94.
- Ichinose, T., Yu, S., Wang, X.Q., Yu, S.P., 2003. Ca²⁺-independent, but voltage- and activity-dependent regulation of the NMDA receptor outward K⁺ current in mouse cortical neurons. *J Physiol*. 551, 403-417.
- Instituto Nacional de Estadística. Salud. España en cifras 2008. Madrid: INE; 2008. p. 18.
- Jamison, J.T., Kayali, F., Rudolph, J., Marshall, M., Kimball, S.R., DeGracia, D.J., 2008. Persistent redistribution of poly-adenylated mRNAs correlates with translation arrest and cell death following global brain ischemia and reperfusion. *Neuroscience*. 154, 504-520.
- Jiang, J., Suppiramaniam, V., Wooten, M.W., 2006. Posttranslational modifications and receptor-associated proteins in AMPA receptor trafficking and synaptic plasticity. *Neurosignals*. 15, 266-282.
- Jiang, X., Mu, D., Manabat, C., Koshy, A.A., Christen, S., Tauber, M.G., Vexler, Z.S., Ferriero, D.M., 2004. Differential vulnerability of immature murine neurons to oxygen-glucose deprivation. *Exp Neurol*. 190, 224-232.
- Johnson, E.M., Jr, Deckwerth, T.L., 1993. Molecular mechanisms of developmental neuronal death. *Annu Rev Neurosci*. 16, 31-46.
- Jonas, P., Burnashev, N., 1995. Molecular mechanisms controlling calcium entry through AMPA-type glutamate receptor channels. *Neuron*. 15, 987-990.
- Kagansky, N., Levy, S., Knobler, H., 2001. The role of hyperglycemia in acute stroke. *Arch Neurol*. 58, 1209-1212.
- Kanai, Y., Hediger, M.A., 1992. Primary structure and functional characterization of a high-affinity glutamate transporter. *Nature*. 360, 467-471.
- Kanner, B.I., Schuldiner, S., 1987. Mechanism of transport and storage of neurotransmitters. *CRC Crit Rev Biochem*. 22, 1-38.
- Katsura, K., Kristian, T., Siesjo, B.K., 1994. Energy metabolism, ion homeostasis, and cell damage in the brain. *Biochem Soc Trans*. 22, 991-996.
- Kawano, T., Anrather, J., Zhou, P., Park, L., Wang, G., Frye, K.A., Kunz, A., Cho, S., Orio, M., Iadecola, C., 2006. Prostaglandin E2 EP1 receptors: Downstream effectors of COX-2 neurotoxicity. *Nat Med*. 12, 225-229.

- Kelly, S., McCulloch, J., Horsburgh, K., 2001. Minimal ischaemic neuronal damage and HSP70 expression in MF1 strain mice following bilateral common carotid artery occlusion. *Brain Res.* 914, 185-195.
- Kerr, J.F., Wyllie, A.H., Currie, A.R., 1972. Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer.* 26, 239-257.
- Khairnar, A., Plumitallo, A., Frau, L., Schintu, N., Morelli, M., 2009. Caffeine enhances astroglia and microglia reactivity induced by 3,4-methylenedioxymethamphetamine ('ecstasy') in mouse brain. *Neurotox Res.*
- Kidwell, C.S., Saver, J.L., Mattiello, J., Starkman, S., Vinuela, F., Duckwiler, G., Gobin, Y.P., Jahan, R., Vespa, P., Villablanca, J.P., Liebeskind, D.S., Woods, R.P., Alger, J.R., 2001. Diffusion-perfusion MRI characterization of post-recanalization hyperperfusion in humans. *Neurology.* 57, 2015-2021.
- Kim, S.U., de Vellis, J., 2005. Microglia in health and disease. *J Neurosci Res.* 81, 302-313.
- Kirino, T., 1982. Delayed neuronal death in the gerbil hippocampus following ischemia. *Brain Res.* 239, 57-69.
- Kiyama, H., Kiryu-Seo, S., 2007. Multiple functions of glutamate transporter EAAC1 in motor neurons. *Brain Nerve.* 59, 1325-1332.
- Kornau, H.C., Schenker, L.T., Kennedy, M.B., Seeburg, P.H., 1995. Domain interaction between NMDA receptor subunits and the postsynaptic density protein PSD-95. *Science.* 269, 1737-1740.
- Kowalczyk, J.E., Beresewicz, M., Gajkowska, B., Zablocka, B., 2009. Association of protein kinase C delta and phospholipid scramblase 3 in hippocampal mitochondria correlates with neuronal vulnerability to brain ischemia. *Neurochem Int.* 55, 157-163.
- Kriz, J., 2006. Inflammation in ischemic brain injury: Timing is important. *Crit Rev Neurobiol.* 18, 145-157.
- Kumari Naga, K., Panigrahi, M., Prakash Babu, P., 2007. Changes in endogenous antioxidant enzymes during cerebral ischemia and reperfusion. *Neurol Res.* 29, 877-883.
- Kuroda, S., Siesjo, B.K., 1997. Reperfusion damage following focal ischemia: Pathophysiology and therapeutic windows. *Clin Neurosci.* 4, 199-212.
- Kutsuwada, T., Kashiwabuchi, N., Mori, H., Sakimura, K., Kushiya, E., Araki, K., Meguro, H., Masaki, H., Kumanishi, T., Arakawa, M., 1992. Molecular diversity of the NMDA receptor channel. *Nature.* 358, 36-41.
- Kwak, S., Weiss, J.H., 2006. Calcium-permeable AMPA channels in neurodegenerative disease and ischemia. *Curr Opin Neurobiol.* 16, 281-287.
- Láinez, J.M., Satoja, J.M., 1999. Historia natural de la enfermedad vascular cerebral. En: Castillo J, Álvarez J, Martí- Villalta JL y cols. *Manual de Enfermedades Vasculares Cerebrales.* Barcelona JR.Prous España; 1995: 55-60.

