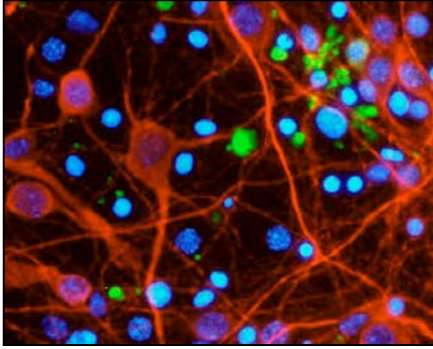


5. DISCUSSIÓ



5. DISCUSSIÓ

Un accident cerebrovascular comporta una disminució dràstica i ràpida de glucosa i oxigen a la zona cerebral infartada. El teixit afectat es veu sotmès a un estrès metabòlic on la depleció d'energia i l'acumulació d'espècies tòxiques produeixen perturbacions en l'entorn cel.lular que esdevenen letals segons la seva durada i la seva intensitat. Els gradients iònics cel.lulars es dissipen (Obrenovitch TP.,1995) i cessa l'activitat elèctrica (Katsura K. et al., 1994). La implicació del glutamat en la isquèmia cerebral ha estat intensament estudiada, sobretot perquè es va descobrir que el bloqueig del receptor NMDA reduïa notablement el dany neuronal isquèmic (Simon RP. et al., 1984). Els sistemes de recaptació de neurotransmissors, que depenen dels gradients iònics, perden la seva funció o bé la inverteixen (Rossi DJ. et al., 2000) i es produeix una acumulació de glutamat a l'espai extracel.lular (Benveniste H. et al., 1984; Nicholls D. et al., 1990). L'activació reiterada dels receptors glutamatèrgics pel seu lligand desencadena una mort neuronal irreversible. Així doncs, actualment la toxicitat del glutamat o excitotoxicitat es pot relacionar amb la patogènesi de la mort neuronal després d'una isquèmia (Lee JM. et al., 2000).

En els últims anys, l'estudi de la isquèmia cerebral ha hagut d'afrontar una realitat que ha fet trontollar un dels postulats més defensats de les últimes dècades: la necrosi com a mecanisme únic de mort cel.lular (Brown A.W. et al., 1972). La bibliografia actual recull proves sobre la implicació de l'apoptosi en la isquèmia cerebral tot i que se'n sap

ben poc dels mecanismes que la desencadenen (MacManus JP. et al., 1993; Linnik MD. et al., 1993; Choi DW. et al., 1990,1992,1996).

Aquest treball es va basar en la idea de constituir un model d'isquèmia *in vitro* que permetés una aproximació fiable a una situació d'isquèmia *in vivo*. El model també havia de ser vàlid per a l'estudi dels mecanismes implicats en la mort cel·lular isquèmica (Goldberg MP. et al., 1993)

El model d'OGD

Per tal d'aproximar-nos a una situació *in vivo* d'isquèmia cerebral es va utilitzar un model de deprivació de glucosa i oxigen sobre cultius corticals de rata. Hi ha altres models *in vitro* d'infart cerebral, com per exemple les llesques de teixit o *slices* o els cultius organotípics (Lipton P.,1999). Aquests sistemes, a diferència dels cultius primaris, conserven la integritat del teixit, contenen cèl·lules endotelials i proinflamàtores i mantenen l'estructura neuronal. Malgrat aquestes característiques, els cultius primaris tenen les següents avantatges: permeten un control més rigorós de les condicions, l'accessibilitat dels fàrmacs és major i el seguiment de cada tipus cel·lular és molt més fàcil. Totes aquestes inferències fan dels cultius neurals un sistema adient, accessible i pràctic per a l'estudi del dany neural isquèmic.

L'adequació dels protocols de cultiu va portar a assajar una sèrie de condicions on la prioritat inicial era l'obtenció de cultius viables de neurones corticals. La variable més conflictiva en tots els casos fou l'addició de l'inhibidor mitòtic Ara C, per aturar la proliferació no neuronal. Després d'estudiar el percentatge de cultius viables segons les condicions seguides, es va arribar a la conclusió que el fet de retardar l'addició de l'Ara C fins el 7è dia *in vitro* (DIV), assegurava la supervivència d'un 100% dels cultius. Aquest nou protocol es traduí en l'obtenció de cultius viables i funcionals al llarg de dues o tres setmanes. Val a dir que la presència de glia (d'astròcits i microglia)

afavoreix la progressió dels cultius neuronals. Hi ha autors que sembren les neurones sobre monocapes d'astròcits confluents per assegurar-ne la viabilitat. (Goldberg MP. et al., 1993) En el nostre cas es va preferir un cultiu mixt neuroglial vers el cocultiu sobre la monocapa glial perquè es va comprovar que el procés d'exposició a l'OGD, concretament els diferents rentats amb BSS, desenganxaven tota la monocapa d'astròcits. Addicionalment, el dany cel.lular es veia reduït perquè els sistemes de recaptació de glutamat presents en la glia reduïen la concentració de glutamat al medi de cultiu.

La funcionalitat dels cultius neurals viables (vegeu figura 4.1), es va corroborar amb els experiments de mesura d'alliberació de [³H]-glutamat, en resposta a estímuls despolaritzants. Els resultats d'aquests experiments demostraren que els cultius eren capaços d'alliberar glutamat, de manera dependent de calci, quan eren despolaritzats amb altes concentracions de potassi. L'*overflow*, que representa el valor net de glutamat alliberat, era inferior en els cultius viables obtinguts a partir de la condició 7 que l'*overflow* obtingut en els altres cultius. Aquest fet podia suggerir que la funcionalitat d'aquests cultius era més baixa que la resta, però en estudiar detalladament les condicions experimentals s'observà que la senyal obtinguda de glutamat alliberat depenia del percentatge glial propi de la condició del cultiu. La glia té sistemes molt efectius de recaptació de glutamat (Huang R. et al., 1993). Amb l'addició tardana de l'inhibidor mitòtic Ara C, la proporció glial augmenta i la capacitat de recaptació de glutamat és molt més gran. Aquesta premissa fou demostrada amb els experiments realitzats en cultius de neurones sembrades sobre monocapes d'astròcits, on l'*overflow* de [³H]-glutamat obtingut va ser nul.

