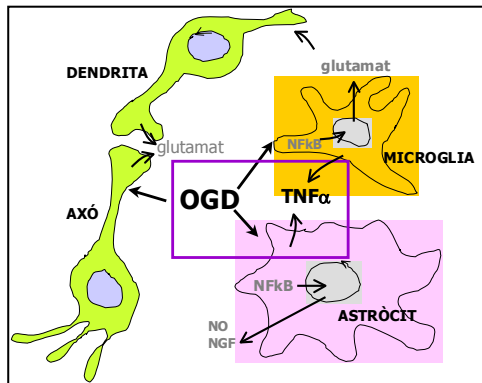


4.2. MECANISMES IMPLICATS EN LA MORT APOPTÒTICA EN L'OGD



4.2.1. El TNF α :

4.2.1.1. Efecte del TNF α en els cultius de neurones corticals de rata:

Per estudiar l'efecte del TNF α en els cultius de neurones corticals de rata, es van tractar les cèl·lules amb diferents concentracions de la citoquina. Es va mesurar la viabilitat cel·lular al cap de 24 i 48 hores mitjançant l'assaig de la reducció del MTT.

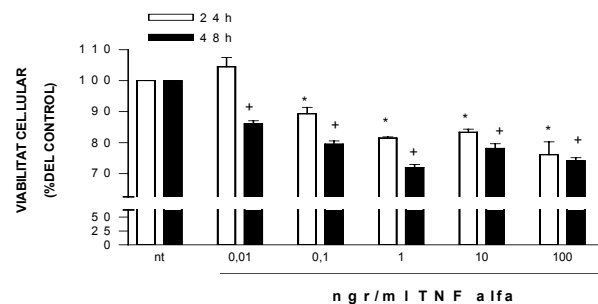


Figura 4.16. Viabilitat cel·lular en funció de la concentració de TNF α . Els cultius es van tractar amb diferents concentracions de TNF α i es va mesurar la viabilitat al cap de 24 o 48 hores mitjançant l'assaig del MTT. Mitja \pm SEM de 3 experiments realitzats cadascun per quadruplicat * $p < 0.01$ vs control 24h; + $p < 0.01$ vs control 48h.

Un dia després del tractament, el $\text{TNF}\alpha$ induïa una mort cel·lular creixent en funció a l'augment de la seva concentració. Tot i així, a partir de 1 ngr/ml, el seu efecte va arribar a un màxim d'un 20% de mort, que no es veié superat a concentracions superiors. A 48 hores dels tractaments, el comportament era semblant tot i que l'efecte global tendia a ser una mica més gran. Malgrat això, a 48 hores, també s'arribà a un màxim amb 100ngr/ml que coincidia amb l'efecte màxim vist a 24 hores per a la mateixa concentració. A partir d'aquestes corbes de concentració-efecte es va establir una concentració estàndard pels diferents tractaments posteriors. El valor escollit fou el de 100ngr/ml de $\text{TNF}\alpha$.

El tipus de mort que induïa la citoquina es va caracteritzar amb la tinció de Hoechst 33258 i PI. Es van observar cèl·lules amb la cromatina condensada, el nombre de les quals anava augmentant en funció de la concentració de $\text{TNF}\alpha$ (vegeu figura 4.17), però no es van visualitzar cèl·lules necròtiques, positives per PI i amb la cromatina laxa.

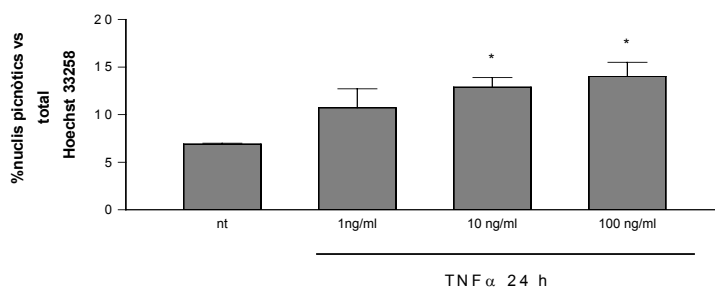


Figura 4.17. El $\text{TNF}\alpha$ induïx condensació de cromatina en funció de la concentració. Els cultius es van tractar durant 24 hores amb concentracions creixents de $\text{TNF}\alpha$, es tenyiren amb Hoechst 33258 i PI, i es realitzaren els recomptes de cèl·lules necròtiques i apoptòtiques. La gràfica només expressa el percentatge de nuclis apoptòtics degut a la inexistència de necrosi cel·lular. Mitja \pm SEM de 3 experiments realitzats cadascun per triplicat; * $p < 0.05$ vs nt;

Tal com s'ha anat incidint anteriorment, la condensació de cromatina és un indicatiu de l'existència del programa de mort però no és una prova suficient per si sola. Per tal de verificar la inducció de l'apoptosi del $\text{TNF}\alpha$ en els cultius neuronals, es van realitzar una sèrie d'immunocitoquímiques per detectar activació de la caspasa 3 i de la caspasa 9. A més a més, es va fer un estudi del curs temporal d'activació d'ambdues caspases. Després de 6 hores de tractament amb $\text{TNF}\alpha$ es pot apreciar una activació neuronal de la caspasa 9, tant en les cèl·lules tractades amb el $\text{TNF}\alpha$ com en el control positiu d'apoptosi que és el tractament amb Estaurosporina $1\ \mu\text{M}$ (vegeu figura 4.18).

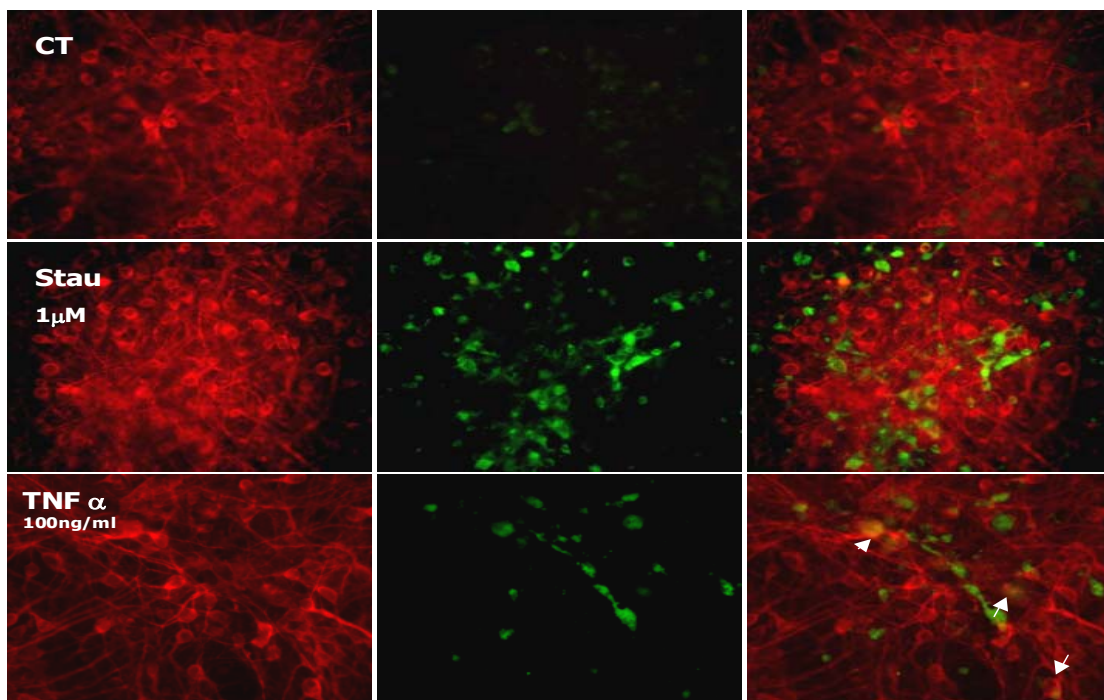


Figura 4.18. El $\text{TNF}\alpha$ activa la caspasa 9. Les micrografies corresponen a la immunocitoquímica contra MAP2 (vermell) i contra el fragment actiu de la caspasa 9 (verd). S'observa una activació de la caspasa 9 en neurones (assenyalades amb les fletxes) sis hores després de tractar els cultius amb 100ng/ml de $\text{TNF}\alpha$ o bé amb $1\ \mu\text{M}$ d'estaurosporina, a diferència dels controls no tractats. Micrografies representatives de tres experiments diferents, en cultius independents i realitzats per triplicat.

Pel que fa la caspasa 3, es va apreciar també una activació tant en el control positiu d'estaurosporina com en el tractament amb $TNF\alpha$ (vegeu figura 4.19).

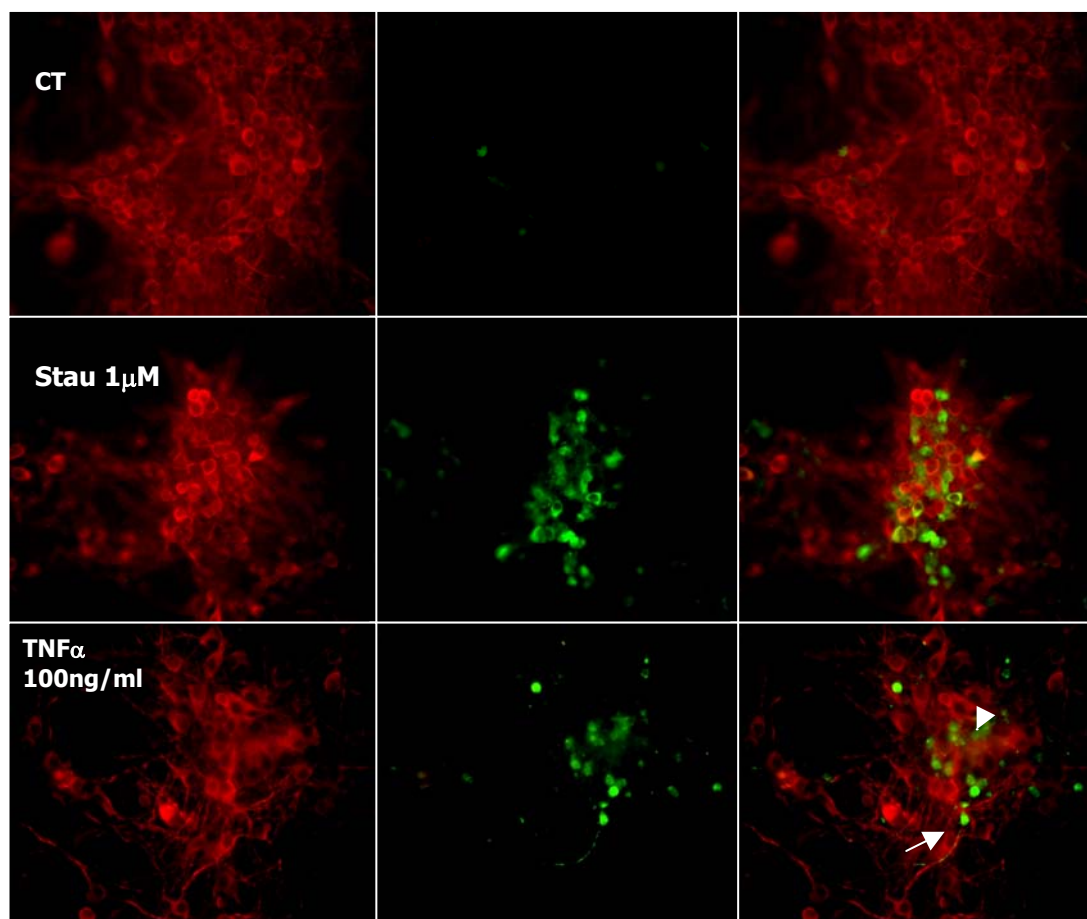


Figura 4.19. el $TNF\alpha$ activa la caspasa 3. Les micrografies corresponen a la immunocitoquímica contra MAP2 (vermell) i contra el fragment actiu de la caspasa 3 (verd), sis hores després de tractar els cultius amb 100ng/ml de $TNF\alpha$ o bé amb 1 μ M d'estaurosporina, s'observa una activació de la caspasa 3 en neurones (assenyalades amb les fletxes) a diferència del control. Micrografies representatives de tres experiments diferents, en cultius independents i realitzats per triplicat.

Mitjançant experiments d'immunocitoquímica combinada amb els diferents marcadors cel.lulars i l'anticòs contra la forma activa de la caspasa 3, es va estudiar en quines espècies cel.lulars s'activava la proteasa en resposta a un tractament amb $TNF\alpha$. A part de l'activació neuronal ja descrita, també es va detectar activació de la caspasa 3 en la microglia.