- Lee, J.M., Zipfel, G.J., Choi, D.W., 1999. The changing landscape of ischaemic brain injury mechanisms. *Nature* 399, A7-14.
- Lehre, K.P., Levy, L.M., Ottersen, O.P., Storm-Mathisen, J., Danbolt, N.C., 1995. Differential expression of two glial glutamate transporters in the rat brain: Quantitative and immunocytochemical observations. *J Neurosci.* 15, 1835-1853.
- Leist, M., Nicotera, P., 1998. Calcium and neuronal death. *Rev Physiol Biochem Pharmacol.* 132, 79-125.
- Lester, R.A., Clements, J.D., Westbrook, G.L., Jahr, C.E., 1990. Channel kinetics determine the time course of NMDA receptor-mediated synaptic currents. *Nature.* 346, 565-567.
- Levine, S., Payan, H., 1966. Effects of ischemia and other procedures on the brain and retina of the gerbil (*Meriones unguiculatus*). *Exp Neurol.* 16, 255-262.
- Lewen, A., Matz, P., Chan, P.H., 2000. Free radical pathways in CNS injury. *J Neurotrauma.* 17, 871-890.
- Lipton, P., 1999. Ischemic cell death in brain neurons. *Physiol Rev.* 79, 1431-1568.
- Liu, B., Liao, M., Mielke, J.G., Ning, K., Chen, Y., Li, L., El-Hayek, Y.H., Gomez, E., Zukin, R.S., Fehlings, M.G., Wan, Q., 2006. Ischemic insults direct glutamate receptor subunit 2-lacking AMPA receptors to synaptic sites. *J Neurosci.* 26, 5309-5319.
- Liu, P., Smith, P.F., Darlington, C.L., 2008. Glutamate receptor subunits expression in memory-associated brain structures: Regional variations and effects of aging. *Synapse.* 62, 834-841.
- Liu, P.K., Hsu, C.Y., Dizdaroglu, M., Floyd, R.A., Kow, Y.W., Karakaya, A., Rabow, L.E., Cui, J.K., 1996. Damage, repair, and mutagenesis in nuclear genes after mouse forebrain ischemia-reperfusion. *J Neurosci.* 16, 6795-6806.
- Liu, S., Lau, L., Wei, J., Zhu, D., Zou, S., Sun, H.S., Fu, Y., Liu, F., Lu, Y., 2004. Expression of Ca^{2+} -permeable AMPA receptor channels primes cell death in transient forebrain ischemia. *Neuron.* 43, 43-55.
- Livak, K.J., Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C(T)}$ method. *Methods.* 25, 402-408.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 193, 265-275.
- Lucin, K.M., Wyss-Coray, T., 2009. Immune activation in brain aging and neurodegeneration: Too much or too little? *Neuron.* 64, 110-122.
- Luebke, J.I., Chang, Y.M., Moore, T.L., Rosene, D.L., 2004. Normal aging results in decreased synaptic excitation and increased synaptic inhibition of layer 2/3 pyramidal cells in the monkey prefrontal cortex. *Neuroscience.* 125, 277-288.
- Lynch, D.R., Guttman, R.P., 2002. Excitotoxicity: Perspectives based on N-methyl-D-aspartate receptor subtypes. *J Pharmacol Exp Ther.* 300, 717-723.

- MacDermott, A.B., Mayer, M.L., Westbrook, G.L., Smith, S.J., Barker, J.L., 1986. NMDA-receptor activation increases cytoplasmic calcium concentration in cultured spinal cord neurones. *Nature*. 321, 519-522.
- Maffucci, J.A., Noel, M.L., Gillette, R., Wu, D., Gore, A.C., 2009. Age- and hormone-regulation of NMDA receptor subunit NR2b in the anteroventral periventricular nucleus (AVPV) of the female rat: Implications for reproductive senescence. *J Neuroendocrinol*.
- Magnusson, K.R., Kresge, D., Supon, J., 2006. Differential effects of aging on NMDA receptors in the intermediate versus the dorsal hippocampus. *Neurobiol Aging*. 27, 324-333.
- Magnusson, K.R., 1995. Differential effects of aging on binding sites of the activated NMDA receptor complex in mice. *Mech Ageing Dev*. 84, 227-243.
- Magnusson, K.R., Cotman, C.W., 1993. Age-related changes in excitatory amino acid receptors in two mouse strains. *Neurobiol Aging*. 14, 197-206.
- Manabe, Y., Anrather, J., Kawano, T., Niwa, K., Zhou, P., Ross, M.E., Iadecola, C., 2004. Prostanoids, not reactive oxygen species, mediate COX-2-dependent neurotoxicity. *Ann Neurol*. 55, 668-675.
- Marks, J.D., Bindokas, V.P., Zhang, X.M., 2000. Maturation of vulnerability to excitotoxicity: Intracellular mechanisms in cultured postnatal hippocampal neurons. *Brain Res Dev Brain Res*. 124, 101-116.
- Markus, R., Reutens, D.C., Kazui, S., Read, S., Wright, P., Pearce, D.C., Tochon-Danguy, H.J., Sachinidis, J.I., Donnan, G.A., 2004. Hypoxic tissue in ischaemic stroke: Persistence and clinical consequences of spontaneous survival. *Brain*. 127, 1427-1436.
- Markus, T.M., Tsai, S.Y., Bollnow, M.R., Farrer, R.G., O'Brien, T.E., Kindler-Baumann, D.R., Rausch, M., Rudin, M., Wiessner, C., Mir, A.K., Schwab, M.E., Kartje, G.L., 2005. Recovery and brain reorganization after stroke in adult and aged rats. *Ann Neurol*. 58, 950-953.
- Martin, L.J., Al-Abdulla, N.A., Brambrink, A.M., Kirsch, J.R., Sieber, F.E., Portera-Cailliau, C., 1998. Neurodegeneration in excitotoxicity, global cerebral ischemia, and target deprivation: A perspective on the contributions of apoptosis and necrosis. *Brain Res Bull*. 46, 281-309.
- Martin, L.J., Blackstone, C.D., Levey, A.I., Huganir, R.L., Price, D.L., 1993. AMPA glutamate receptor subunits are differentially distributed in rat brain. *Neuroscience*. 53, 327-358.
- Martin, R.L., Lloyd, H.G., Cowan, A.I., 1994. The early events of oxygen and glucose deprivation: Setting the scene for neuronal death? *Trends Neurosci*. 17, 251-257.
- Martone, M.E., Hu, B.R., Ellisman, M.H., 2000. Alterations of hippocampal postsynaptic densities following transient ischemia. *Hippocampus*. 10, 610-616.
- Massaro, A.R., Scivoletto, G., Tonali, P., 1990. Cerebrospinal fluid markers in neurological disorders. *Ital J Neurol Sci*. 11, 537-547.