A partir del protocol proposat per Goldberg MP i Choi DW.(1993), i introduint-hi diverses variacions, es va establir un sistema per exposar els cultius esmentats a una

deprivació d'oxigen i glucosa (OGD). La caracterització inicial del model es va realitzar mesurant la viabilitat cel·lular amb l'assaig de la reducció del MTT, 24 hores després de sotmetre els cultius a l'OGD. Els períodes d'OGD utilitzats foren de 15, 45 i 75 minuts. Estava descrit que aquests períodes de temps afectaven selectivament les neurones ja que l'aparició de dany astrocitari requeria exposicions d'OGD de més de sis hores (Goldberg MP. et al., 1993). Inicialment es va mesurar la viabilitat cel·lular per mitjà de dues tècniques diferents: la mesura de l'activitat LDH (Koh JY. et al., 1987) i l'assaig del MTT (Mosmann T.,1983). Teòricament, la primera tècnica determina el % de cèl·lules que tenen la membrana citoplasmàtica trencada a partir de l'activitat LDH del medi de cultiu. La segona tècnica està basada en l'estat energètic mitocondrial cel·lular ja que el MTT és reduït per les deshidrogenases mitocondrials, la qual cosa permet quantificar la proporció de cèl·lules viables (vegeu Materials i Mètodes). Les cèl·lules apoptòtiques en cultiu, en fase tardana també perden la integritat de membrana i per tant també alliberen LDH al medi de cultiu. Aquestes cèl·lules *in vivo* serien fagocitades pels macròfags circumdants, cèl·lules que són inexistents en cultiu. Els resultats obtinguts per la tècnica del MTT van revelar que 15, 45 i 75 minuts d'OGD induïen un 20, un 30 i un 50 % de mort neuronal respectivament, i que per tant, la magnitud del dany depenia de la durada de l'exposició. Els resultats obtinguts mitjançant l'assaig d'activitat de la Lactat deshidrogenasa (LDH) dels cultius exposats als esmentats períodes d'OGD foren molt semblants als obtinguts amb la tècnica del MTT (vegeu figura 4.3) i concordaven amb els descrits anteriorment en la bibliografia (Goldberg MP. et al., 1993).

Al cap de 24 hores d'exposar els cultius a l'OGD, en presència d'antagonistes dels receptors ionotròpics del glutamat, es va observar una protecció neuronal. En el cas del (+)-MK801, un antagonista no competitiu del receptor NMDA, la protecció va arribar fins a un 90%. En canvi, l'antagonista dels receptors AMPA/KA, el CNQX, només

protegia els cultius en un 66% (vegeu Taula 4.1). Aquests resultats van demostrar que el glutamat, principalment per via del receptor NMDA, estava implicat en la inducció del dany neuronal induït per OGD. Els resultats obtinguts concordaven amb la bibliografia existent (Simon RP. et al., 1984; Goldberg MP. et al., 1993) i conseqüentment recolzaven la validesa del model d'isquèmia *in vitro*. La qüestió que es plantejà a partir d'aquests resultats fou quin tipus de mort cel·lular desencadenava el glutamat i quins altres factors determinaven l'abast de la lesió.

L'apoptosi induïda per l'OGD: el paper de les caspases

S'havia descrit que en els models d'isquèmia *in vitro*, el component apoptòtic de la mort neuronal induïda per OGD es desemmascarava amb la presència obligada de (+)-MK801, que bloquejava la necrosi fulminant de les neurones (Gwag BJ. et al., 1995). Aquests autors demostraren que els cultius pretractats amb (+)-MK801 i exposats a l'OGD mostraven una degeneració tardana que anava acompanyada d'una condensació de cromatina. Això comportava la necessitat d'eclipsar un mecanisme de mort per poder-ne visualitzar un altre. En el moment de començar aquest treball, els antecedents bibliogràfics sobre la quantificació relativa dels components de la mort isquèmica, necrosi i apoptosi, eren gairebé inexistents. Per tal d'estudiar els possibles components de la mort cel·lular induïda per OGD i quantificar la seva importància relativa en el dany neuronal isquèmic, es van combinar dues tincions fluorescents dels àcids nuclèics, el Hoechst 33258 i el Iodur de Propidi (PI) (Gschwind M. & Huber G., 1993 ; Yoshimura S. et al., 1998). El fet de tenyir una mateixa mostra amb PI abans de fixar les cèl·lules i amb Hoechst 33258 després de fixar-les, va permetre observar els nuclis cel·lulars en diferents estats (vegeu Materials i Mètodes taula 3.2). Els cultius van ser sotmesos a diferents períodes d'OGD i al cap de 24 hores, les tincions