En les cèl·lules positives per GFAP no es va observar processament de la caspasa 3 (vegeu figura 4.20)

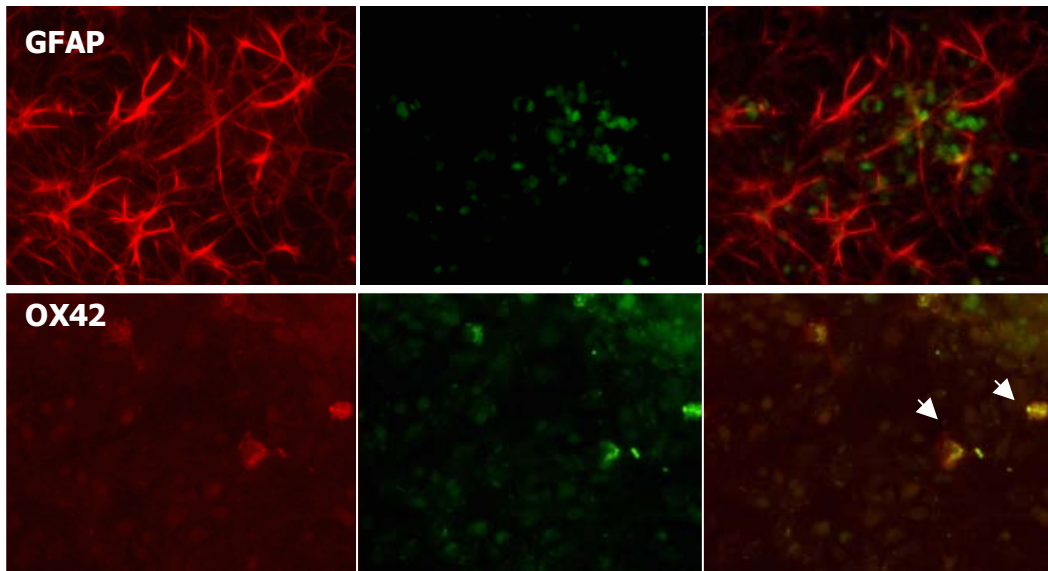


Figura 4.20. El $TNF\alpha$ activa la caspasa 3 en microglia. Les micrografies mostren el resultat de la immunotinció específica per a GFAP, com a marcador astrocitari, i d'OX42, com a marcador microglial, combinada amb l'anticòs contra el fragment actiu de la caspasa 3. Un tractament amb $TNF\alpha$ de sis hores no induïx l'activació de la caspasa 3 en astròcits però sí en microglia (fletxes). Micrografies representatives de tres experiments diferents, en cultius independents i realitzats per triplicat.

4.2.1.2. Efecte de l'OGD sobre l'alliberació de $TNF\alpha$ en els cultius de neurones corticals de rata:

S'havia demostrat fins aleshores que els cultius neuronals exposats a l'OGD presentaven tant necrosi com apoptosi. A més, s'havia provat que els cultius eren sensibles al tractament amb $TNF\alpha$ i que aquest induïa activació de la caspasa 3 i de la caspasa 9. A partir d'aquestes premisses es va estudiar si l'exposició a l'OGD era capaç d'induir un alliberament de $TNF\alpha$.

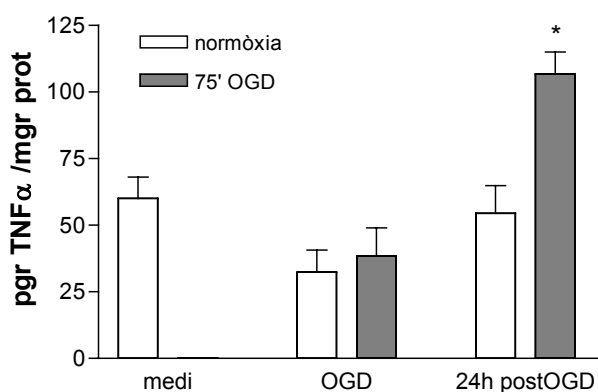


Figura 4.21. L'OGD indueix un alliberament de TNF α . La presència de TNF α al medi de cultiu i als tampons de normòxia o d'isquèmia, fou detectada mitjançant un assaig d'ELISA. 24hores després d'exposar els cultius a una OGD, la quantitat de TNF α alliberat al medi de cultiu es veia augmentada. * $p < 0.05$ t student vers medi 24h post-normòxia Mitja \pm SEM de 3 experiments realitzats cadascun per triplicat.

Per tal d'estudiar si l'OGD o la normòxia produïen un alliberament de TNF α (vegeu Figura 4.21) , es va agafar una mostra de medi que estava en contacte amb les cèl·lules abans de qualsevol manipulació, per tal de detectar la concentració basal de TNF α . Llavors es van exposar els cultius a 75 minuts de normòxia o OGD. També es van reservar els tampons BSS i BSS-5mM glucosa que havien estat en contacte amb les cèl·lules durant l'exposició a OGD i normòxia, respectivament. Finalment, al cap de 24 hores de posar fi a les exposicions, es van recollir els medis dels cultius normòxics i isquèmics. La concentració de TNF α de totes les mostres recollides s'analitzà mitjançant un kit d'ELISA(Diaclone) per a la detecció de la citoquina (específica de rata). En el medi de cultiu es va detectar un nivell basal de TNF α . En els tampons d'OGD o de normòxia també es va detectar una alliberació de TNF α tot i que no existien diferències entre ambdues situacions. Tanmateix, al cap de 24 hores de sotmetre els cultius a l'OGD o la normòxia es va apreciar un augment de quasi el doble de TNF α alliberat en els cultius isquèmics vers els cultius normòxics. Aquest valor i el nivell basal de TNF α en el medi de cultiu eren estadísticament diferents.

4.2.1.3. Efectes del TNF α alliberat en una OGD :

Per estudiar els efectes que produïa el TNF α alliberat en una OGD es va recórrer a un anticòs específic contra el TNF α alliberat al medi. L'anticòs s'uneix a la citoquina i evita així la unió del TNF α amb els seus receptors. Es va comprovar que el bloqueig del TNF α amb l'anticòs, després d'exposar els cultius a una OGD de 75 minuts, millorava la viabilitat cel.lular (veure figura 4.22)

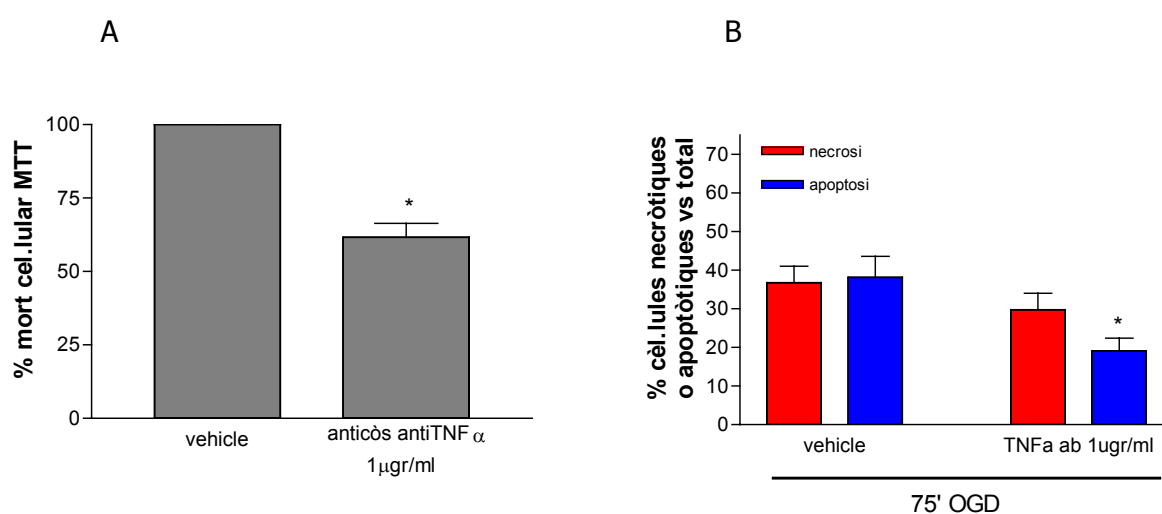


Figura 4.22. Efecte de l'anticòs anti-TNF α sobre la mort cel.lular induïda per OGD. Després de l'OGD es va afegir un anticòs per bloquejar la unió del TNF α alliberat amb els seus receptors. (A) 24 hores després la presència de l'anticòs al medi millora la viabilitat dels cultius exposats a l'OGD. La viabilitat es va mesurar per l'assaig del MTT (B) el bloqueig del TNF α per mitjà de l'anticòs redueix el nombre de nuclis apoptòtics. Els recomptes de les tincions fluorescents de PI i Hoechst van demostrar que la presència de l'anticòs no afectava a la proporció de cèl.lules necròtiques. En canvi, es va observar una disminució en el nombre de cèl.lules amb la cromatina condensada. Mitja \pm SEM de 3 experiments realitzats cadascun per triplicat * $p < 0.05$ vs tractament amb anticòs anti-TNF α

Les dades obtingudes es van expressar com a percentatge de cèl.lules mortes segons si s'havia afegit vehicle o bé l'anticòs als cultius després de l'OGD. La reducció de la mort no fou total però sí significativa (veure figura 4.22.A). També es van realitzar les tincions amb PI i Hoechst per determinar l'efecte de l'anticòs sobre els dos components de mort cel.lular. En els cultius exposats a l'OGD en presència de l'anticòs es va detectar una reducció del nombre de nuclis condensats o apoptòtics. D'altra banda, el

percentatge de cèl.lules necròtiques no va variar en comparació als resultats del vehicle (vegeu figura 4.22.B).

La disminució en la condensació de cromatina de les cèl.lules tractades amb anticòs va portar a estudiar els nivells d'activació de la caspasa 3, tant per tècniques d'immunocitoquímica com per western blot (veure figura 4.23)

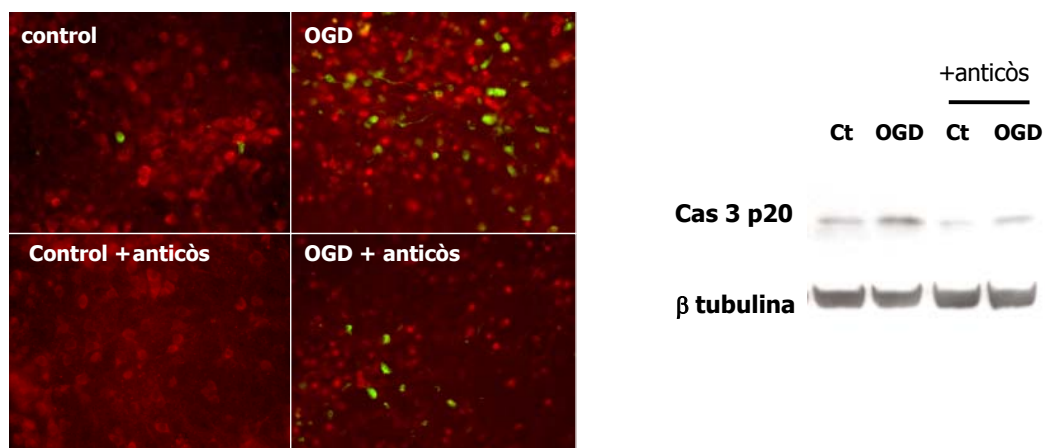


Figura 4.23. Efecte de l'anticòs anti TNF sobre l'activació de la caspasa 3 induïda per OGD. Sis hores després de l'OGD es pot observar una reducció de l'activació de la caspasa 3. Les micrografies mostren les neurones marcades amb NeuN (en vermell) i el fragment actiu de la caspasa 3 (en verd). En el western blot es pot observar en el pannell superior la disminució del fragment actiu de 20KDa en els extractes isquèmics tractats amb l'anticòs (OGD+anticòs). El pannell inferior correspon a la immunodetecció, en la mateixa membrana, de la tubulina, com a control de càrrega proteica dels carrils. Les micrografies i el western blot són resultats representatius de 3 experiments realitzats cadascun per triplicat

En la immunocitoquímica, es van marcar les neurones amb el marcador neuronal NeuN (vermell) i la caspasa 3 activa amb l'anticòs específic per al fragment de 20 KDa (verd).

En les micrografies dels cultius exposats a l'OGD, es van visualitzar un menor nombre de neurones caspasa 3 positives en els cultius tractats amb l'anticòs. Per tenir una visió més qualitativa de les immunocitoquímiques, es van exposar cultius a 75 minuts de normòxia o d'OGD. Part dels cultius es van tractar amb l'anticòs en cada condició i sis hores després es van recollir extractes cel.lulars per analitzar-los per western blot. La membrana es va incubar amb l'anticòs primari contra la caspasa 3 activa. Els cultius isquèmics tractats amb anticòs presentaven una reducció en la senyal de la banda de 20 KDa, en comparació a l'extracte dels cultius isquèmics. Posteriorment, la membrana

també es va incubar amb l'anticòs primari de la β -tubulina, i es va poder confirmar que les diferències observades de la caspasa 3 no es devien a diferències de càrrega proteica dels carrils. Per tant, la disminució de nuclis condensats observada en els cultius isquèmics tractats amb l'anticòs es podia correlacionar amb una disminució de l'activació de la caspasa 3.

Pel que fa l'activació de la caspasa 7 i la caspasa 9, les immunocitoquímiques van revelar que la presència o l'absència de l'anticòs després de la OGD no afectava el seu grau d'activació (vegeu figura 4.24).