- Masson, J., Sagne, C., Hamon, M., El Mestikawy, S., 1999. Neurotransmitter transporters in the central nervous system. *Pharmacol Rev.* 51, 439-464.
- Mayer, M.L., 2006. Glutamate receptors at atomic resolution. *Nature.* 440, 456-462.
- Mayer, M.L., Westbrook, G.L., 1987. Permeation and block of N-methyl-D-aspartic acid receptor channels by divalent cations in mouse cultured central neurones. *J Physiol.* 394, 501-527.
- Mayer, M.L., Westbrook, G.L., Guthrie, P.B., 1984. Voltage-dependent block by Mg²⁺ of NMDA responses in spinal cord neurones. *Nature.* 309, 261-263.
- McBain, C.J., Mayer, M.L., 1994. N-methyl-D-aspartic acid receptor structure and function. *Physiol Rev.* 74, 723-760.
- McGeer, P.L., McGeer, E.G., 1995. The inflammatory response system of brain: Implications for therapy of alzheimer and other neurodegenerative diseases. *Brain Res Brain Res Rev.* 21, 195-218.
- Meguro, H., Mori, H., Araki, K., Kushiya, E., Kutsuwada, T., Yamazaki, M., Kumanishi, T., Arakawa, M., Sakimura, K., Mishina, M., 1992. Functional characterization of a heteromeric NMDA receptor channel expressed from cloned cDNAs. *Nature.* 357, 70-74.
- Mehta, S.L., Manhas, N., Raghubir, R., 2007. Molecular targets in cerebral ischemia for developing novel therapeutics. *Brain Res Rev.* 54, 34-66.
- Meldrum, B., Garthwaite, J., 1990. Excitatory amino acid neurotoxicity and neurodegenerative disease. *Trends Pharmacol Sci.* 11, 379-387.
- Meldrum, B., Evans, M., Griffiths, T., Simon, R., 1985. Ischaemic brain damage: The role of excitatory activity and of calcium entry. *Br J Anaesth.* 57, 44-46.
- Meldrum, B.S., 2000. Glutamate as a neurotransmitter in the brain: Review of physiology and pathology. *J Nutr.* 130, 1007S-15S.
- Mesches, M.H., Gemma, C., Veng, L.M., Allgeier, C., Young, D.A., Browning, M.D., Bickford, P.C., 2004. Sulindac improves memory and increases NMDA receptor subunits in aged fischer 344 rats. *Neurobiol Aging.* 25, 315-324.
- Mitani, A., Tanaka, K., 2003. Functional changes of glial glutamate transporter GLT-1 during ischemia: An in vivo study in the hippocampal CA1 of normal mice and mutant mice lacking GLT-1. *J Neurosci.* 23, 7176-7182.
- Miyoshi, R., Kito, S., Doudou, N., Nomoto, T., 1991. Effect of age on alpha-amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionic acid (AMPA) binding sites in the rat brain studied by in vitro autoradiography. *Neurochem Res.* 16, 849-854.
- Mongin, A.A., 2007. Disruption of ionic and cell volume homeostasis in cerebral ischemia: The perfect storm. *Pathophysiology.* 14, 183-193.
- Monyer, H., Burnashev, N., Laurie, D.J., Sakmann, B., Seeburg, P.H., 1994. Developmental and regional expression in the rat brain and functional properties of four NMDA receptors. *Neuron.* 12, 529-540.

- Monyer, H., Sprengel, R., Schoepfer, R., Herb, A., Higuchi, M., Lomeli, H., Burnashev, N., Sakmann, B., Seeburg, P.H., 1992. Heteromeric NMDA receptors: Molecular and functional distinction of subtypes. *Science*. 256, 1217-1221.
- Monyer, H., Seeburg, P.H., Wisden, W., 1991. Glutamate-operated channels: Developmentally early and mature forms arise by alternative splicing. *Neuron*. 6, 799-810.
- Mori, H., Mishina, M., 1995. Structure and function of the NMDA receptor channel. *Neuropharmacology*. 34, 1219-1237.
- Morikawa, E., Mori, H., Kiyama, Y., Mishina, M., Asano, T., Kirino, T., 1998. Attenuation of focal ischemic brain injury in mice deficient in the epsilon1 (NR2A) subunit of NMDA receptor. *J Neurosci*. 18, 9727-9732.
- Moriyoshi, K., Masu, M., Ishii, T., Shigemoto, R., Mizuno, N., Nakanishi, S., 1991. Molecular cloning and characterization of the rat NMDA receptor. *Nature*. 354, 31-37.
- Muntner, P., Garrett, E., Klag, M.J., Coresh, J., 2002. Trends in stroke prevalence between 1973 and 1991 in the US population 25 to 74 years of age. *Stroke*. 33, 1209-1213.
- Muralikrishna Adibhatla, R., Hatcher, J.F., 2006. Phospholipase A2, reactive oxygen species, and lipid peroxidation in cerebral ischemia. *Free Radic Biol Med*. 40, 376-387.
- Nagesh, V., Welch, K.M., Windham, J.P., Patel, S., Levine, S.R., Hearshen, D., Peck, D., Robbins, K., D'Olhaberriague, L., Soltanian-Zadeh, H., Boska, M.D., 1998. Time course of ADCw changes in ischemic stroke: Beyond the human eye! *Stroke*. 29, 1778-1782.
- Nakanishi, S., 1992. Molecular diversity of glutamate receptors and implications for brain function. *Science*. 258, 597-603.
- Namura, S., Zhu, J., Fink, K., Endres, M., Srinivasan, A., Tomaselli, K.J., Yuan, J., Moskowitz, M.A., 1998. Activation and cleavage of caspase-3 in apoptosis induced by experimental cerebral ischemia. *J Neurosci*. 18, 3659-3668.
- Navarro, A., Gomez, C., Sanchez-Pino, M.J., Gonzalez, H., Bandez, M.J., Boveris, A.D., Boveris, A., 2005. Vitamin E at high doses improves survival, neurological performance, and brain mitochondrial function in aging male mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 289, R1392-9.
- Nestler, E.J., Barrot, M., Self, D.W., 2001. DeltaFosB: A sustained molecular switch for addiction. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 98, 11042-11046.
- Nicholls, D., Attwell, D., 1990. The release and uptake of excitatory amino acids. *Trends Pharmacol Sci*. 11, 462-468.
- Nickell, J., Salvatore, M.F., Pomerleau, F., Apparsundaram, S., Gerhardt, G.A., 2007. Reduced plasma membrane surface expression of GLAST mediates decreased glutamate regulation in the aged striatum. *Neurobiol Aging*. 28, 1737-1748.
- Nicoli, F., Lefur, Y., Denis, B., Ranjeva, J.P., Confort-Gouny, S., Cozzone, P.J., 2003. Metabolic counterpart of decreased apparent diffusion coefficient during hyperacute