fluorescents van desvetllar que es produïa de manera paral·lela una mort cel·lular per necrosi i per apoptosi. Malgrat els antecedents bibliogràfics de la presència obligada del (+)-MK801 per desemmascarar l'apoptosi (Gwag BJ. et al 1995), es va poder discriminar els dos components de mort a partir de la morfologia nuclear de les cèl·lules tenyides. La raó per la qual no fou necessària la presència de l'antagonista del receptor NMDA per visualitzar l'apoptosi en els nostres cultius exposats a l'OGD és desconeguda però el mètode va permetre el recompte cel·lular (vegeu figures 4.4 i 4.5). Els resultats indicaren que la fragmentació o condensació de la cromatina es feia evident al cap de 24 hores encara que el període d'OGD fos curt, per exemple 15 minuts d'OGD. Períodes més llargs com 45 o 75 minuts d'OGD no mostraven diferències molt marcades entre ells, a nivell de percentatge de cèl·lules apoptòtiques. D'altra banda, el component necròtic prenia més importància a mida que s'augmentava la durada de l'OGD (vegeu figura 4.5) . També s'ha suggerit que el receptor NMDA pot induir de manera remota l'expressió de citoquines inflammatòries com el $TNF\alpha$ en models d'isquèmia in vivo, i aquesta inducció es veuria revertida en presència de (+)-MK801 (Jander S. et al.,2000). Això es podria relacionar amb el fet que, segons el grau d'activació del receptor NMDA, s'indueix necrosi o apoptosi (Ankakrona M. et al., 1995)

Per tal de ser rigorosos, es va comprovar que la condensació de cromatina es podia correlacionar amb l'activació d'un programa de mort. Un dels marcadors apoptòtics més acceptats actualment és l'activació d'una proteasa executora de gran rellevància en els processos apoptòtics: la caspasa 3 (Keane RW. et al.,1997; Zhu C. et al.,2000). Malgrat la gran variabilitat de resultats existents segons el model d'isquèmia cerebral utilitzat (Loetscher H. et al., 2001), sis hores després d'exposar els cultius a l'OGD, es va observar una activació evident de la caspasa 3 per immunocitoquímica (vegeu figura 4.6).

Es va introduir un control d'apoptosi tractant cèl·lules amb estaurosporina (Gottron FJ. et al.,1997) i un control de necrosi amb 1mM de glutamat. En les cèl·lules tractades amb 1 μ M d'estaurosporina el marcatge per la caspasa 3 al cap de sis hores de tractament, era evident. Els controls necròtics amb glutamat, al igual que els controls normòxics no mostraven activació de la caspasa 3. Els tres controls realitzats van validar el resultat obtingut en les cèl·lules exposades a l'OGD, que presentaven una activació important de caspasa 3. A més, la presència de Z.VAD.FMK, un inhibidor irreversible de les proteases caspasa 1-like (caspasa 1 i 4) i de la caspasa 3 i 7, en els cultius exposats a l'OGD, bloquejava tant l'activació de la caspasa 3 com la condensació de cromatina posterior (vegeu figura 4.7). Aquests resultats van permetre correlacionar l'activació de la caspasa 3 i la condensació de cromatina induïdes per OGD. En els controls d'apoptosi tractats amb estaurosporina, el Z.VAD.FMK també bloquejava l'activació de la caspasa 3 i la condensació de cromatina. Els resultats obtinguts amb el Z.VAD.FMK en el model d'isquèmia *in vitro* coincidien amb els antecedents existents a la bibliografia on es descriu el bloqueig de la caspasa 3 i, en conseqüència, de l'apoptosi, en un model d'isquèmia *in vivo* (Hara et al.,1997) i en un model d'OGD *in vitro* (Gottron FJ. et al. 1997), respectivament. Addicionalment es va poder observar en les micrografies obtingudes que hi havia una translocació a nucli de la caspasa 3 activa. La procaspasa 3 resideix al citoplasma, on és activada per altres caspases. Un cop activa però s'aprecia una tendència a acumular-se al nucli de les cèl·lules afectades (Namura et al., 1998; Faleiro et al.,2000). Aquest fet concorda amb els substrats de la caspasa 3, entre els quals hi ha enzims nuclears associats a la reparació del DNA com la poli(ADP-ribosa) polimerasa (PARP) (Eliasson MGL. et al.,1997) o proteïnes com l'inhibidor de la DNAasa activada per caspases (ICAD) que, un cop degradat, provoca una activació de la CAD o DNAasa activada per caspases, responsable de fragmentar el DNA (Cao G. et al.,2001).

Un dels experiments crucials per a demostrar la simultaneïtat de la necrosi i l'apoptosi induïdes per l'OGD fou la combinació de dues tècniques fluorescentes com són el marcatge amb Iodur de propidi i la immunocitoquímica contra el fragment actiu de la caspasa 3 (vegeu figura 4.8). En els cultius exposats a l'OGD, la presència de cèl·lules marcades amb iodur de propidi i amb cromatina laxa, i de cèl·lules diferents no marcades amb PI però en canvi amb caspasa 3 activa demostraren que la necrosi i l'apoptosi eren induïdes en els cultius de manera simultània i en paral·lel.

Es va estudiar el curs temporal d'activació de la caspasa 3 per mitjà de western blot, per tenir una mesura més quantitativa en comparació a la immunocitoquímica (vegeu figura 4.9). Els western blots van evidenciar que l'activació de la caspasa 3 començava a aparèixer tres hores després de posar fi a l'OGD i que aquesta activació era progressiva al llarg del temps. Per detectar l'activació de la caspasa 3, es van fer servir dos anticossos diferents, l'anticòs que reconeixia la proforma i els fragments resultants del seu processament, i l'anticòs específic pel fragment actiu de 20 KDa. En els extractes isquèmics analitzats per western blot, va aparèixer una banda inesperada per sota de les dues isoformes de la caspasa 3. Aquesta banda corresponia a un pes molecular de 29KDa i apareixia una hora després de posar fi a l'OGD. Havia estat descrit en plaquetes la possibilitat que la calpaïna processés la caspasa 3 i com a resultat, en produís un fragment de 29KDa (Wolf BB. et al.,1999). La calpaïna és una proteasa que s'activa per increments en la concentració intracel·lular de Calci. Tal com s'ha descrit en seccions anteriors, una OGD produeix una sobrecàrrega intracel·lular de Calci, via receptor NMDA o canals de calci dependents de voltatge, que indueix l'activació de nombroses vies de senyalització. En efecte, la presència d'un inhibidor de la calpaïna durant l'OGD va bloquejar gran part de l'aparició del fragment 29KDa (p29).