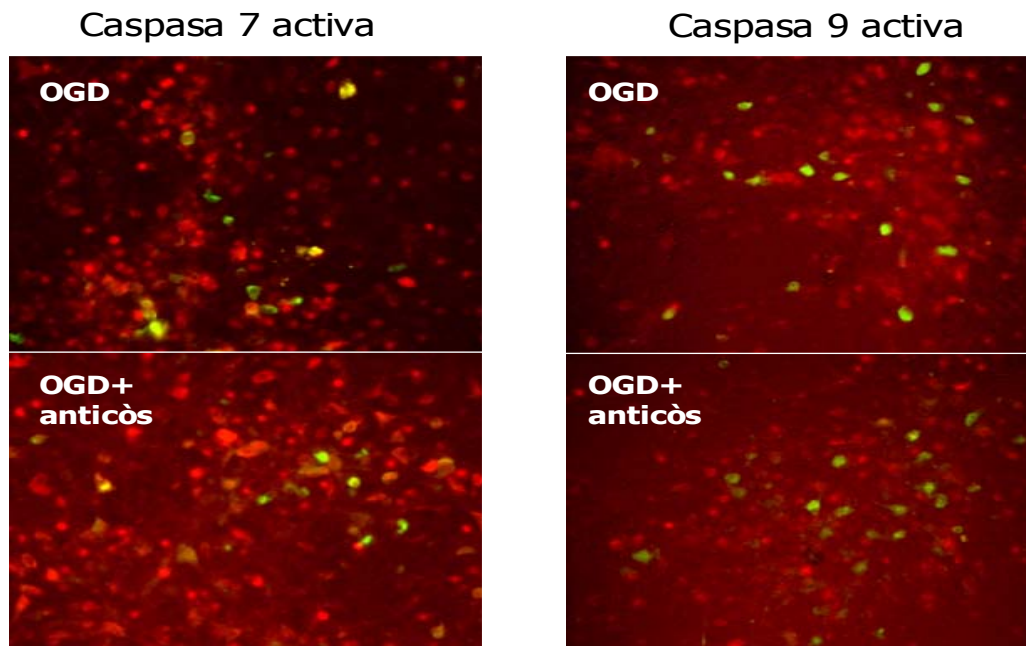
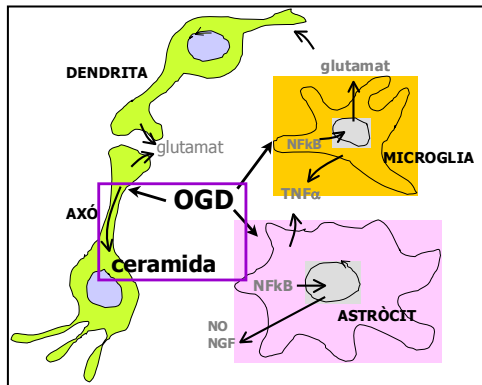


Figura 4.24. L'anticòs anti-TNF α no afecta a l'activació de la caspasa 7 i de la caspasa 9. Les neurones es van visualitzar amb el marcador específic NeuN en vermell i el fragment actiu de la caspasa 7 a l'esquerra i de la caspasa 9 a la dreta, en verd. Les micrografies corresponen a cultius exposats a l'OGD, amb o sense anticòs anti-TNF α . Les micrografies són representatives de 3 experiments realitzats cadascun per triplicat i en cultius independents

CONCLUSIONS (II)

- El tractament amb $\text{TNF}\alpha$ 100ng/ml indueix una mort d'un 25% de cèl·lules al cap de 24 hores. El tipus de mort que indueix és apoptòtica amb una activació de la caspasa 3, i 9 i una condensació de cromatina
- L'OGD indueix un alliberament de $\text{TNF}\alpha$ en els cultius neurals
- El $\text{TNF}\alpha$ alliberat a conseqüència de l'OGD media part de l'activació de la caspasa 3 i de la condensació de cromatina



4.2.2. LA CERAMIDA

La ceramida és un lípid de membrana que, a part d'exercir una funció estructural també actua com a segon missatger. La ceramida, tal com s'ha descrit en la introducció, està implicada en la mediació de respostes d'estrès cel·lular, entre elles l'apoptosi (Kolesnick R. & Golde DW., 1994). La seva acumulació indueix l'activació de les caspases (Lievremont JP. et al., 1999; Gill GS. et al., 2000), tot i que els mecanismes que ho desencadenen no es comprenen del tot. Estava descrit que, en una isquèmia cerebral *in vivo*, hi havia una producció de ceramida i que aquesta s'atribuïa al catabolisme de l'esfingomielina per part de les esfingomielinases (Mattson MP., 1998). A partir d'aquests precedents, i basant-nos en els resultats obtinguts en la caracterització del model (capítol 4.1), el model d'isquèmia *in vitro* va ser utilitzat per estudiar la implicació de la ceramida en el component de mort apoptòtica.

4.2.2.1. L'OGD indueix una acumulació de ceramida:

Per estudiar una possible relació entre la ceramida i la mort neuronal induïda per isquèmia, els cultius es van sotmetre a una OGD de 75 minuts i 3 hores després, es van recollir els llisats cel·lulars per realitzar l'extracció lipídica. La quantitat de ceramida total produïda en una OGD es va detectar mitjançant l'assaig de la diacilglicerol

quinasa (DAG quinasa). Aquest assaig no permet discriminar la ceramida produïda per la síntesi *de novo* de la ceramida produïda per l'acció de les esfingomielinases. Per això, per tal de veure si el *pool* de ceramida *de novo* podia tenir algun paper en la mort neuronal induïda per OGD, els cultius es van preincubar durant una hora amb Fumonisina 50 μ M abans de ser exposats a condicions d'OGD o de normòxia. La Fumonisina B1 és una micotoxina que inhibeix la ceramida sintasa i, en conseqüència, la síntesi *de novo* de ceramida.

A nivell de viabilitat, es va obtenir un 50 % de protecció cel.lular en els cultius pretractats amb FB1 i sotmesos a OGD. El tractament amb 50 μ M FB1 dels cultius control no era tòxic (vegeu figura 4.25).

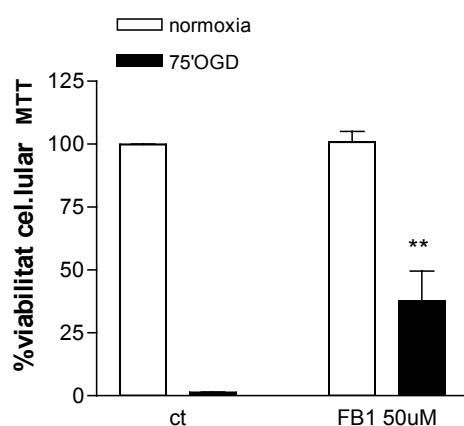


Figura 4.25. La Fumonisina B1 protegeix de la mort induïda per OGD. Els cultius es van exposar a 75'OGD amb o sense FB1 i, al cap de 24 hores, es va mesurar la viabilitat cel.lular pel mètode del MTT. La gràfica mostra la protecció que confereix la fumonisina B1 davant l'exposició a l'OGD. (Mitja de 3 experiments \pm SEM ** $p < 0.01$ vs ct 75'OGD)

Pel que fa a la quantificació de ceramida mitjançant l'assaig de la DAG quinasa, es va observar que 3 hores després d'haver exposat les cèl.lules a una OGD, hi havia una acumulació significativa de ceramida total vers la ceramida basal dels controls normòxics. La preincubació amb FB1 era capaç de bloquejar aquest increment de ceramida total induït per l'exposició a l'OGD (vegeu figura 4.26). Aquests resultats indicaven que la síntesi *de novo* de ceramida podia estar implicada en la mort cel.lular induïda per OGD.

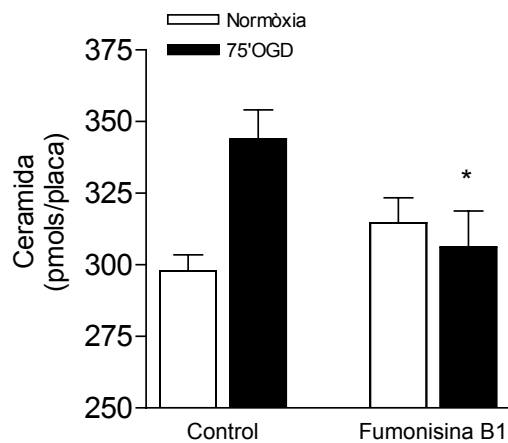


Figura 4.26 La fumoinisina B1 bloqueja l'acumulació de ceramida en cèl·lules exposades a l'OGD. La gràfica expressa els resultats de l'assaig de la DAG quinasa per a la quantificació de la ceramida total en condicions normòxiques o isquèmiques, amb o sense fumoinisina B1. L'OGD indueix una acumulació de ceramida i la presència de fumoinisina remet aquest augment fins a nivells del control. Mitja de 3 experiments \pm SEM realitzats per triplicat en cultius independents * $p < 0.05$ vs control 75'OGD)

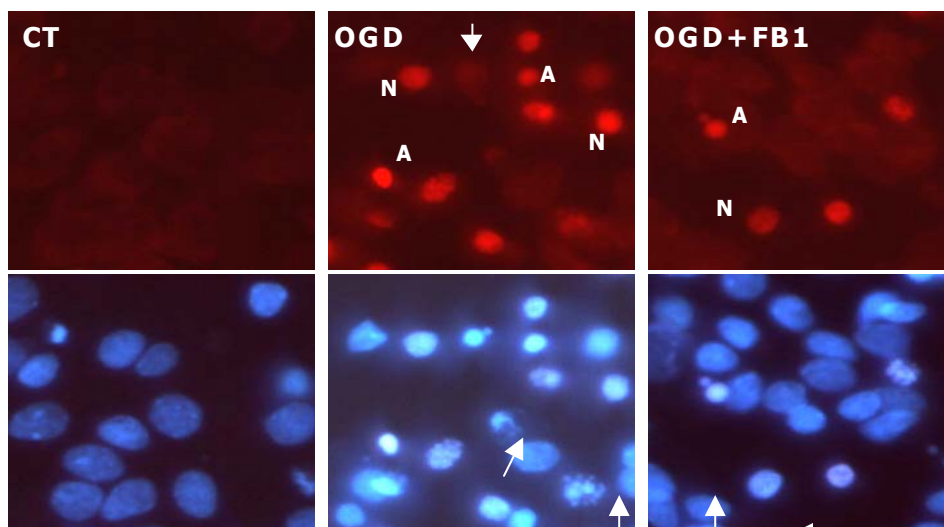


Figura 4.27 La fumoinisina B1 redueix el nombre de nuclis apoptòtics en cultius exposats a l'OGD. Les micrografies presenten les tincions fluorescents de Pi i Hoechst de cultius normòxics (CT) o exposats a l'OGD amb o sense fumoinisina B1. L'OGD indueix una condensació de cromatina (A) i l'aparició de cèl·lules necròtiques (N). La fletxa senyala una cèl·lula apoptòtica negativa per PI. La presència de fumoinisina redueix l'aparició de nuclis apoptòtics però no afecta a l'aparició de cèl·lules necròtiques. Micrografies representatives de tres experiments realitzats per triplicat en cultius independents.

Per tal d'aprofundir en l'estudi del bloqueig de la síntesi de novo de ceramida, es van tenir amb PI i Hoechst 33258 cultius que havien estat sotmesos a l'OGD. Les preparacions isquèmiques preincubades amb FB1 presenten un nombre més reduït de nuclis condensats en comparació als cultius exposats a l'OGD. D'altra banda, el % de nuclis necròtics no semblava variar (vegeu figura 4.27). Per tenir una visió més quantitativa de les micrografies, es van fer els recomptes corresponents de nuclis apoptòtics i cèl·lules necròtiques mitjançant la doble tinció fluorescent de PI i Hoechst 33258 (vegeu figura 4.28)

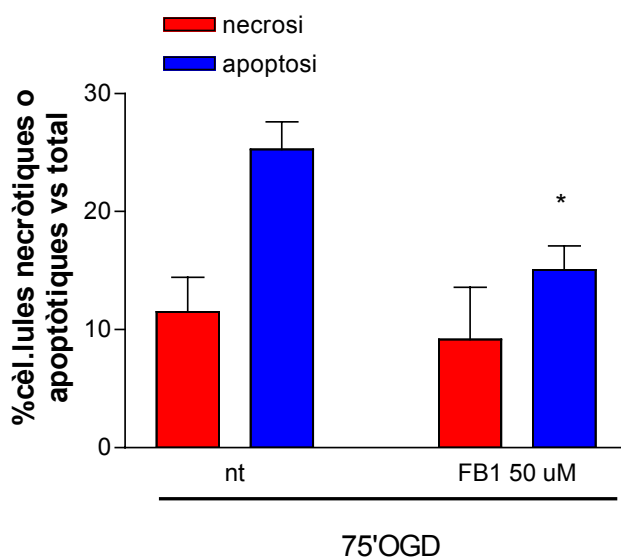


Figura 4.28 La fumoinisina B1 redueix el nombre de nuclis apoptòtics en cultius exposats a l'OGD. A partir de les micrografies, es van realitzar els recomptes de cèl·lules necròtiques i apoptòtiques en cultius exposats a l'OGD amb o sense fumonisina. La fumonisina redueix el percentatge de nuclis apoptòtics però no afecta al percentatge de cèl·lules necròtiques. Mitja de 3 experiments \pm SEM realitzats per triplicat en cultius independents * $p < 0.01$ vs control apoptosi 75'OGD.