ischemic stroke: A brain proton magnetic resonance spectroscopic imaging study. *Stroke*. 34, e82-7.

- Nishi, M., Hinds, H., Lu, H.P., Kawata, M., Hayashi, Y., 2001. Motoneuron-specific expression of NR3B, a novel NMDA-type glutamate receptor subunit that works in a dominant-negative manner. *J Neurosci*. 21, RC185.
- Nita, D.A., Nita, V., Spulber, S., Moldovan, M., Popa, D.P., Zagrean, A.M., Zagrean, L., 2001. Oxidative damage following cerebral ischemia depends on reperfusion - a biochemical study in rat. *J Cell Mol Med*. 5, 163-170.
- Nogawa, S., Forster, C., Zhang, F., Nagayama, M., Ross, M.E., Iadecola, C., 1998. Interaction between inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 after cerebral ischemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 95, 10966-10971.
- Nogawa, S., Zhang, F., Ross, M.E., Iadecola, C., 1997. Cyclo-oxygenase-2 gene expression in neurons contributes to ischemic brain damage. *J Neurosci*. 17, 2746-2755.
- Noh, K.M., Yokota, H., Mashiko, T., Castillo, P.E., Zukin, R.S., Bennett, M.V., 2005. Blockade of calcium-permeable AMPA receptors protects hippocampal neurons against global ischemia-induced death. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 102, 12230-12235.
- Northington, F.J., Traystman, R.J., Koehler, R.C., Martin, L.J., 1999. GLT1, glial glutamate transporter, is transiently expressed in neurons and develops astrocyte specificity only after midgestation in the ovine fetal brain. *J Neurobiol*. 39, 515-526.
- Nowak, L., Bregestovski, P., Ascher, P., Herbet, A., Prochiantz, A., 1984. Magnesium gates glutamate-activated channels in mouse central neurones. *Nature*. 307, 462-465.
- Obrenovitch, T.P., 1995. The ischaemic penumbra: Twenty years on. *Cerebrovasc Brain Metab Rev*. 7, 297-323.
- Oguro, K., Oguro, N., Kojima, T., Grooms, S.Y., Calderone, A., Zheng, X., Bennett, M.V., Zukin, R.S., 1999. Knockdown of AMPA receptor GluR2 expression causes delayed neurodegeneration and increases damage by sublethal ischemia in hippocampal CA1 and CA3 neurons. *J Neurosci*. 19, 9218-9227.
- Olson, E.E., McKeon, R.J., 2004. Characterization of cellular and neurological damage following unilateral hypoxia/ischemia. *J Neurol Sci*. 227, 7-19.
- Opitz, T., Grooms, S.Y., Bennett, M.V., Zukin, R.S., 2000. Remodeling of alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole-propionic acid receptor subunit composition in hippocampal neurons after global ischemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 97, 13360-13365.
- Ordy, J.M., Wengenack, T.M., Bialobok, P., Coleman, P.D., Rodier, P., Baggs, R.B., Dunlap, W.P., Kates, B., 1993. Selective vulnerability and early progression of hippocampal CA1 pyramidal cell degeneration and GFAP-positive astrocyte reactivity in the rat four-vessel occlusion model of transient global ischemia. *Exp Neurol*. 119, 128-139.