Aquest fet va permetre atribuir l'aparició del fragment de 29KDa a l'acció de la calpaïna sobre la caspasa 3. La calpaïna és una proteasa que en condicions normals és necessària per la viabilitat cel.lular i la remodelació dendrítica després d'una lesió (Faddis BT.,1997). Cal tenir present que la interacció de la calpaïna en el procés d'activació de la caspasa 3 és un tema molt interessant i encara no massa clar. Els autors no es posen d'acord sobre la funcionalitat del fragment p29 o bé de l'ordre cronològic d'activació de la calpaïna vers la caspasa 3. Així, Wolf et al. (1999) demostren que en plaquetes la calpaïna és capaç de processar les procaspases 3 i 9 però no les inactiva. També afirmen que en plaquetes, els fragments resultants poden ser processats per la caspasa 8 i resultar-ne caspases actives. Porn-Ares et al. (1998) afirmaren que la caspasa 3 pot proteolitzar l'inhibidor de la calpaïna, calpastatina, i amplificar així l'activació de la calpaïna iniciada per petites variacions de calci intracel.lular. També s'ha observat un nivell baix d'expressió de calpastatina en les poblacions neuronals més vulnerables en una isquèmia cerebral (Lipton P.,1999) El treball però que clarifica més la importància de l'aparició d'aquest fragment de 29 KDa és el treball de Blomgren K. et al. (2001) Aquest treball descriu en un model experimental d'isquèmia cerebral, que el processament inicial de la caspasa 3 per part de la calpaïna, dona com a resultat el fragment de 29KDa i que aquest tall previ facilita el processament subseqüent per obtenir les formes actives. Per tant, per primera vegada, s'associa l'activació de la calpaïna com a resultat d'una isquèmia amb la posterior activació de la caspasa 3. Així doncs, les possibles interaccions entre la calpaïna i les caspases, amb la calpastatina com a nexa d'unió entre les dues proteases obren un camp d'estudi molt interessant per establir dianes d'acció terapèutica (Yamashima T., 2000)

Benchoua A. et al. (2001) fan referència a l'activació diferencial de les caspases segons la zona de la lesió. Així, descriuen que en el nucli isquèmic hi ha uns primers signes d'apoptosi que impliquen l'activació de les caspases 8 i 1. Teòricament aquestes dues activarien la caspasa 3 però això no s'arribaria a executar perquè la davallada d'ATP decantaria la balança cap a la necrosi. D'altra banda, a la zona de penombra la concentració d'ATP no disminuiria de manera tan dramàtica i el programa de mort es podria executar fins el final, implicant com a proteases efectores les caspases 1, 8 i 9. En el nostre model no tenim una separació física entre nucli isquèmic i penombra. Partim de la base que l'exposició a l'OGD es dona de manera uniforme en els pous de les plaques de cultiu. Per tant, la durada de la deprivació de glucosa i oxigen condiciona l'obtenció d'una necrosi predominant pròpia del nucli isquèmic o una situació mixta de necrosi i apoptosi, característica de la penombra. Aquesta propietat fa que el model sigui una eina molt versàtil i adaptable a l'estudi dels mecanismes de mort que esdevenen tant en el core com en la penombra.

Pel que fa a la localització cel·lular de la caspasa 3 activa, majoritàriament es va visualitzar en neurones i microglia sis hores després de posar fi a l'OGD. Els resultats concordaven en treballs anteriors en models *in vivo* com el de Namura S. et al. (1998), que descrivia l'activació de la caspasa 3 en neurones del córtex de rates sotmeses a una oclusió de la caròtida mitja.

Pel que fa la localització neuronal de la caspasa 3 activa val a dir que es va haver de comprovar amb dos marcadors específics de neurones diferents. Primer de tot es va realitzar un doble marcatge fluorescent per la MAP2 i per la caspasa 3 però els resultats inicials foren desconcertants: hi havia cèl·lules positives per la forma activa de la caspasa 3 que, observades sota contrast de fase, tenien un aspecte totalment neuronal. Malgrat això, aquestes cèl·lules no eren positives pel marcador neuronal MAP2.

Aquesta aparent contradicció era atribuïble al paper de la calpaïna en el model d'OGD ja que la desaparició del marcatge per la MAP2 també era una conseqüència directa de l'acció d'aquesta proteasa (Minger SL. et al.,1998) En utilitzar com a marcador neuronal el NeuN (Chemicon), molt més resistent a l'acció de la calpaïna, Les micrografies corroboraren que l'activació de caspasa 3 esdevenia en neurones.

D'altra banda, els antecedents del paper de la microglia en la isquèmia cerebral eren divergents. Alguns autors com Bhat RV. et al. (1996), defensaven l'activació de la microglia per desencadenar la resposta inflamatòria amb la síntesi de IL β 1 i TNF α . Altres autors com Petite CK. et al. (1998), Kato H.,et al.(1996) o Yenari MA., et al. (2001) et al., demostraren que la microglia també podia ser vulnerable davant d'una situació isquèmica. Velier JJ.,et al. (1999), suggeria que la microglia pot expressar diverses caspases abans de la seva mort després d'una isquemia. En el nostre model d'OGD es va visualitzar activació de caspasa 3 en cèl·lules microgials.

Per últim, els cultius sotmesos a OGD no es va observar una col.localització de la caspasa 3 activa amb la GFAP. Aquest fet està en concordància amb els resultats de Goldberg MP., et al. (1993) els quals descriuen que, per generar una mort glial, eren necessaris períodes d'OGD molt més llargs, d'un mínim de quatre hores. Aquests resultats estarien d'acord amb els resultats descrits per Reichert SA. et al., 2001, on tampoc observen activació astrocitària de caspasa 3.