En efecte, el percentatge de nuclis apoptòtics es veia reduït de manera significativa, tot i que no totalment. En canvi la necrosi no es veia afectada pel tractament amb fumonisina B1.

La fumonisina reduïa la quantitat de ceramida que es generava 3 hores després d'una OGD, i semblava que bloquejava la condensació de cromatina pròpia de l'apoptosi neuronal observada. Amb aquests indicis es va estudiar l'efecte del bloqueig de la

síntesi *de novo* de la ceramida en el procés d'activació de la caspasa 3. Es van exposar els cultius a una OGD o a una normòxia amb o sense el pretractament amb fumonisina B1 i al cap de 6 hores es van preparar les cèl·lules per ser analitzades per immunocitoquímica contra la MAP2 i la caspasa 3 activa (vegeu figura 4.29). En paral·lel, també es van recollir extractes cel·lulars per analitzar-los per western blot i visualitzar el grau d'activació de la caspasa 3 (vegeu figura 4.30). Pel que fa les immunocitoquímiques, es pot apreciar una reducció de les neurones caspasa 3 positives (en verd) en els cultius isquèemics tractats amb fumonisina B1. Tanmateix, es pot observar que la xarxa neurítica visualitzada amb el marcatge MAP 2, manté la seva integritat.

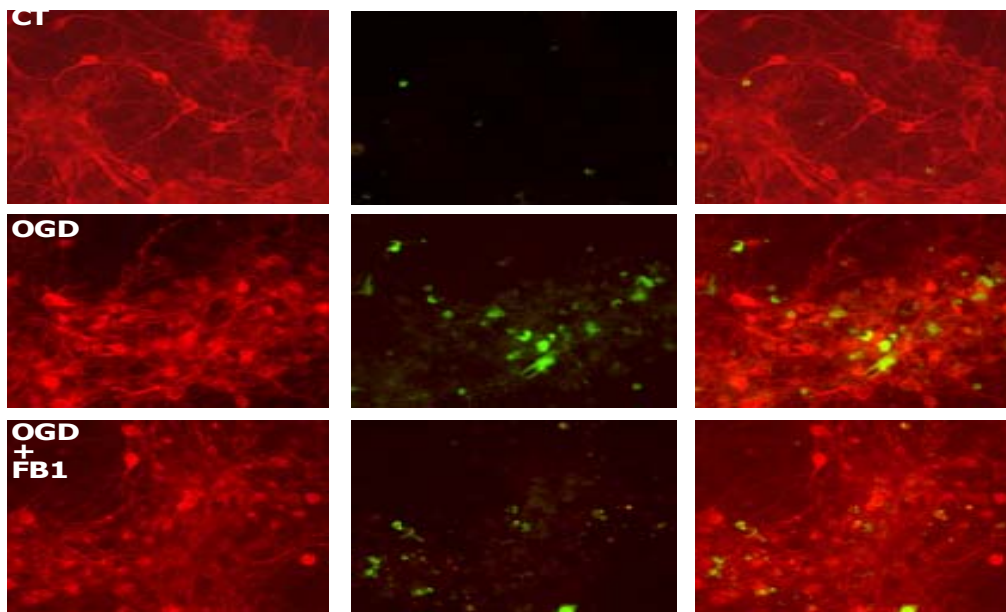


Figura 4.29 La fumoinisina B1 redueix l'activació de la caspasa 3 en neurones de cultius exposats a l'OGD. Es van realitzar les immunotincions contra la MAP2 (vermell) i el fragment actiu de la caspasa 3 (verd) de cultius exposats a l'OGD amb o sense fumonisina. La fumonisina redueix el nombre de neurones caspasa 3 positives en comparació als cultius sense fumonisina. Micrografies representatives de tres experiments realitzats per triplicat en cultius independents.

Els resultats del western blot dels diferents extractes confirmen els resultats de les immunocitoquímiques i van mostrar la reducció de l'activació de la caspasa 3 en cultius exposats a OGD prèviament tractats amb FB1

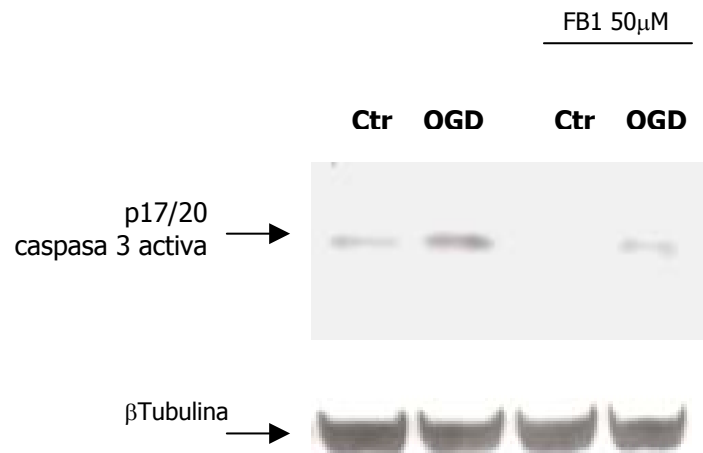


Figura 4.30. La fumoinisina B1 redueix l'activació de la caspasa 3 en neurones de cultius exposats a l'OGD. Es van realitzar l'anàlisi per western blot d'extractes de cultius control (Ctr) o exposats a l'OGD, amb o sense fumoinisina (FB1). El pannel superior mostra una reducció evident en el fragment de 20 Kda en els extractes exposats a l'OGD i prèviament tractats amb fumoinisina. El pannel inferior correspon a la immunodetecció de la tubulina en la mateixa membrana, com a control de càrrega proteica de cada carril. Western blot representatiu de tres experiments realitzats per triplicat en cultius independents.

L'assaig de la DAG quinasa és un mètode molt pràctic per a mesurar canvis importants en la concentració de ceramida, però per perfilar de manera més precisa la implicació de la síntesi *de novo* de la ceramida en la mort neuronal induïda per OGD, es va recórrer a experiments de marcatge metabòlic. Així, es van addicionar tant [³H]-palmitat com [¹⁴C]-serina, dos precursors de la síntesi *de novo* de ceramida, en el tampó BSS o BSS-5mM glucosa. Posteriorment, es van recollir les cèl·lules primer, en finalitzar l'exposició i segon, dues hores després de l'OGD. Es va realitzar una extracció lipídica de les cèl·lules i les fraccions es va analitzar mitjançant una cromatografia de capa fina (TLC) amb les fases descrites a Materials i Mètodes. Es va determinar la

radioactivitat corresponent a la ceramida i l'esfingomielina i es van comptar les dpm's en el comptador de guspireig (vegeu figura 4.31).

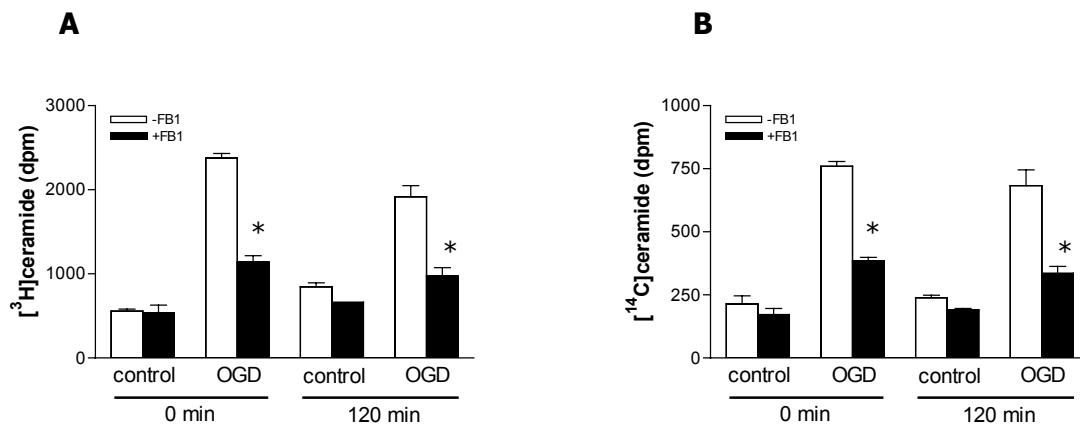


Figura 4.31. La fumoinisina B1 redueix la síntesi *de novo* de ceramida induïda per OGD. El marcatge metabòlic de la ceramida sintetitzada *de novo* a partir dels precursors radiactius [³H]-palmitat i [¹⁴C]serina va demostrar que l'OGD induïa una síntesi *de novo* de ceramida la qual es podia reduir amb el pretractament amb fumoinisina. Just després d'exposar els cultius a l'OGD (0 min) hi ha un augment de ceramida *de novo* que és reduït amb el pretractament amb FB1. La situació es manté dues hores després d'haver posat fi a l'OGD. Els resultats coincideixen per ambdós precursors. (Mitja de 3 experiments ±SEM *p<0.01 vs 75'OGD)

Els resultats obtinguts mostren una producció *de novo* de ceramida molt important en els cultius exposats a l'OGD. La producció de ceramida esdevé durant l'OGD i es manté fins a dues hores després de l'insult. En segon lloc es pot veure l'efecte de la fumoinisina, ja que els cultius exposats a l'OGD i prèviament tractats amb la micotoxina presenten una reducció en la concentració de ceramida sintetitzada. Els marcatges també van servir per marcar i quantificar l'esfingomielina (vegeu figura 4.32), principal substrat de les esfingomielinases. Les gràfiques mostren els resultats de la seva quantificació amb els dos marcatges radioactius diferents, en condicions de normòxia o OGD, amb o sense pretractament amb FB1.

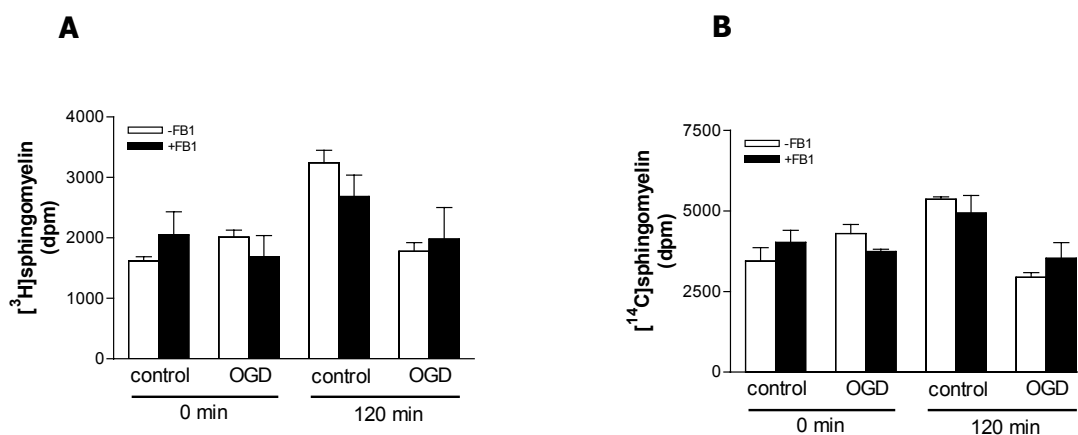
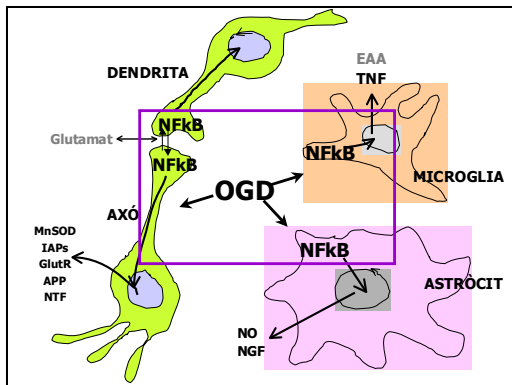


Figura 4.32. La fumoinisina B1 no redueix la degradació d'esfingomielina induïda per OGD. El marcatge metabòlic de l'esfingomielina a partir dels precursors radiactius [³H]-palmitat (A) i [¹⁴C]serina (B) va demostrar que l'OGD induïa una degradació d'esfingomielina, que era visible al cap de dues hores de finalitzar l'OGD en comparació al control. Aquesta degradació d'esfingomielina és insensible a l'acció de la fumoinisina B1. Els resultats coincideixen per ambdós precursors. (Mitja de 3 experiments ± SEM)

Les mesures es feren després de l'OGD o dues hores més tard. Es va apreciar una degradació d'esfingomielina en els extractes isquèmics a les dues hores de l'insult. Aquesta degradació d'esfingomielina es donava en els cultius exposats a l'OGD, independentment de si havien estat pretractats o no amb FB1.