- Ozawa, S., Kamiya, H., Tsuzuki, K., 1998. Glutamate receptors in the mammalian central nervous system. *Prog Neurobiol.* 54, 581-618.
- Pagliusi, S.R., Gerrard, P., Abdallah, M., Talabot, D., Catsicas, S., 1994. Age-related changes in expression of AMPA-selective glutamate receptor subunits: Is calcium-permeability altered in hippocampal neurons? *Neuroscience.* 61, 429-433.
- Pan, J., Konstas, A.A., Bateman, B., Ortolano, G.A., Pile-Spellman, J., 2007. Reperfusion injury following cerebral ischemia: Pathophysiology, MR imaging, and potential therapies. *Neuroradiology.* 49, 93-102.
- Paupard, M.-., O'Connell, M.A., Gerber, A.P., Zukin, R.S., 2000. Patterns of developmental expression of the RNA editing enzyme rADAR2. *Neuroscience.* 95, 869-879.
- Pellegrini-Giampietro, D.E., Gorter, J.A., Bennett, M.V., Zukin, R.S., 1997. The GluR2 (GluR-B) hypothesis: Ca(2+)-permeable AMPA receptors in neurological disorders. *Trends Neurosci.* 20, 464-470.
- Peng, P.L., Zhong, X., Tu, W., Soundarapandian, M.M., Molner, P., Zhu, D., Lau, L., Liu, S., Liu, F., Lu, Y., 2006. ADAR2-dependent RNA editing of AMPA receptor subunit GluR2 determines vulnerability of neurons in forebrain ischemia. *Neuron.* 49, 719-733.
- Petcu, E.B., Sfredel, V., Platt, D., Herndon, J.G., Kessler, C., Popa-Wagner, A., 2008. Cellular and molecular events underlying the dysregulated response of the aged brain to stroke: A mini-review. *Gerontology.* 54, 6-17.
- Pfaffl, M.W., 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 29, e45.
- Pforte, C., Henrich-Noack, P., Baldauf, K., Reymann, K.G., 2005. Increase in proliferation and gliogenesis but decrease of early neurogenesis in the rat forebrain shortly after transient global ischemia. *Neuroscience.* 136, 1133-1146.
- Phillis, J.W., Ren, J., O'Regan, M.H., 2000. Transporter reversal as a mechanism of glutamate release from the ischemic rat cerebral cortex: Studies with DL-threo-beta-benzyloxyaspartate. *Brain Res.* 868, 105-112.
- Pines, G., Danbolt, N.C., Bjoras, M., Zhang, Y., Bendahan, A., Eide, L., Koepsell, H., Storm-Mathisen, J., Seeberg, E., Kanner, B.I., 1992. Cloning and expression of a rat brain L-glutamate transporter. *Nature.* 360, 464-467.
- Popa-Wagner, A., Schroder, E., Walker, L.C., Kessler, C., 1998. Beta-amyloid precursor protein and ss-amyloid peptide immunoreactivity in the rat brain after middle cerebral artery occlusion: Effect of age. *Stroke.* 29, 2196-2202.
- Price, M.T., Olney, J.W., Haft, R., 1981. Age-related changes in glutamate concentration and synaptosomal glutamate uptake in adult rat striatum. *Life Sci.* 28, 1365-1370.
- Prieto-Arribas, R., Moreno-Gutierrez, A., Simal-Hernandez, P., Pascual-Garvi, J.M., Matias-Guiu, J., Roda, J.M., Barcia-Albacar, J.A., 2008. Experimental models of cerebral ischemia. *Rev Neurol.* 47, 414-426.

- Prolla, T.A., Mattson, M.P., 2001. Molecular mechanisms of brain aging and neurodegenerative disorders: Lessons from dietary restriction. *Trends Neurosci.* 24, S21-31.
- Pujadas, R., Arboix, A., Anguera, N., Oliveres, M., Massons, J., Comes, E., 2005. Role of complex aortic atheroma plaques in the recurrence of unexplained cerebral infarction. *Rev Esp Cardiol.* 58, 34-40.
- Pulsinelli, W.A., Brierley, J.B., Plum, F., 1982. Temporal profile of neuronal damage in a model of transient forebrain ischemia. *Ann Neurol.* 11, 491-498.
- Pulsinelli, W.A., Brierley, J.B., 1979. A new model of bilateral hemispheric ischemia in the unanesthetized rat. *Stroke.* 10, 267-272.
- Rafiki, A., Bernard, A., Medina, I., Gozlan, H., Khrestchatisky, M., 2000. Characterization in cultured cerebellar granule cells and in the developing rat brain of mRNA variants for the NMDA receptor 2C subunit. *J Neurochem.* 74, 1798-1808.
- Raghavendra Rao, V.L., Rao, A.M., Dogan, A., Bowen, K.K., Hatcher, J., Rothstein, J.D., Dempsey, R.J., 2000. Glial glutamate transporter GLT-1 down-regulation precedes delayed neuronal death in gerbil hippocampus following transient global cerebral ischemia. *Neurochem Int.* 36, 531-537.
- Rao, V.L., Bowen, K.K., Dempsey, R.J., 2001. Transient focal cerebral ischemia down-regulates glutamate transporters GLT-1 and EAAC1 expression in rat brain. *Neurochem Res.* 26, 497-502.
- Raza, M., Deshpande, L.S., Blair, R.E., Carter, D.S., Sombati, S., DeLorenzo, R.J., 2007. Aging is associated with elevated intracellular calcium levels and altered calcium homeostatic mechanisms in hippocampal neurons. *Neurosci Lett.* 418, 77-81.
- Read, S.J., Hirano, T., Abbott, D.F., Sachinidis, J.I., Tochon-Danguy, H.J., Chan, J.G., Egan, G.F., Scott, A.M., Bladin, C.F., McKay, W.J., Donnan, G.A., 1998. Identifying hypoxic tissue after acute ischemic stroke using PET and 18F-fluoromisonidazole. *Neurology.* 51, 1617-1621.
- Robbins, J., 1959. The excitation and inhibition of crustacean muscle by amino acids. *J Physiol.* 148, 39-50.
- Roberts, E.L., Jr, Chih, C.P., Rosenthal, M., 1997. Age-related changes in brain metabolism and vulnerability to anoxia. *Adv Exp Med Biol.* 411, 83-89.
- Rodriguez-Yanez, M., Castillo, J., 2008. Role of inflammatory markers in brain ischemia. *Curr Opin Neurol.* 21, 353-357.
- Rosenberg, G.A., Cunningham, L.A., Wallace, J., Alexander, S., Estrada, E.Y., Grossetete, M., Razhagi, A., Miller, K., Gearing, A., 2001. Immunohistochemistry of matrix metalloproteinases in reperfusion injury to rat brain: Activation of MMP-9 linked to stromelysin-1 and microglia in cell cultures. *Brain Res.* 893, 104-112.
- Rosenmund, C., Stern-Bach, Y., Stevens, C.F., 1998. The tetrameric structure of a glutamate receptor channel. *Science.* 280, 1596-1599.