Un cop confirmat que la caspasa 3 s'activava en neurones i microglia després d'una OGD, es van estudiar altres caspases potencialment implicades en la maquinària apoptòtica. Mitjançant una immunocitoquímica amb doble marcatge de les es va observar que la caspasa 9 també s'activava en neurones i microglia. La caspasa 9 és una proteasa efectora que s'autoactiva en formar part de l'apoptosoma. La caspasa 9 pot processar la caspasa 3 directament. Per tant els resultats suggerien que després

d'una OGD s'activava la caspasa 9 i que aquesta activaria part de la caspasa 3. D'altra banda, no es va observar marcatge positiu per la caspasa 9 en astròcits.

La caspasa 7 comparteix una gran homologia tan estructural com funcional amb la caspasa 3. De fet, com a caspasa executora, té els mateixos substrats que la caspasa 3. Fins fa pocs anys la caspasa 7 es considerava que no s'expressava en cervell (Juan TS. et al., 1997). Contràriament, Harrison DC., et al. (2001) varen demostrar la presència de mRNA de la caspasa 7 en cervell i que a més, la seva expressió es veia augmentada en una isquèmia focal en rates. En models d'OGD sobre cultius cerebrocorticals de rata no hi havia dades prèvies sobre l'activació de la caspasa 7.

Malgrat aquests antecedents, en el nostre model es va poder observar que sis hores després de l'exposició a l'OGD, els cultius presentaven una activació neuronal i microglial de caspasa 7. D'altra banda, no hi havia una activació astrocitària d'aquesta proteasa. Els nostres resultats es van veure recolzats pel treball de Okamoto S., et al. (2002) on demostraven que en cultius cerebrocorticals de rata, el NMDA activava tant la caspasa 3 com la caspasa 7.

Per tant, els nostres resultats suggereixen que l'OGD activa tant la caspasa 3, la caspasa 9 com la caspasa 7, en neurones i en microglia principalment.

Implicació del $TNF\alpha$ en la mort induïda per OGD

La isquèmia cerebral indueix l'expressió de molts factors de creixement com ara el BDNF (Lindvall O. et al., 1992), o de citoquines com el $TNF\alpha$ (Feuerstein GZ. et al., 1994). Aquests factors poden influir notablement la sensibilitat neuronal davant la isquèmia i altres agressions relacionades.

Els sistemes de transducció de senyals activats per les citoquines solen ser complexos i sovint impliquen bucles que inclouen els astròcits, la microglia, els oligodendròcits o les mateixes neurones (Mattson MP. et al.,1997). En condicions normals, la concentració de $TNF\alpha$ a cervell és molt baixa i per hibridació *in situ*, s'ha observat que el mRNA del $TNF\alpha$ es localitza exclusivament als astròcits. D'altra banda, després d'una isquèmia, la immunoreactivitat per $TNF\alpha$ augmenta de manera ràpida i és intensa en neurones corticals del nucli isquèmic i de la penombra (Liu T. et al., 1994). Però el paper que exerceix el $TNF\alpha$ en condicions isquèmiques es podria definir com una espasa de doble tall. Malgrat les evidències que confirmen el paper neuroprotector del $TNF\alpha$ *in vitro* (Cheng B. et al., 1994; Wilde GJ. et al., 2000), tot apunta que el $TNF\alpha$ alliberat durant una isquèmia pot ser tòxic (Barone FC. et al., 1997). Aquests fets permeten pensar en el $TNF\alpha$ com un dels factors implicats en la mort cel.lular induïda per OGD. Per confirmar la toxicitat del $TNF\alpha$ en l'exposició a l'OGD es va comprovar inicialment la sensibilitat dels cultius a aquesta citoquina. Així es va demostrar que el tractament dels cultius neurals amb $TNF\alpha$ reduïa un 25 % la viabilitat cel.lular (vegeu figura 4.16). Sis hores després del tractament es produïa una activació de les caspases 3 i 9, i posteriorment apareixia una condensació de cromatina (vegeu figures 4.17, 4.18 i 4.19). D'altra banda, en el nostre model, l'exposició dels cultius neurals a l'OGD induïa un alliberament de $TNF\alpha$ (vegeu figura 4.20). En afegir anticossos contra el $TNF\alpha$ després d'una OGD, es va millorar la viabilitat cel.lular i es va reduir l'activació de la caspasa 3 (vegeu figures 4.22 i 4.23). Aquests resultats permeten pensar que l'apoptosi induïda per OGD depèn, en part, del $TNF\alpha$ alliberat. Aquesta hipòtesi coincideix amb els experiments realitzats en rates *in vivo* per Barone FC. et al. (1997), on la injecció intracerebroventricular d'anticossos monoclonals contra el $TNF\alpha$ reduïa el volum de la lesió isquèmica per oclusió de l'artèria cerebral mitja. En contraposició a això, en cultius sotmesos a estímuls excitotòxics, el $TNF\alpha$ sembla

exercir una funció neuroprotectora (Mattson MP. et al.,1997). Demostren que davant d'un augment de la concentració de glutamat, el tractament amb $TNF\alpha$ indueix l'expressió de calbindina i de MnSOD, enzims que proporcionen resistència a l'excitotoxicitat. Aquests resultats es veurien recolzats pels experiments realitzats en ratolins *Knock Out* pels receptors del $TNF\alpha$ on queda palès el seu paper tròfic (Bruce JA. et al.,1996)