CONCLUSIONS (III)

- el tractament dels cultius amb ceramida C2 induïx una mort neuronal per apoptosi amb una activació de la caspasa 3.
- L'OGD produeix una acumulació de ceramida endògena, tant per degradació de l'esfingomielina com per activació de la seva síntesi *de novo*.
- La ceramida sintetitzada *de novo* en l'OGD està implicada en l'activació de l'apoptosi, tant a nivell de condensació de cromatina com a nivell d'activació de caspasa 3.



4.2.3. EL NFκB:

Tal com s'ha esmentat en la introducció el factor nuclear κ B (NFκB) és un factor de transcripció que promou l'expressió de gens que codifiquen per un conjunt ben divers de proteïnes. Aquestes proteïnes poden ser proapoptòtiques o antiapoptòtiques, depenent del tipus cel·lular on es doni l'activació del NFκB i quan es doni a nivell temporal en el cas d'una isquèmia. El TNF α , la ceramida, el glutamat, els radicals lliures o l'augment de calci intracel·lular activen la maquinària responsable de la fosforilació de la subunitat IκB i la conseqüent translocació a nucli dels dímers p50/p65.

4.2.3.1. El TNF α activa el NFκB

Per estudiar la implicació del NFκB en el present sistema d'isquèmia *in vitro*, es van tractar les cèl·lules amb 100ngr/ml de TNF α i es va observar la seva activació al llarg del temps.(veure figura 4.33). El TNF α , al igual que la ceramida, és un activador del NFκB, segons el tipus de cultius cel·lulars utilitzats. Es va comprovar per immunodetecció contra la subunitat p65, que el NFκB mostrava una translocació des del citoplasma cap al nucli cel·lular.

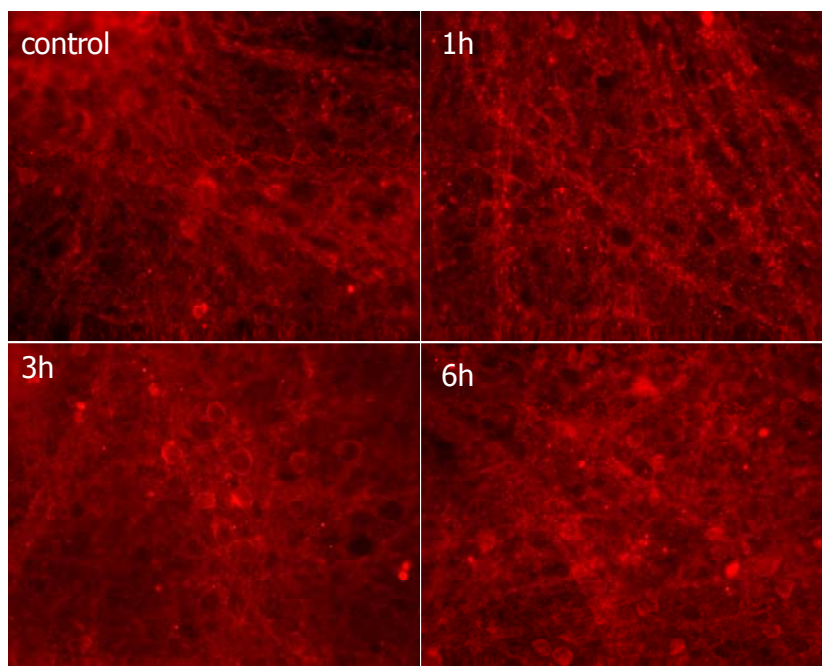


Figura 4.33. El TNF α activa el NF κ B. Els cultius es van tractar amb 100ngr de TNF α i es va estudiar la translocació del NF κ B mitjançant una immunotinció per la subunitat p65 del factor de transcripció. Tres hores després del tractament la translocació a nuclis del NF κ B es comença a fer palesa. Micrografies representatives de quatre experiments en triplicat realitzats en cultius independents.

Al cap d'una hora d'afegir TNF α , no s'apreciava cap canvi important d'ubicació. La translocació es va començar a fer evident al cap de tres hores que es mantenia a sis hores. Val a dir que la transactivació no es donava a totes les cèl.lules però les diferències en nombre entre el control i els tractaments a 3 i a 6 hores eren significatives.

4.2.3.2. L'OGD activa el NF κ B

En seccions anteriors s'ha demostrat que l'OGD induïa una alliberació de TNF α . Per estudiar si el NF κ B formava part de la via de senyalització del TNF α i quin paper exercia en la isquèmia *in vitro*, es va investigar si l'OGD també induïa una translocació del NF κ B. Els cultius es van exposar a una OGD de 75 minuts i 3-6 hores després, es van analitzar per immunocitoquímica mitjançant microscopia confocal (vegeu figura 4.34).

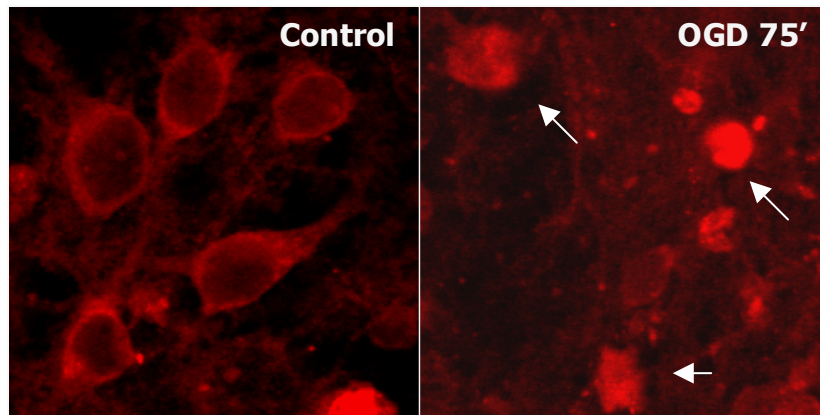


Figura 4.34. L'OGD indueix la translocació a nucli del NFκB. Els cultius es van exposar a 75'OGD i es va estudiar la translocació del NFκB mitjançant una immunotinció per la subunitat p65 del factor de transcripció. Les micrografies foren obtingudes per microscopia confocal. Tres hores després del tractament la translocació a nucli del NFκB es fa palesa (fletxes). Micrografies representatives de tres experiments en triplicat realitzats en cultius independents.

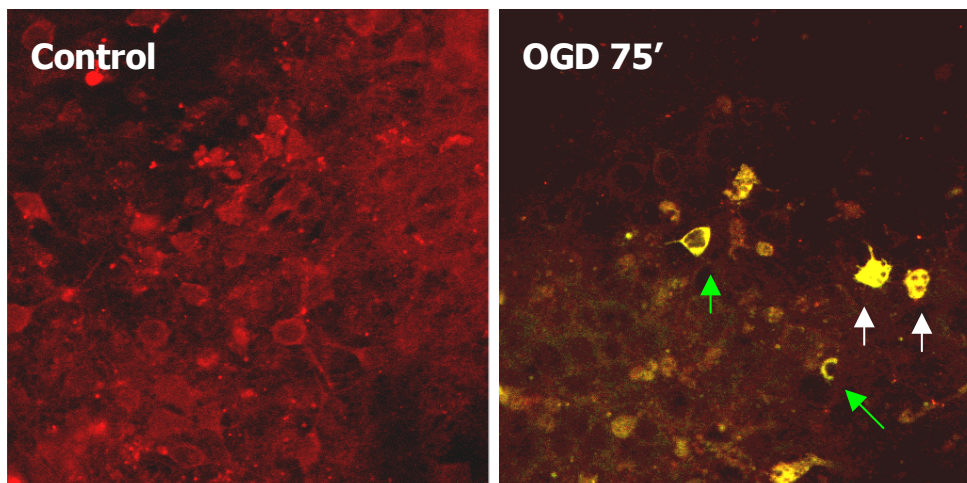


Figura 4.35. La translocació a nucli del NFκB induïda per l'OGD col.localitza amb les cèl·lules apoptòtiques. Els cultius es van exposar a 75'OGD i s'analitzà per immunocitoquímica l'activació de la caspasa 3 (verd) i la translocació del NFκB(vermell). En els cultius exposats a l'OGD, sota el microscopi confocal es va observar que part de les cèl·lules que mostraven translocació de NFκB al nucli també eren positives pel fragment actiu de la caspasa 3 (fletxes blanques). Hi ha cèl·lules amb la caspasa 3 activa sense mostrar translocació (fletxes verdes) En superposar les micrografies el color resultant de la col.localització d'ambdues proteïnes és el color groc. Micrografies representatives de tres experiments en triplicat realitzats en cultius independents.

L'OGD translocava el NFκB a nucli. A més, en fer la immunocitoquímica, també es va estudiar si la caspasa 3 s'activava en les mateixes cèl·lules que tenien el NFκB activat.

Les micrografies demostraren que en la majoria de les cèl.lules caspasa 3 positives també mostraven una translocació nuclear del NFκB (vegeu figura 4.35).

4.2.3.3. Efecte del bloqueig del NFκB en una OGD.

Per establir la funció d'aquesta activació del NFκB en una OGD es va recórrer a un inhibidor de la translocació de la seva subunitat p50, anomenat SN50. La viabilitat cel.lular dels cultius es va mesurar 24 hores després de sotmetre les cèl.lules a 75 minuts d'OGD, tant per l'assaig del MTT com de la tinció amb PI i Hoechst 33258.

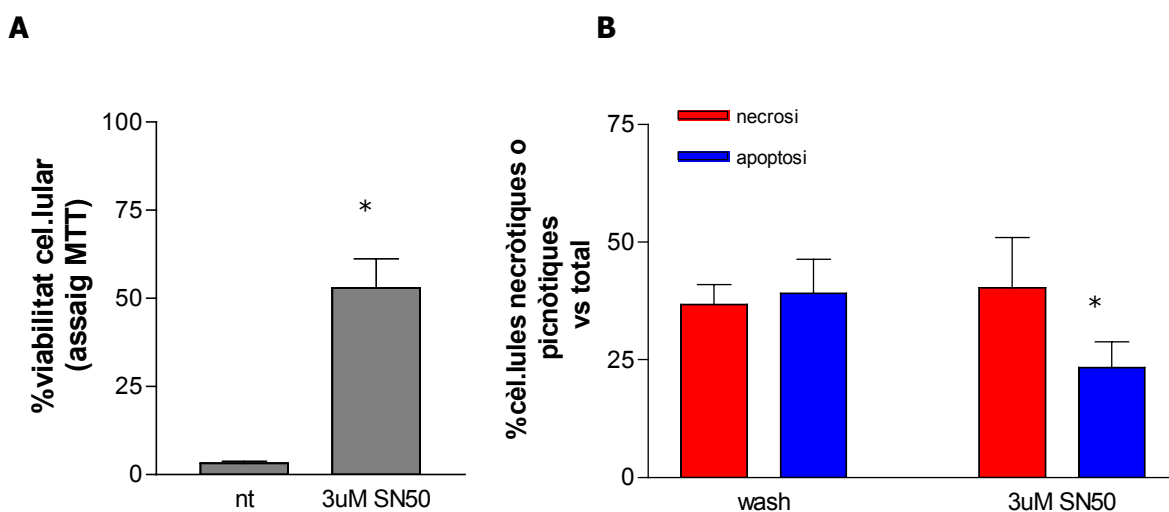


Figura 4.36. El bloqueig de la translocació del NFκB redueix la mortalitat cel.lular induïda per OGD. Els cultius es van exposar a 75'OGD en presència o en absència de 3 μM de SN50, un inhibidor de la subunitat p50 del NFκB. Al cap de 24 hores de l'OGD, la viabilitat dels cultius fou mesurada per la tècnica del MTT (A) i per la doble tinció fluorescent de PI i Hoechst(B). El tractament amb SN50 reduïa el dany cel.lular causat per l'OGD i més concretament reduïa l'aparició de nuclis apoptòtics. El component necròtic de la mort cel.lular no es va veure afectat. Mitja ± SEM de quatre experiments en triplicat realitzats en cultius independents. * p<0.01 vs no tractat o wash

3 μ M de SN50 protegien els cultius isquèmics en gairebé un 50% (vegeu figura 4.36 (A)). A nivell de components de mort (vegeu figura 4.36(B)), es va observar una disminució en el nombre de nuclis condensats tot i que el nombre de cèl·lules necròtiques no es veié afectat. En realitzar les immunocitoquímiques per a detectar activació de la caspasa 3 activa en neurones es va observar que el tractament de SN50 semblava reduir el processament de la procaspasa 3 (vegeu figura 4.37).