- Rothstein, J.D., Dykes-Hoberg, M., Pardo, C.A., Bristol, L.A., Jin, L., Kuncl, R.W., Kanai, Y., Hediger, M.A., Wang, Y., Schielke, J.P., Welty, D.F., 1996. Knockout of glutamate transporters reveals a major role for astroglial transport in excitotoxicity and clearance of glutamate. *Neuron*. 16, 675-686.
- Rothstein, J.D., Martin, L., Levey, A.I., Dykes-Hoberg, M., Jin, L., Wu, D., Nash, N., Kuncl, R.W., 1994. Localization of neuronal and glial glutamate transporters. *Neuron*. 13, 713-725.
- Rueter, S.M., Burns, C.M., Coode, S.A., Mookherjee, P., Emeson, R.B., 1995. Glutamate receptor RNA editing in vitro by enzymatic conversion of adenosine to inosine. *Science*. 267, 1491-1494.
- Salter, M.W., Kalia, L.V., 2004. Src kinases: A hub for NMDA receptor regulation. *Nat Rev Neurosci*. 5, 317-328.
- Sans, N., Vissel, B., Petralia, R.S., Wang, Y.X., Chang, K., Royle, G.A., Wang, C.Y., O'Gorman, S., Heinemann, S.F., Wenthold, R.J., 2003. Aberrant formation of glutamate receptor complexes in hippocampal neurons of mice lacking the GluR2 AMPA receptor subunit. *J Neurosci*. 23, 9367-9373.
- Saransaari, P., Oja, S.S., 1995. Age-related changes in the uptake and release of glutamate and aspartate in the mouse brain. *Mech Ageing Dev*. 81, 61-71.
- Sattler, R., Xiong, Z., Lu, W.Y., Hafner, M., MacDonald, J.F., Tymianski, M., 1999. Specific coupling of NMDA receptor activation to nitric oxide neurotoxicity by PSD-95 protein. *Science*. 284, 1845-1848.
- Scannevin, R.H., Huganir, R.L., 2000. Postsynaptic organization and regulation of excitatory synapses. *Nat Rev Neurosci*. 1, 133-141.
- Schaller, B., Graf, R., 2004. Cerebral ischemia and reperfusion: The pathophysiologic concept as a basis for clinical therapy. *J Cereb Blood Flow Metab*. 24, 351-371.
- Schaller, B.J., 2007. Influence of age on stroke and preconditioning-induced ischemic tolerance in the brain. *Exp Neurol*. 205, 9-19.
- Schneweis, S., Grond, M., Staub, F., Brinker, G., Neveling, M., Dohmen, C., Graf, R., Heiss, W.D., 2001. Predictive value of neurochemical monitoring in large middle cerebral artery infarction. *Stroke*. 32, 1863-1867.
- Schoepp, D.D., Jane, D.E., Monn, J.A., 1999. Pharmacological agents acting at subtypes of metabotropic glutamate receptors. *Neuropharmacology*. 38, 1431-1476.
- Schousboe, A., 1981. Transport and metabolism of glutamate and GABA in neurons are glial cells. *Int Rev Neurobiol*. 22, 1-45.
- Schousboe, A., Divac, I., 1979. Difference in glutamate uptake in astrocytes cultured from different brain regions. *Brain Res*. 177, 407-409.
- Segovia, G., Porras, A., Del Arco, A., Mora, F., 2001. Glutamatergic neurotransmission in aging: A critical perspective. *Mech Ageing Dev*. 122, 1-29.

- Seshadri, S., Beiser, A., Kelly-Hayes, M., Kase, C.S., Au, R., Kannel, W.B., Wolf, P.A., 2006. The lifetime risk of stroke: Estimates from the framingham study. *Stroke*. 37, 345-350.
- Shigeri, Y., Seal, R.P., Shimamoto, K., 2004a. Molecular pharmacology of glutamate transporters, EAATs and VGLUTs. *Brain Res Brain Res Rev*. 45, 250-265.
- Shigeri, Y., Seal, R.P., Shimamoto, K., 2004b. Molecular pharmacology of glutamate transporters, EAATs and VGLUTs. *Brain Res Brain Res Rev*. 45, 250-265.
- Silver, N., Best, S., Jiang, J., Thein, S.L., 2006. Selection of housekeeping genes for gene expression studies in human reticulocytes using real-time PCR. *BMC Mol Biol*. 7, 33.
- Slikker, W., Jr, Paule, M.G., Wright, L.K., Patterson, T.A., Wang, C., 2007. Systems biology approaches for toxicology. *J Appl Toxicol*. 27, 201-217.
- Smith, M.L., Bendek, G., Dahlgren, N., Rosen, I., Wieloch, T., Siesjo, B.K., 1984. Models for studying long-term recovery following forebrain ischemia in the rat. 2. A 2-vessel occlusion model. *Acta Neurol Scand*. 69, 385-401.
- Somova, L.I., Gregory, M.A., Nxumalo, E.N., 2000. Mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*) as a model of cerebral infarction for testing new therapeutic agents. *Methods Find Exp Clin Pharmacol*. 22, 203-210.
- Soundarapandian, M.M., Tu, W.H., Peng, P.L., Zervos, A.S., Lu, Y., 2005. AMPA receptor subunit GluR2 gates injurious signals in ischemic stroke. *Mol Neurobiol*. 32, 145-155.
- Sparkman, N.L., Johnson, R.W., 2008. Neuroinflammation associated with aging sensitizes the brain to the effects of infection or stress. *Neuroimmunomodulation*. 15, 323-330.
- Stanika, R.I., Winters, C.A., Pivovarova, N.B., Andrews, S.B., 2009. Differential NMDA receptor-dependent calcium loading and mitochondrial dysfunction in CA1 vs. CA3 hippocampal neurons. *Neurobiol Dis*.
- Stephenson, F.A., 2006. Structure and trafficking of NMDA and GABAA receptors. *Biochem Soc Trans*. 34, 877-881.
- Stoll, G., Jander, S., Schroeter, M., 1998. Inflammation and glial responses in ischemic brain lesions. *Prog Neurobiol*. 56, 149-171.
- Storck, T., Schulte, S., Hofmann, K., Stoffel, W., 1992. Structure, expression, and functional analysis of a Na⁺-dependent glutamate/aspartate transporter from rat brain. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 89, 10955-10959.
- Streit, W.J., Miller, K.R., Lopes, K.O., Njie, E., 2008. Microglial degeneration in the aging brain--bad news for neurons? *Front Biosci*. 13, 3423-3438.
- Strolin Benedetti, M., Cini, M., Fusi, R., Marrari, P., Dostert, P., 1990. The effects of aging on MAO activity and amino acid levels in rat brain. *J Neural Transm Suppl*. 29, 259-268.
- Stys, P.K., 2004. White matter injury mechanisms. *Curr Mol Med*. 4, 113-130.