D'altra banda també cal destacar que la microglia s'activa en una lesió tissular i produeix $TNF\alpha$, factors de creixement, òxid nítric o ió superòxid (Bruce AJ. et al.,1996). Aquestes interaccions entre espècies cel.lulars diferents explicarien els possibles efectes neurotòxics del $TNF\alpha$. Per tant, es pot postular que en períodes inicials de la lesió isquèmica, l'activació de la via de senyalització del $TNF\alpha$ seria neuroprotectora però, a llarg plaç, pot ser nociva perquè el $TNF\alpha$ és un potent activador de la microglia que al seu torn, pot produir molècules tòxiques per les neurones (Mattson MP. et al., 1998)

Les vies de senyalització activades pel $TNF\alpha$ a través dels seus dos receptors, TNFR1 i TNFR2, són força complexes. El TNFR1 és el receptor que inicia la majoria de les cascades de senyalització, principalment de caire apoptòtic. En canvi, el TNFR2 desenvoluparia una funció més tròfica. De fet, Yang L., et al. (2002) en el seu treball amb ratolins *knock out* pels TNFR1 i TNFR2, proposa que, en cervells afectats per alguna neurodegeneració, la vulnerabilitat neuronal depèn de la proporció relativa d'expressió d'ambdós receptors. Per tant la supervivència o la mort neuronal dependria del subtipus particular de receptor que s'expressi de manera predominant en les neurones del cervell, tant durant el desenvolupament com en malalties neurològiques. Aquests resultats es poden relacionar amb el treball de Botchkina GI., et al. (1997) que demostraven l'augment en l'expressió del TNFR1 en el cervell de rata sis hores després d'una isquèmia focal. Posteriorment a les sis hores, es produïa una

upregulació del TNFR2. Per tant aquests antecedents recolzen la toxicitat del TNF α en una isquèmia cerebral.

La senyal que suposa la unió del TNF α als seus receptors és traduïda en la formació de complexos que contenen proteïnes adaptadores. A la vegada aquestes proteïnes adaptadores recluten enzims claus de la via com la caspasa 8 o IKK β per tal d'activar-los i desencadenar conseqüències pro o anti apoptòtiques (Chen G. et al.,2002). En el model d'OGD, en bloquejar l'efecte del TNF α amb un anticòs soluble després d'una OGD, es va observar una reducció de l'activació de la caspasa 3 i una reducció de la mort apoptòtica. Per tant tot sembla indicar que el TNF α que s'allibera degut a l'OGD és tòxic per les neurones i indueix part de l'apoptosi isquèmica.

Les vies de senyalització que indueix el TNF α poden activar la caspasa 8, el NF κ B i l'acumulació de ceramida (Wang CX. et al.,2002; Hallenbeck JM. et al.,2002). Tot i l'activació d'aquests factors proapoptòtics, també es produeix l'activació de proteïnes antiapoptòtiques. De fet es produeix un *crossstalk* de tots aquests factors i el destí de la cèl.lula depèn de la suma total de totes aquestes senyals.

Malgrat que no s'ha estudiat una possible activació directa de la caspasa 8, els resultats obtinguts amb el model suggereixen que el TNF α podria mediar l'activació de la caspasa 3 i de la caspasa 9. Yin XM., et al (2002) destaquen la importància de la caspasa 8 en el processament de BID (*BH3-only pro-death Bcl-2 family protein*). Tot i que la via apoptòtica mitocondrial en la isquèmia pot ser activada per múltiples factors, BID seria crucial per a la seva activació (Plesnila N. et al. ,2001). La caspasa 8 pot processar directament la caspasa 3 o bé pot processar BID (Li H. et al., 1998). La forma truncada de BID pot translocar a la mitocòndria forçant la sortida del citocrom C. El citocrom C desencadenaria l'activació de l'apoptosoma del qual forma part la procaspasa 9 i, un cop activa, proteolitzaria la procaspasa 3, activant-la (Yin XM. et al., 2002). Com a conclusió s'ha demostrat que el TNF α desenvolupa un paper molt

important en la mort neural apoptòtica induïda per l'exposició a l'OGD ja que el $\text{TNF}\alpha$ desencadenaria l'activació de la caspasa 9 i la caspasa 3, tot i que no es podria descartar també l'activació de la caspasa 8.

El NF κ B

La unió del $\text{TNF}\alpha$ al seu receptor desencadena una sèrie d'esdeveniments intracel·lulars que resulten en última instància a l'activació de dos factors de transcripció: c-Jun i NF κ B. Aquests factors de transcripció són els responsables de la inducció de l'expressió de gens que poden afectar a la viabilitat cel·lular positiva o negativament. (Chen G.,2002) El model fou utilitzat per estudiar el paper del NF κ B en la isquèmia in vitro. Els cultius neurals exposats a l'OGD van mostrar de manera preliminar, una translocació de la subunitat p65 del NF κ B al nucli, a l'igual que els cultius tractats amb $\text{TNF}\alpha$. Aquests resultats coincidien amb treballs anteriors que citaven l'activació del factor de transcripció en les neurones de rata sotmeses tant a isquèmia focal (Gabriel C. et al., 1999) com global (Clemens JA. et al., 1997). Tot i així, hi ha autors que defensen la teoria de la inactivació del NF κ B durant una isquèmia cerebral (Botchkina GI. et al.,1999; Liu J. et al., 2000). Part de les cèl·lules que presentaven translocació de p65 també mostraven una activació de caspasa 3. A més, en presència de l'anticòs soluble contra el $\text{TNF}\alpha$, la translocació de la p65 es va veure reduïda. Els resultats suggerien doncs que l'alliberament de $\text{TNF}\alpha$ en una OGD desencadenava la translocació del NF κ B p65 al nucli. Alguns autors ja havien citat que l'efecte tòxic del $\text{TNF}\alpha$ podia no ser directe vers les neurones sinó que podia venir mediat per altres espècies cel·lulars com la microglia o els astròcits (Barone FC. et al.,1997). Tenint en compte aquestes possibles relacions intercel·lulars i sense diferenciar quin tipus cel·lular presentava o no la translocació, es va estudiar si l'efecte global del NF κ B es traduïa en supervivència o mort cel·lular. Es van realitzar