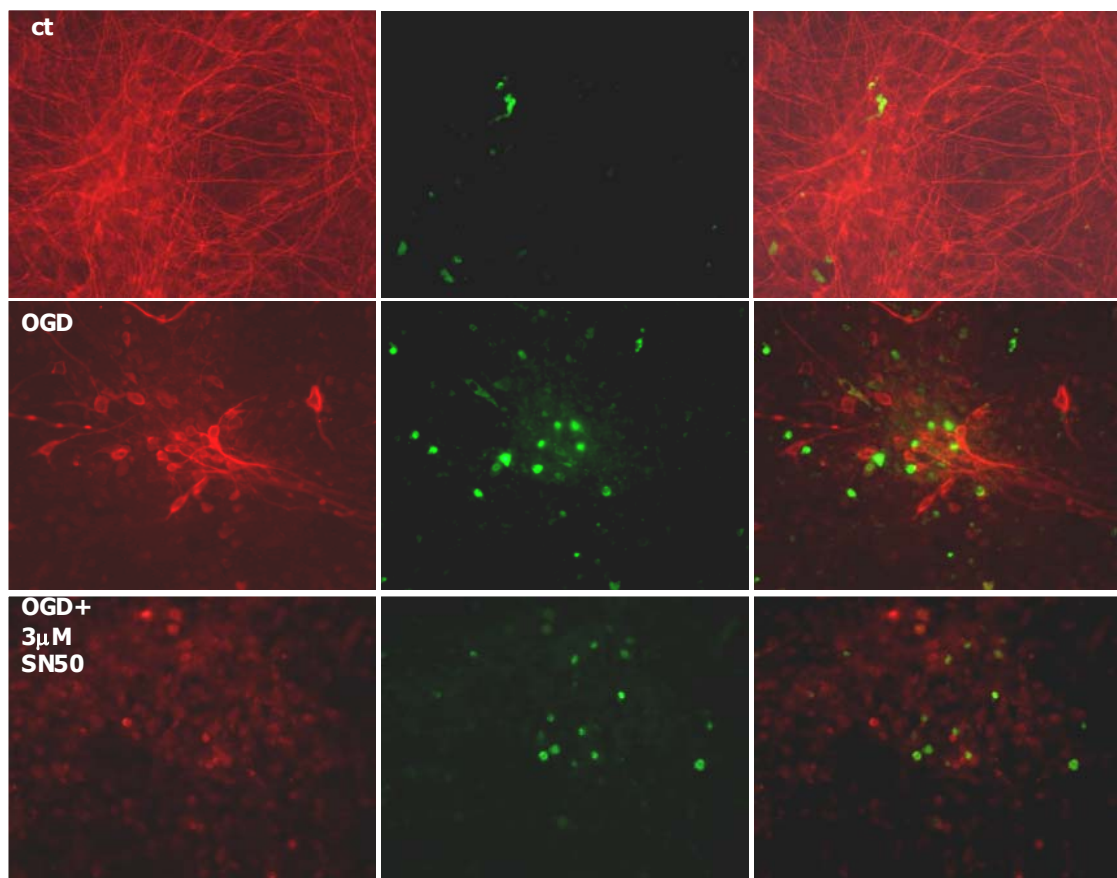


Figura 4.37. L'inhibidor del NF κ B redueix l'activació de la caspasa 3 induïda per OGD. Els cultius es van exposar a 75'OGD en presència o en absència de 3 μ M de SN50, un inhibidor de la subunitat p50 del NF κ B, i es va estudiar l'activació de la caspasa 3 en neurones mitjançant una immunotinció contra el fragment actiu de la proteasa (verd) i contra la MAP2 (vermell), respectivament. El SN50 redueix el nombre de neurones caspasa 3 positives. Micrografies representatives de tres experiments en triplicat realitzats en cultius independents.

En les micrografies es va observar que la xarxa neurítica dels cultius isquèmics tractats amb SN50 no manté la seva integritat, demostrant una pèrdua del marcatge neuronal MAP2.

4.2.3.4. Efecte del bloqueig del $\text{TNF}\alpha$ sobre el $\text{NF}\kappa\text{B}$ en una OGD.

Per tal de relacionar l'activació del $\text{NF}\kappa\text{B}$ amb la via de senyalització del $\text{TNF}\alpha$, es va utilitzar el mateix anticòs contra la citoquina esmentat en el capítol 4.2.1.3. Es va addicionar al medi de cultiu després de sotmetre les cèl·lules a una OGD i al cap de tres hores es va procedir a analitzar les preparacions. Amb el microscopi confocal es va observar que l'anticòs produïa una reducció parcial de la translocació del $\text{NF}\kappa\text{B}$.

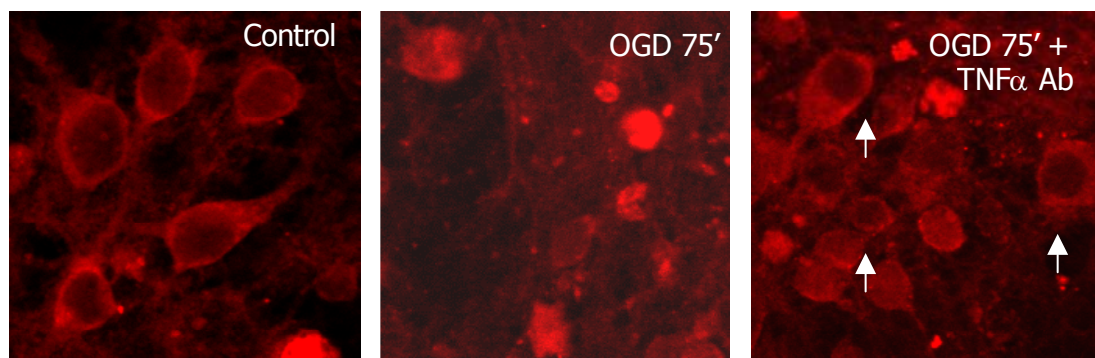


Figura 4.38. L'anticòs anti- $\text{TNF}\alpha$ redueix la translocació del $\text{NF}\kappa\text{B}$ induïda per OGD. La translocació de la subunitat p65 del $\text{NF}\kappa\text{B}$ es va estudiar per immunocitoquímica. Els cultius es van exposar a 75'OGD i llavors es va afegir vehicle o un anticòs específic contra el $\text{TNF}\alpha$ al medi de cultiu i les mostres es van observar sota el microscopi confocal. La presència de l'anticòs anti- $\text{TNF}\alpha$ després de l'OGD redueix (fletxes blanques) la translocació a nucli de la subunitat p65 del $\text{NF}\kappa\text{B}$. Micrografies representatives de tres experiments en triplicat realitzats en cultius independents.

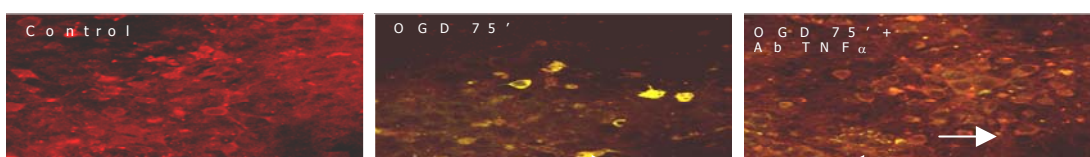


Figura 4.39. L'anticòs anti $\text{TNF}\alpha$ redueix la translocació del $\text{NF}\kappa\text{B}$ i l'activació de la caspasa 3 induïdes per OGD. La translocació de la subunitat p65 del $\text{NF}\kappa\text{B}$ (vermell) i l'activació de la caspasa 3 (verd) es va estudiar per immunocitoquímica. Els cultius es van exposar a 75'OGD i llavors es va afegir vehicle o un anticòs específic contra el $\text{TNF}\alpha$ al medi de cultiu. Les mostres es van observar sota el microscopi confocal. La presència de l'anticòs anti- $\text{TNF}\alpha$ després de l'OGD redueix (fletxes blanques) tant la translocació a nucli de la subunitat p65 del $\text{NF}\kappa\text{B}$ com l'aparició del fragment actiu de la caspasa 3. Micrografies representatives de tres experiments en triplicat realitzats en cultius independents.

A més a més, reduïa l'activació de la caspasa 3 col·localitzant amb la transactivació del factor nuclear.

4.2.3.5. Efecte del bloqueig de la síntesi de novo de ceramida sobre el NFκB en una OGD.

Tal com s'ha dit anteriorment, la síntesi *de novo* de la ceramida té un paper molt important en la mediació del component apoptòtic induït per OGD. A més, la ceramida està descrita com una activadora del NFκB. Per això es va voler bloquejar la síntesi *de novo* de la ceramida amb fumonisina i estudiar com podia afectar a l'activació del NFκB en una OGD. Es van realitzar les immunocitoquímiques contra la subunitat p65 tres hores després d'exposar les cèl·lules a l'OGD.

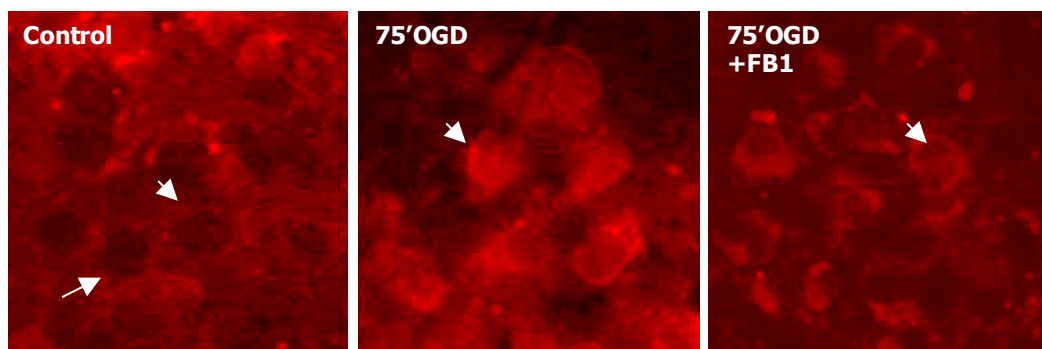


Figura 4.40. La fumonisina redueix la translocació del NFκB. Els cultius, pretractats o no amb FB1, que bloqueja la ceramida sintasa, van ser exposats a l'OGD. Al cap de 3 hores de posar fi a l'OGD, la translocació de la subunitat p65 del NFκB (vermell) es va estudiar per immunocitoquímica. El bloqueig de la síntesi de novo de ceramida per la FB1 redueix l'activació del NFκB al nucli de les cèl·lules. Micrografies representatives de tres experiments en triplicat realitzats en cultius independents.

En les micrografies es va observar una disminució clara de la translocació del NFκB en els cultius isquèmics pretractats amb FB1 en comparació als cultius exposats a l'OGD. Tot i així, tampoc s'arribava a nivells de les cèl·lules control. Per tant tot semblava indicar que la inhibició de la síntesi *de novo* bloquejava part de l'activació del NFκB induïda per una OGD. Cal recordar que la fumonisina no bloqueja l'efecte de les

esfingomielinases i que el *pool* de ceramida originari de la degradació de l'esfingomielina no es veu alterat. Aquesta part de ceramida que s'acumula a les cèl·lules explicaria l'activació romanent de la caspasa 3 i la transactivació del NF κ B.

CONCLUSIONS (IV)

- El tractament dels cultius amb TNF α 100 ng/ml i una exposició a l'OGD indueixen una activació i translocació a nucli del NF κ B
- Una exposició a l'OGD indueix una activació i translocació a nucli del NF κ B
- La translocació del NF κ B col·localitza amb l'activació de la caspasa 3 induïda per OGD
- El NF κ B media part de l'activació de la caspasa 3 induïda pel TNF α alliberat com a conseqüència de l'OGD.
- La ceramida sintetitzada *de novo* durant l'OGD està implicada en l'activació del NF κ B

4.3. APLICACIÓ DEL MODEL D'OGD PER VALORAR FÀRMACS

POTENCIALMENT NEUROPROTECTORS:

FÀRMACS HISTAMINÈRGICS.

El paper que desenvolupa el sistema histaminèrgic en la isquèmia cerebral és tot un camp per explorar. Les seves connexions amb el sistema glutamatèrgic poden tenir una importància notable en la modulació de la lesió isquèmica. Tal com s'ha indicat en la introducció, la histamina pot ser un modulador del dany neuronal isquèmic. Es pot dir que la Histamina executa una funció primordial en el control osmòtic de cèl·lules endotelials que confereixen la barrera hematoencefàlica. Tanmateix, un estudi previ del grup de treball, en sinaptosomes de rata, relatava la capacitat de la histamina per regular l'alliberament de glutamat mitjançant els receptors histaminèrgics H₂. A partir d'aquestes premisses es va estudiar l'efecte en la viabilitat neuronal del bloqueig dels receptors de la histamina durant una exposició a l'OGD.

4.3.1 Efecte dels diferents antagonistes de la histamina en cultius neuronals exposats a l'OGD .

Els antagonistes Mepiramina, Ranitidina i Tioperamida 123 dels receptors H₁, H₂ i H₃ respectivament, es van afegir als cultius uns 20 minuts abans de sotmetre les cèl·lules a una OGD o una normòxia de 75 minuts. Un dia després d'haver finalitzat l'exposició es va mesurar la viabilitat cel·lular pel mètode de la reducció del MTT. Els resultats es van normalitzar i s'expressaren en % de cèl·lules mortes. La figura 4.41 descriu la reducció de la mortalitat cel·lular en funció del tractament amb els diferents

antagonistes histaminèrgics. La ranitidina (100 μ M) va reduir la mortalitat en un 50%, seguida de la Tioperamida (0.1 μ M) que ho va fer en un 40%. La mepiramina (100 μ M) va demostrar poca capacitat de protecció neuronal.