- Sullivan, S.M., Lee, A., Bjorkman, S.T., Miller, S.M., Sullivan, R.K., Poronnik, P., Colditz, P.B., Pow, D.V., 2007. Cytoskeletal anchoring of GLAST determines susceptibility to brain damage: An identified role for GFAP. *J Biol Chem.* 282, 29414-29423.
- Sutherland, G.R., Dix, G.A., Auer, R.N., 1996. Effect of age in rodent models of focal and forebrain ischemia. *Stroke.* 27, 1663-7; discussion 1668.
- Suzuki, Y., Takagi, Y., Nakamura, R., Hashimoto, K., Umemura, K., 2003. Ability of NMDA and non-NMDA receptor antagonists to inhibit cerebral ischemic damage in aged rats. *Brain Res.* 964, 116-120.
- Swanson, R.A., Farrell, K., Stein, B.A., 1997a. Astrocyte energetics, function, and death under conditions of incomplete ischemia: A mechanism of glial death in the penumbra. *Glia.* 21, 142-153.
- Swanson, R.A., Liu, J., Miller, J.W., Rothstein, J.D., Farrell, K., Stein, B.A., Longuemare, M.C., 1997b. Neuronal regulation of glutamate transporter subtype expression in astrocytes. *J Neurosci.* 17, 932-940.
- Swanson, R.A., Farrell, K., Simon, R.P., 1995. Acidosis causes failure of astrocyte glutamate uptake during hypoxia. *J Cereb Blood Flow Metab.* 15, 417-424.
- Sweeney, M.I., 1997. Neuroprotective effects of adenosine in cerebral ischemia: Window of opportunity. *Neurosci Biobehav Rev.* 21, 207-217.
- Szatkowski, M., Barbour, B., Attwell, D., 1990. Non-vesicular release of glutamate from glial cells by reversed electrogenic glutamate uptake. *Nature.* 348, 443-446.
- Tamaru, M., Yoneda, Y., Ogita, K., Shimizu, J., Nagata, Y., 1991. Age-related decreases of the N-methyl-D-aspartate receptor complex in the rat cerebral cortex and hippocampus. *Brain Res.* 542, 83-90.
- Tanaka, H., Grooms, S.Y., Bennett, M.V., Zukin, R.S., 2000. The AMPAR subunit GluR2: Still front and center-stage. *Brain Res.* 886, 190-207.
- Taoufik, E., Probert, L., 2008. Ischemic neuronal damage. *Curr Pharm Des.* 14, 3565-3573.
- Tekkok, S.B., Ye, Z., Ransom, B.R., 2007. Excitotoxic mechanisms of ischemic injury in myelinated white matter. *J Cereb Blood Flow Metab.* 27, 1540-1552.
- Tomimoto, H., Shibata, M., Ihara, M., Akiguchi, I., Ohtani, R., Budka, H., 2002. A comparative study on the expression of cyclooxygenase and 5-lipoxygenase during cerebral ischemia in humans. *Acta Neuropathol.* 104, 601-607.
- Torp, R., Lekieffre, D., Levy, L.M., Haug, F.M., Danbolt, N.C., Meldrum, B.S., Ottersen, O.P., 1995. Reduced postischemic expression of a glial glutamate transporter, GLT1, in the rat hippocampus. *Exp Brain Res.* 103, 51-58.
- Torp, R., Danbolt, N.C., Babaie, E., Bjoras, M., Seeberg, E., Storm-Mathisen, J., Ottersen, O.P., 1994. Differential expression of two glial glutamate transporters in the rat brain: An in situ hybridization study. *Eur J Neurosci.* 6, 936-942.

- Tymianski, M., Wallace, M.C., Spigelman, I., Uno, M., Carlen, P.L., Tator, C.H., Charlton, M.P., 1993. Cell-permeant Ca²⁺ chelators reduce early excitotoxic and ischemic neuronal injury in vitro and in vivo. *Neuron*. 11, 221-235.
- Tzingounis, A.V., Wadiche, J.I., 2007. Glutamate transporters: Confining runaway excitation by shaping synaptic transmission. *Nat Rev Neurosci*. 8, 935-947.
- Uyttenboogaart, M., Koch, M.W., Stewart, R.E., Vroomen, P.C., Luijckx, G.J., De Keyser, J., 2007. Moderate hyperglycaemia is associated with favourable outcome in acute lacunar stroke. *Brain*. 130, 1626-1630.
- Vallet, P.G., Charpiot, A., 1994. Cerebral hippocampic ischemia, metabolic disorders and neuronal death. *Encephale*. 20, 131-137.
- VanDongen, A.M., 2009. Biology of the NMDA receptor. *Frontiers in Neuroscience*. CRC Press.
- Vatassery, G.T., Lai, J.C., Smith, W.E., Quach, H.T., 1998. Aging is associated with a decrease in synaptosomal glutamate uptake and an increase in the susceptibility of synaptosomal vitamin E to oxidative stress. *Neurochem Res*. 23, 121-125.
- Vellai, T., 2009. Autophagy genes and ageing. *Cell Death Differ*. 16, 94-102.
- Verdoorn, T.A., Burnashev, N., Monyer, H., Seeburg, P.H., Sakmann, B., 1991. Structural determinants of ion flow through recombinant glutamate receptor channels. *Science*. 252, 1715-1718.
- Villmann, C., Becker, C.M., 2007. On the hypes and falls in neuroprotection: Targeting the NMDA receptor. *Neuroscientist*. 13, 594-615.
- Vornov, J.J., Tasker, R.C., Coyle, J.T., 1994. Delayed protection by MK-801 and tetrodotoxin in a rat organotypic hippocampal culture model of ischemia. *Stroke*. 25, 457-64; discussion 464-5.
- Wang, L.C., Futrell, N., Wang, D.Z., Chen, F.J., Zhai, Q.H., Schultz, L.R., 1995. A reproducible model of middle cerebral infarcts, compatible with long-term survival, in aged rats. *Stroke*. 26, 2087-2090.
- Wang, Q., Tang, X.N., Yenari, M.A., 2007. The inflammatory response in stroke. *J Neuroimmunol*. 184, 53-68.
- Wang-Fisher, Y., 2009. *Manual of Stroke models in rats*. CRC Press.
- Wardas, J., Pietraszek, M., Schulze, G., Ossowska, K., Wolfarth, S., 1997. Age-related changes in glutamate receptors: An autoradiographic analysis. *Pol J Pharmacol*. 49, 401-410.
- Watkins, J.C., Jane, D.E., 2006. The glutamate story. *Br J Pharmacol*. 147 Suppl 1, S100-8.
- Wenk, G.L., Barnes, C.A., 2000. Regional changes in the hippocampal density of AMPA and NMDA receptors across the lifespan of the rat. *Brain Res*. 885, 1-5.
- Wenk, G.L., Walker, L.C., Price, D.L., Cork, L.C., 1991. Loss of NMDA, but not GABA-A, binding in the brains of aged rats and monkeys. *Neurobiol Aging*. 12, 93-98.