experiments d'OGD en presència de SN50, un pèptid inhibidor de la subunitat p50 del NFkB (Mcinnis J. et al.,2002), que impedeix la formació del dímer p50/p65 i la seva subsegüent entrada al nucli cel.lular. En exposar els cultius a una OGD en presència del SN50, s'observà una millora de la viabilitat cel.lular, la qual anava acompanyada d'una reducció en el nombre de nuclis apoptòtics. S'observà una reducció tant a nivell d'activació de caspasa 3 com a nivell de condensació o fragmentació de cromatina. Tanmateix, el SN50 no protegia els cultius de la necrosi induïda per OGD. El nombre de cèl·lules PI positives amb la cromatina laxa no va variar i la degradació de la MAP2 tampoc es va veure bloquejada. Mattson MP. et al., (2001) intenta desentrellar aquesta dicotomia suggerint que l'activació del NFkB és neuroprotectora o neurotòxica segons l'espècia cel.lular on esdevingui. Així, la transactivació en neurones induiria l'expressió de gens que promourien la supervivència, com l'expressió de NAIP (proteïna neuronal inhibidora de l'apoptosi) que inhibiria l'activació de les caspases. En canvi, en la transactivació en microglia, el NFkB promouria l'expressió de TNF α o IL β 1, que, un cop alliberades, poden ser tòxiques per les neurones. Aquesta teoria explicaria perquè el SN50 bloquejaria part del dany cel.lular induït per la OGD. Els resultats obtinguts amb el model suggereixen doncs que el TNF α , mitjançant l'activació del NFkB, mediarà part de la mort apoptòtica induïda per OGD.

Els mecanismes pels quals aquest factor de transcripció s'activa en una isquèmia cerebral són poc clars. Es va demostrar que la ceramida podria activar una translocació del factor nuclear kappa B (NFkB). La ceramida activaria directament la IKKb o quinasa responsable de la fosforilació de la subunitat Ikb del NFkB i en forçaria la seva dissociació i conseqüent translocació al nucli del dímer p50/p65. També hi havia indicis que la unió del TNF α amb els seus receptors desencadenava una acumulació de ceramida activant la esfingomielinasa àcida.

Però l'interrogant que es plantejava amb els resultats obtinguts fou si a) s'acumulava ceramida als cultius exposats a l'OGD, i b) si tota aquesta ceramida provenia exclusivament de la degradació de l'esfingomielina per part de l'esfingomielinasa àcida o també hi intervenia la síntesi *de novo*.

La ceramida

En la bibliografia està descrit que la isquèmia cerebral indueix una acumulació de ceramida i aquesta acumulació s'ha pogut correlacionar amb l'aparició de l'apoptosi. S'ha descrit en alguns treballs que la isquèmia cerebral focal incrementa l'activitat d'una fosfolipasa anomenada Esfingomielinasa àcida (ASMase), amb activitat específica sobre l'esfingomielina. Gràcies a l'acció de l'esfingomielinasa, l'esfingomielina és degradada a ceramida, que a l'hora pot realitzar la funció de missatger secundari (Kubota M. et al., 1996, Mattson MP. et al., 2000; ,Yoshimura S. et al., 1998). En els darrers anys s'ha descrit que la producció de ceramida a partir del catabolisme de l'esfingomielina desenvolupa un paper clau en la mort cel.lular isquèmica (Mattson MP 2000). D'altra banda la ceramida també es pot sintetitzar *de novo* a partir de l'acció de la ceramida sintasa. En aquest treball es va estudiar la possible contribució de la ceramida sintetitzada *de novo* a la mort neuronal apoptòtica induïda per una OGD. En els nostres estudis, existeixen una sèrie de factors que poden modular l'abast del dany cel.lular, com per exemple el $TNF\alpha$. La via de senyalització del $TNF\alpha$ té com a missatger secundari la ceramida. De fet, havia estat descrit que el receptor TNFR1 estava associat a l'activació de l'esfingomielinasa àcida en neurones, la qual degradava esfingomielina i alliberava ceramida (Kolesnick R., 1994; Schwandner R.,1998). L'exposició dels cultius a l'OGD va produir una acumulació significativa de ceramida total. Aquests resultats concordaven amb els treballs que descrivien l'activació de l'esfingomielinasa àcida mediada pel receptor TNFR1 en una isquèmia cerebral (Mattson MP., 1997).

D'altra banda en els mateixos experiments es va bloquejar la síntesi de novo de la ceramida amb Fumonisina B1, una micotoxina produïda pel *Fusarium Moniliforme*, que inhibeix la síntesi d'esfingolípidis bloquejant la ceramida sintasa (esfingosina *n*-acetiltransferasa) (Merrill AH, 1993). Els resultats obtinguts de la determinació de la ceramida total van fer pensar que la síntesi de novo també contribuïa a l'acumulació de ceramida després d'una OGD. Val a dir que la Fumonisina també disminueix els nivells d'esfingomielina i de ceramida si els temps d'incubació són superiors a les 96 hores (Yoshimura S.,1998) En el nostre paradigma, la preincubació amb fumonisina fou només durant una hora per tal d'evitar aquesta depleció lipídica. Així la fumonisina protegia els cultius exposats a l'OGD en un 40%. Aquesta millora de la viabilitat venia acompanyada d'una reducció del nombre de nuclis apoptòtics i una disminució del nivell d'activació de la caspasa 3. En canvi, el component necròtic de la mort cel.lular induïda per OGD no es veia afectat per l'efecte de la fumonisina. Així doncs, aquests resultats suggerien que la síntesi de novo de ceramida intervenia en l'activació dels mecanismes apoptòtics desencadenats per una OGD, a més de la ceramida acumulada per l'acció de l'esfingomielinasa sobre l'esfingomielina. Aquests indicis foren confirmats amb els experiments de marcatge metabòlic amb [¹⁴C]-serina i [³H]-palmitat, dos dels precursors de la síntesi de novo de la ceramida. Una altra vegada, la preincubació amb fumonisina bloquejava la síntesi *de novo* de ceramida en els cultius exposats a l'OGD. Aquell bloqueig en la síntesi de ceramida es mantenia durant les dues hores següents a l'ODG. A nivell temporal podem considerar que la síntesi *de novo* de ceramida es dona d'una manera molt ràpida en resposta a l'exposició a l'OGD. Els nostres resultats són compatibles amb els treballs que descriuen l'activació de l'esfingomielinasa perquè els experiments de marcatge metabòlic van demostrar que la degradació d'esfingomielina era insensible a l'acció de la fumonisina després d'una OGD.