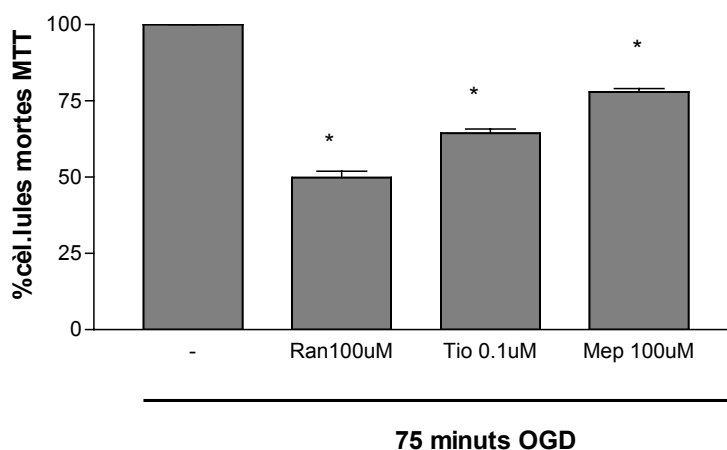


Figura 4.41. Efecte dels antagonistes dels diferents receptors histaminèrgics sobre la mort cel.lular induïda per OGD. Els cultius foren pretractats amb 100 μ M Mepiramina com a anti H1, amb 100 μ M Ranitidina com a anti H2 i amb 0.1 μ M tioperamida com a antiH3. S'exposaren a 75'OGD i 24 hores després es va mesurar la viabilitat cel.lular pel mètode del MTT. La gràfica expressa els resultats de la normalització del percentatge de cèl.lules mortes per a cada condició. Mitja \pm SEM de 5 experiments* p <0.01 vs no tractat.

4.3.2 Estudi dels receptors de la histamina H2 en cultius neuronals exposats a l'OGD .

Per determinar si l'efecte protector de la ranitidina era propi del compost o venia mediat pel receptor histaminèrgic H2, es va fer el mateix experiment però amb altres antagonistes H2 com la Cimetidina 100 μ M o la Tiotidina 100 μ M. Per a completar l'estudi s'utilitzaren també agonistes com la mateixa histamina (100 μ M) o agonistes específics dels H2 com l'Amthamina (10 μ M). Al cap de 24 hores, la viabilitat va ser quantificada per l'assaig del MTT (vegeu figura 4.42). Els resultats normalitzats es van expressar en % de cèl.lules mortes. Les dades mostraren els altres antagonistes com la cimetidina o la tiotidina exercien una neuroprotecció semblant a la de la ranitidina. D'altra banda, la preincubació abans d'una OGD amb agonistes H2 com l'amthamina o la mateixa histamina agreujaven la de mort neuronal.

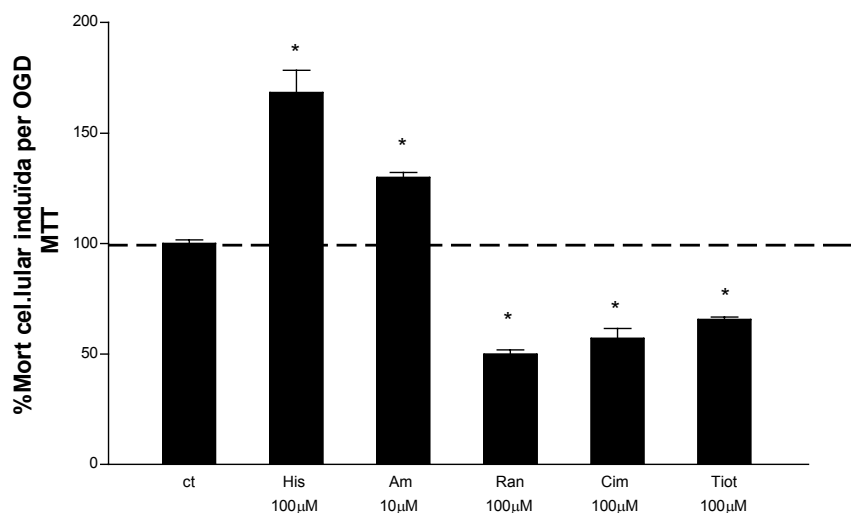


Figura 4.42. Efecte dels agonistes i dels antagonistes del receptor H2 en l'OGD. Els cultius foren pretractats amb antagonistes dels receptors H2, 100µM Ranitidina, 100µM Mepiramina o 100µM Tiotidina, o bé amb l'agonista endogen 100µM Histamina o l'agonista selectiu pels H2 10µM Amthamina. Posteriorment s'exposaren a 75'OGD i al cap de 24 hores se'n va mesurar la viabilitat pel mètode del MTT. La gràfica expressa els resultats de la normalització del percentatge de cèl·lules mortes per a cada condició. Mitja \pm SEM de 5 experiments en quadruplicat per cada condició i en cultius independents. * $p < 0.01$ vs ct.

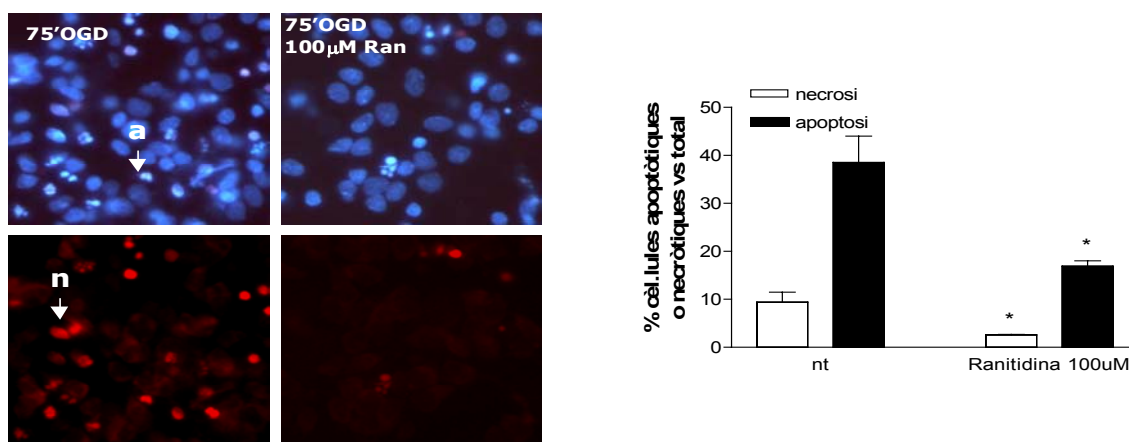


Figura 4.43. Efecte de la Ranitidina sobre la necrosi i l'apoptosi induïdes per l'OGD. Els cultius foren pretractats amb l'antagonistes dels receptors H2, 100µM Ranitidina. Posteriorment s'exposaren a 75'OGD i al cap de 24 hores es tenyiren amb PI i Hoechst 33258. Les micrografies de l'esquerra corresponen al mateix camp d'observació per a condicions d'OGD i per a la condició d'OGD amb Ranitidina. S'observa una disminució dels nuclis amb la cromatina condensada (a). La gràfica de la dreta correspon als recomptes cel.lulars de les micrografies. Confirma la reducció del nombre de nuclis condensats i, en menor importància, la reducció de les cèl·lules necròtiques (n). La gràfica expressa el percentatge de cèl·lules necròtiques i apoptòtiques vers el total. Mitja \pm SEM de 3 experiments en quadruplicat per cada condició i en cultius independents * $p < 0.01$ vs nt.

Posteriorment, cultius normòxics o isquèmics tractats amb els compostos anteriors es van tenyir amb Hoechst 33258 i PI els cultius (vegeu figura 4.43). Es van comptabilitzar els nuclis condensats i les cèl·lules necròtiques que apareixien en cada condició. Es va observar que la ranitidina era l'antagonista més eficient en reduir el dany cel·lular (micrografies i recomptes no mostrats per als altres antagonistes H2).

Els cultius exposats a l'OGD pretractats o no amb 100 μ M de Ranitidina (vegeu figura 4.43) van revelar que aquest antagonista H2 era capaç de reduir a la meitat tant el percentatge de nuclis apoptòtics com el percentatge de cèl·lules necròtiques.

4.3.3. Efecte dels antagonistes H2 sobre l'activació de la caspasa 3 induïda per OGD.

La reducció dels nuclis picnòtics per part de la ranitidina en cultius exposats a l'OGD va fer pensar en la possibilitat que els receptors H2 desenvolupessin algun paper en els mecanismes apoptòtics desencadenats en una isquèmia. Per això es van exposar de nou les cèl·lules a una OGD prèviament pretractades o no amb ranitidina 100 μ M. Sis hores després de l'exposició a la normòxia o a l'OGD part de les cèl·lules foren recollides per ser analitzades per western blot i l'altra part foren fixades per portar a terme una immunocitoquímica. L'objectiu d'ambdues tècniques era estudiar l'efecte que causava la ranitidina en l'activació de la caspasa 3 induïda per OGD.

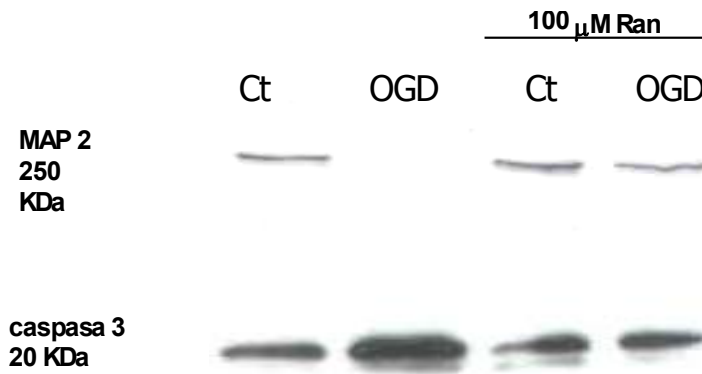


Figura 4.44. Efecte de la Ranitidina sobre la degradació de la MAP2 i l'activació de la caspasa 3. Els cultius foren pretractats amb l'antagonista dels receptors H₂, 100 μ M Ranitidina. Posteriorment, s'exposaren a 75'OGD i al cap de 6 hores es recolliren els extractes cel.lulars per ser analitzats per western blot. L'OGD indueix una degradació de la proteïna estructural MAP2. El tractament amb ranitidina preserva aquesta degradació (pannell superior). La mateixa membrana fou incubada amb l'anticòs que reconeix la forma activa de la caspasa 3 (pannell inferior) El tractament amb ranitidina bloqueja l'activació de la caspasa 3 en els extractes isquèmics. Western blot representatiu de tres experiments realitzats en triplicat i en cultius independents

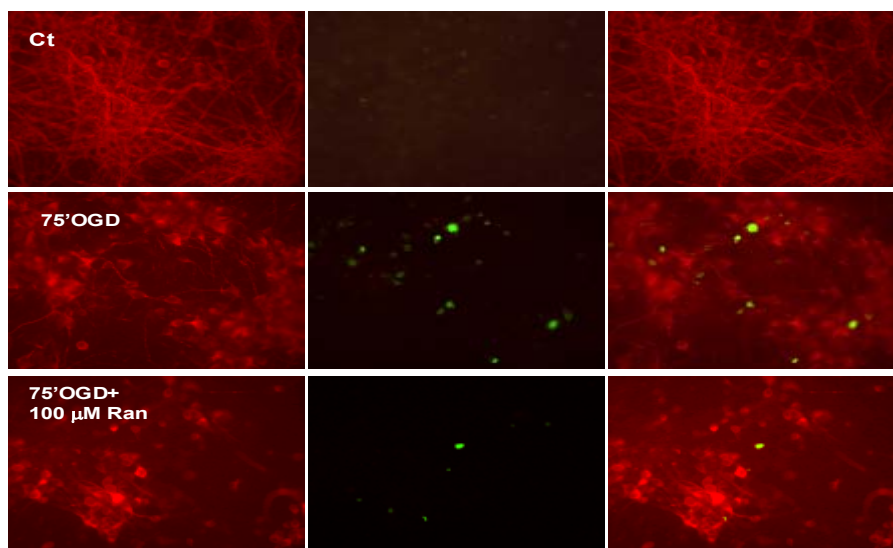


Figura 4.45. Efecte de la Ranitidina sobre la necrosi i l'apoptosi induïdes per l'OGD. Els cultius foren pretractats amb l'antagonista dels receptors H₂, 100 μ M Ranitidina. Posteriorment s'exposaren a 75'OGD i al cap de 6 hores es van analitzar per immunocitoquímica amb els anticossos contra la MAP2 (vermell) i contra el fragment actiu de la caspasa 3 (verd). La ranitidina redueix l'activació de la caspasa 3 i la degradació de la xarxa neurítica induïda per OGD. Micrografies representatives de tres experiments realitzats en triplicat i en cultius independents

Els resultats del western blot (veure figura 4.44) van demostrar que la ranitidina disminuïa el nivell d'activació de la caspasa 3. A més, es va observar com el tractament amb Ranitidina preservava la proteïna MAP2 de la degradació que esdevenia en condicions d'OGD sense tractament, tal com es mostra en el segon carril del pannel superior. Els mateixos resultats es van obtenir en les immunocitoquímiques (veure figura 4.45)

4.3.4. Finestra terapèutica dels antagonistes H2 en l' OGD.

El pretractament amb ranitidina havia resultat molt eficient a l'hora de protegir els cultius tant de la necrosi com de l'apoptosi induïda per l'exposició a l'OGD. D'altra banda, la importància dels tractaments terapèutics en una isquèmia cerebral és la finestra temporal efectiva dels fàrmacs. Això vol dir que la utilitat d'un fàrmac en el tractament de l'ictus rau en la seva capacitat d'aturar les cascades citotòxiques que es desencadenen en les hores o dies posteriors a l'infart. Es va estudiar la capacitat neuroprotectora a posteriori dels antagonistes H2, i principalment de la Ranitidina. En primer lloc, els cultius sense pretractament es van exposar a una OGD de 75 minuts. Un cop finalitzada l'OGD, es van tractar els cultius amb 100 μ M ranitidina al cap de 3 o 6 hores. Al cap de 24 hores de l'insult es va mesurar la viabilitat per l'assaig de la reducció del MTT (vegeu figura 4.46).