- Wenthold, R.J., Prybylowski, K., Standley, S., Sans, N., Petralia, R.S., 2003. Trafficking of NMDA receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 43, 335-358.
- Wenthold, R.J., Petralia, R.S., Blahos, J., II, Niedzielski, A.S., 1996. Evidence for multiple AMPA receptor complexes in hippocampal CA1/CA2 neurons. *J Neurosci.* 16, 1982-1989.
- Wheeler, D.D., Ondo, J.G., 1986. Time course of the aging of the high affinity L-glutamate transporter in rat cortical synaptosomes. *Exp Gerontol.* 21, 159-168.
- White, B.C., Sullivan, J.M., DeGracia, D.J., O'Neil, B.J., Neumar, R.W., Grossman, L.I., Rafols, J.A., Krause, G.S., 2000. Brain ischemia and reperfusion: Molecular mechanisms of neuronal injury. *J Neurol Sci.* 179, 1-33.
- Whittingham, T.S., Lust, W.D., Passonneau, J.V., 1984. An in vitro model of ischemia: Metabolic and electrical alterations in the hippocampal slice. *J Neurosci.* 4, 793-802.
- Wilde, G.J., Pringle, A.K., Wright, P., Iannotti, F., 1997. Differential vulnerability of the CA1 and CA3 subfields of the hippocampus to superoxide and hydroxyl radicals in vitro. *J Neurochem.* 69, 883-886.
- Wolf, P.A., D'Agostino, R.B., O'Neal, M.A., Sytkowski, P., Kase, C.S., Belanger, A.J., Kannel, W.B., 1992. Secular trends in stroke incidence and mortality. the framingham study. *Stroke.* 23, 1551-1555.
- Wollmuth, L.P., Sobolevsky, A.I., 2004. Structure and gating of the glutamate receptor ion channel. *Trends Neurosci.* 27, 321-328.
- Wong, C.H., Crack, P.J., 2008. Modulation of neuro-inflammation and vascular response by oxidative stress following cerebral ischemia-reperfusion injury. *Curr Med Chem.* 15, 1-14.
- Wong, J.K., Kennedy, P.R., Belcher, S.M., 2001. Simplified serum- and steroid-free culture conditions for high-throughput viability analysis of primary cultures of cerebellar granule neurons. *J Neurosci Methods.* 110, 45-55.
- Wu, T.Y., Liu, C.I., Chang, Y.C., 1996. A study of the oligomeric state of the alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid-preferring glutamate receptors in the synaptic junctions of porcine brain. *Biochem J.* 319 (Pt 3), 731-739.
- Yamashita, K., Vogel, P., Fritze, K., Back, T., Hossmann, K.A., Wiessner, C., 1996. Monitoring the temporal and spatial activation pattern of astrocytes in focal cerebral ischemia using in situ hybridization to GFAP mRNA: Comparison with sgp-2 and hsp70 mRNA and the effect of glutamate receptor antagonists. *Brain Res.* 735, 285-297.
- Yang, G., Kitagawa, K., Ohtsuki, T., Kuwabara, K., Mabuchi, T., Yagita, Y., Takazawa, K., Tanaka, S., Yanagihara, T., Hori, M., Matsumoto, M., 2000. Regional difference of neuronal vulnerability in the murine hippocampus after transient forebrain ischemia. *Brain Res.* 870, 195-198.
- Yatsiv, I., Grigoriadis, N., Simeonidou, C., Stahel, P.F., Schmidt, O.I., Alexandrovitch, A.G., Tsenter, J., Shohami, E., 2005. Erythropoietin is neuroprotective, improves

functional recovery, and reduces neuronal apoptosis and inflammation in a rodent model of experimental closed head injury. *FASEB J.* 19, 1701-1703.

- Yau, J.L., Olsson, T., Noble, J., Seckl, J.R., 1999. Serotonin receptor subtype gene expression in the hippocampus of aged rats following chronic amitriptyline treatment. *Brain Res Mol Brain Res.* 70, 282-287.
- Zeller, J.A., Lenz, A., Eschenfelder, C.C., Zunker, P., Deuschl, G., 2005. Platelet-leukocyte interaction and platelet activation in acute stroke with and without preceding infection. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 25, 1519-1523.
- Ziff, E.B., 2007. TARPs and the AMPA receptor trafficking paradox. *Neuron.* 53, 627-633.
- Zigmond, M.J., Bloom, F.E., Landis, S.C., Roberts, J.L., Squire, L.R., 1999. *Fundamental Neuroscience.* Academic Press.
- Zou, B., Li, Y., Deng, P., Xu, Z.C., 2005. Alterations of potassium currents in ischemia-vulnerable and ischemia-resistant neurons in the hippocampus after ischemia. *Brain Res.* 1033, 78-89.
- Zukin, R.S., Bennett, M.V., 1995. Alternatively spliced isoforms of the NMDAR1 receptor subunit. *Trends Neurosci.* 18, 306-313.