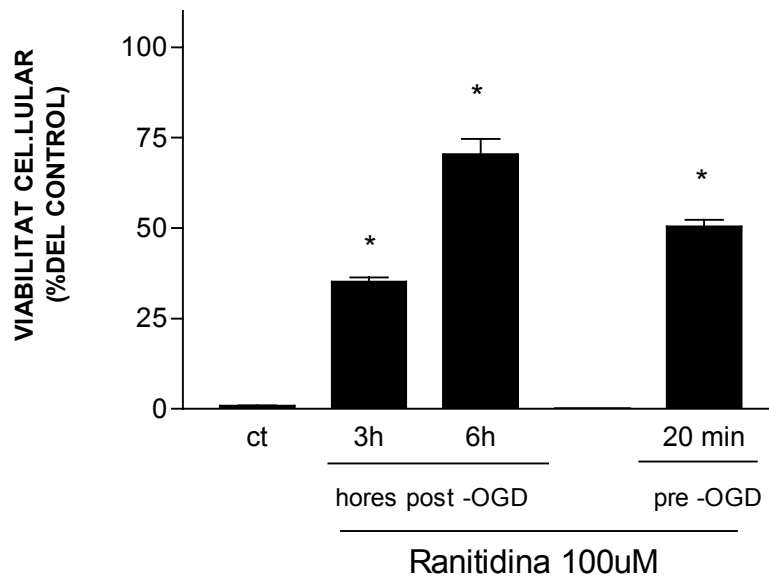


Figura 4.46. Efecte del tractament post OGD amb Ranitidina. Els cultius s'exposaren a 75'OGD i posteriorment foren tractats amb l'antagonista dels receptors H2, 100 μ M Ranitidina al cap de 3 o 6 hores (hores post-OGD). En paral·lel, altres cultius foren pretractats (20 minuts) amb 100 μ M Ranitidina i posteriorment s'exposaren a 75'OGD. La viabilitat cel·lular es va mesurar al cap de 24 hores amb la tècnica del MTT. La ranitidina preserva la viabilitat cel·lular tant administrada abans de l'OGD com 3 i 6 hores després de l'OGD. Mitja \pm SEM de 6 experiments realitzats per quadruplicat i en cultius independents * p <0.01 vs ct;

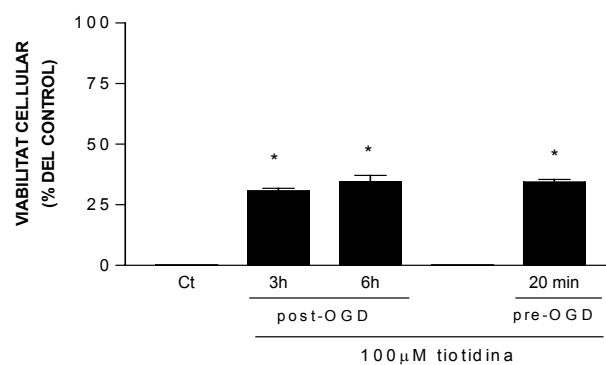


Figura 4.47. Efecte del tractament post OGD amb Tiotidina. Els cultius s'exposaren a 75'OGD i posteriorment foren tractats amb l'antagonista dels receptors H2, 100 μ M Tiotidina al cap de 3 o 6 hores (hores post-OGD). En paral·lel, altres cultius foren pretractats (20 minuts) amb 100 μ M Tiotidina i posteriorment s'exposaren a 75'OGD. La viabilitat cel·lular es va mesurar al cap de 24 hores amb la tècnica del MTT. La Tiotidina preserva la viabilitat cel·lular tant administrada abans de l'OGD com 3 i 6 hores després de l'OGD, a l'igual que la Rantidina. Mitja \pm SEM de 3 experiments realitzats per quadruplicat i en cultius independents * p <0.01 vs ct;

Els resultats de viabilitat es van comparar amb els obtinguts amb el pretractament de 20 minuts descrit anteriorment. Es va poder observar que la ranitidina afegida als cultius isquèemics 3 o 6 hores després de l'OGD encara era capaç de prevenir la mort neuronal. Fins i tot, el percentatge de viabilitat obtingut en el post-tractament de 6 hores superava la viabilitat obtinguda en el pretractament de ranitidina 20 minuts abans de començar l'OGD. Els experiments de viabilitat també es van realitzar amb un altre antagonista H2, la tiotidina i es van obtenir resultats de protecció similars a la ranitidina (vegeu figura 4.47). A partir d'aquelles dades es van tenyir els cultius neuronals amb PI i Hoechst 33258 que havien estat sotmesos a les mateixes condicions que en l'assaig de MTT i es van fer els recomptes de les cèl·lules necròtiques i dels nuclis apoptòtics.

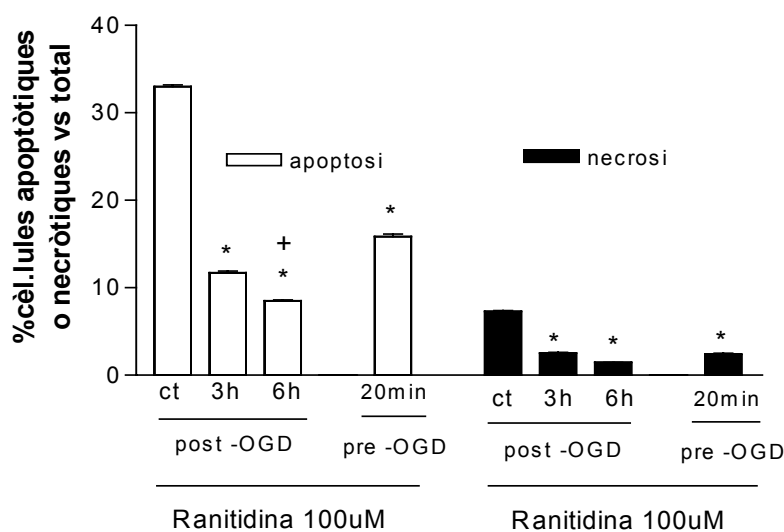


Figura 4.48. Efecte del tractament post OGD amb Ranitidina en l'apoptosi i la necrosi. Els cultius s'exposaren a 75'OGD i posteriorment foren tractats amb l'antagonista dels receptors H2, 100µM Ranitidina al cap de 3 o 6 hores després de l'OGD (hores post-OGD). En paral·lel, altres cultius foren pretractats (20minuts) amb 100µM Ranitidina i posteriorment s'exposaren a 75'OGD. Al cap de 24 hores, els cultius es van tenyir amb PI i Hoechst 33258. La gràfica expressa el resultat dels recomptes de les micrografies. La ranitidina redueix el nombre de nuclis condensats i de cèl·lules necròtiques, tant administrada abans de l'OGD com administrada 3 i 6 hores després de l'OGD. Mitja ± SEM de 6 experiments realitzats per quadruplicat i en cultius independents. * p < 0.01 vs ct; + p < 0.05 vs 20 min

La gràfica expressa el percentatge de nuclis apoptòtics o necròtics en funció dels tractaments amb ranitidina, 3 o 6 hores després de l'OGD o bé amb el pretractament convencional de 20 minuts abans de l'OGD. Els post-tractaments amb ranitidina reduïen el nombre de nuclis amb la cromatina condensada en comparació al pretractament convencional. A nivell de necrosi l'efecte no era tant marcat però el comportament era similar que en l'apoptosi.

Finalment, es van recollir extractes de cèl·lules que havien estat exposades a l'OGD i tractades de la mateixa manera i es va estudiar per western blot el grau d'activació de la caspasa 3. Els extractes es van recollir nou hores després de l'exposició a la normòxia o a l'OGD. La membrana també es va incubar amb un anticòs que reconeixia la proforma de la caspasa 3, a més de l'anticòs específic de la proteasa activa. Es va veure el processament de les dues isoformes de la caspasa 3. S'observà que el tractament amb ranitidina reduïa l'aparició del fragment de 29 KDa, resultant de l'acció de la calpaïna. En el postractament de 3 hores, la ranitidina aconseguia bloquejar el processament de la caspasa 3 i no hi havia diferències entre les bandes del control o l'OGD a l'alçada del 20 KDa.

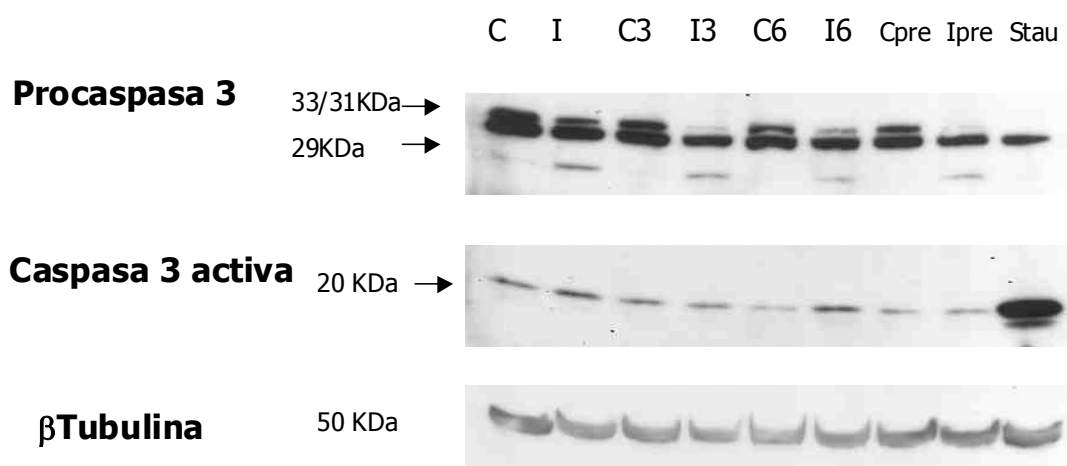


Figura 4.49. Efecte del tractament post-OGD amb Ranitidina vers l'activació de la caspasa 3.

Els cultius s'exposaren a 75'OGD i posteriorment foren tractats amb l'antagonista dels receptors H2, 100 μ M Ranitidina al cap de 3 (C3 i I3) o 6 hores (C6 i I6) després de l'OGD (hores post-OGD). En paral·lel, altres cultius foren pretractats (Cpre, Ipre) amb 100 μ M Ranitidina i posteriorment s'exposaren a 75'OGD. (C: control; I: OGD) S'introduí un control apoptòtic amb cèl·lules tractades amb estaurosporina 1 μ M. Al cap de 9 hores de posar fi a l'OGD, es van recollir els extractes cel·lulars per ser analitzats per western blot. La membrana fou incubada amb l'anticòs contra la procaspasa 3 i amb l'anticòs que reconeix exclusivament el fragment actiu de la proteasa. A més, es va realitzar una incubació amb l'anticòs contra la tubulina per tenir un control de càrrega proteica dels pous.

A sis hores en canvi, tot i el post tractament amb ranitidina, ja s'observa una activació diferencial en els extractes isquèmics. Els dos últims carrils corresponen als extractes cel·lulars del tractament convencional amb ranitidina (20 minuts abans de l'OGD). Es pot observar una altra vegada com la ranitidina bloqueja l'activació de la caspasa 3 en l'OGD. Es va introduir un control apoptòtic amb estaurosporina, que correspon a l'últim carril del western blot.

CONCLUSIONS (V)

- El sistema histaminèrgic, per via dels receptors H2 principalment, està implicat en la mort neuronal induïda per OGD.
- Els antagonistes H2 i en especial la Ranitidina redueixen la necrosi produïda per OGD.
- Els antagonistes H2 i en especial la Ranitidina també redueixen l'apoptosi disminuint l'activació de la caspasa 3, la degradació de la MAP2 i la condensació de cromatina.
- La finestra terapèutica de la ranitidina arriba fins a sis hores després de l'exposició a l'OGD, actuant sobre l'activació de la caspasa 3.