La correlació d'aquests resultats amb la disminució del component apoptòtic suggereixen que la ceramida sintetitzada *de novo* actuaria de manera *upstream* a l'activació de la caspasa 3. Aquestes conseqüències també es presentaven en experiment d'OGD en presència d'anticòs anti-TNF α . De fet, ja s'havia demostrat que el TNF α activava la producció de ceramida activant l'esfingomielinasa via TNFR1 (Kolesnick R., 1994). D'altra banda, Hannun et al (2002) suggereixen que, en línies cel·lulars com la MCF7 sensible a TNF α o la L929, l'addició de TNF α també podria induir l'activació de la síntesi *de novo* de ceramida, tot i no se'n saben els mecanismes. Un dels experiments que ens podrien respondre aquest interrogant seria mesurar la quantitat de ceramida, tant total com sintetitzada *de novo*, en cultius exposats a l'OGD i tractats amb anticòs anti-TNF α .

L'acumulació de ceramida es pot correlacionar amb l'activació de la caspasa 3 (Yoshimura S.,1998) i amb l'activació del NF κ B (Gill JS.,2000) en diferents paradigmes de mort cel·lular. També se la pot relacionar amb l'activació de les CAPK, quinases activades per ceramida, que serien les responsables de fosforilar I κ B α i permetre la translocació del dímer p50/p65 del NF κ B cap al nucli (Pettus B.,2002). Un cop exposats a l'OGD els nostres cultius doncs presenten una activació i translocació del NF κ B. Per tant els resultats recollits fins ara podrien explicar aquesta activació gràcies a l'acumulació de ceramida induïda per l'alliberament de TNF α que es dona després d'una OGD

La histamina com a moduladora del dany cel·lular isquèmic

El paper de la histamina en la modulació del dany neuronal isquèmic fou investigat mitjançant el model d'OGD sobre els cultius corticals. Les funcions de la histamina en processos neurodegeneratius és un ample camp d'estudi que encara no ha estat del tot explorat. Els antecedents que portaren a estudiar la possible connexió del sistema

histaminèrgic amb la isquèmia cerebral foren els resultats previs que s'havien trobat al grup de treball. La histamina pot unir-se al receptor NMDA i en pot modular el temps d'obertura alentint el procés de desensibilització (Vorobjev VS.,1993; Zwart R.,1996) i, per tant l'entrada de Ca^{2+} . Adicionalment el grup havia descrit que la histamina, via els receptors H2 podia modular l'alliberament de glutamat en sinaptosomes de rata (Rodriguez FJ.,1997). En una situació d'isquèmia cerebral, on el paper excitotòxic del glutamat és principal, es va estudiar si la histamina modulava positiva o negativament en els mecanismes de mort cel.lular. Els resultats obtinguts apunten que els antagonistes H2 protegeixen les neurones corticals de l'exposició a l'OGD. Les dades recolzen la idea del paper crucial que pot arribar a tenir la histamina en la modulació de la mort neuronal isquèmica, a més del paper desenvolupat pels receptors NMDA i no NMDA.

Tal com van demostrar els resultats de l'assaig del MTT, els cultius preincubats amb antagonistes dels receptors H2 de la histamina presentaven una disminució del dany neuronal en un 50%, tal com van demostrar els resultats de l'assaig del MTT. L'antagonista que va donar millors resultats en el bloqueig de la mort cel.lular fou la ranitidina i fou triat per estudiar els mecanismes de neuroprotecció associats al receptor H2. Quan els cultius exposats a l'OGD prèviament pretractats amb ranitidina foren estudiats amb detall, la doble tinció de PI i Hoechst 33258 va demostrar que la ranitidina reduïa tant la necrosi com l'apoptosi. La reducció de la condensació de cromatina per part de la ranitidina es podia correlacionar perfectament amb la reducció de l'activació de la caspasa 3. D'altra banda, cultius preincubats amb histamina o altres agonistes específics dels receptors H2, presentaven un empitjorament del dany cel.lular generat per l'OGD.

Per aquestes raons es pot afirmar que els antagonistes dels receptors H₂ de la Histamina protegeixen de la mort cel·lular induïda per OGD, reduint l'apoptosi isquèmica, tot i que no es poden oblidar els efectes observats amb la mepiramina i la tioperamida .

Durant una isquèmia cerebral *in vivo*, a part de l'alliberament de glutamat i de citokines proinflamàtores, hi ha un alliberament d'histamina des de l'interior de les cèl·lules que l'emmagatzemen, com les cèl·lules endotel·lials, els mastòcits o les mateixes neurones histaminèrgiques dels nuclis tuberomamilaris (Adachi N. 1993, Shibata 1993 Tósaki 1994). Aquestes espècies cel·lulars no sobreviuen en les nostres condicions de cultiu. Malgrat això, s'ha descrit que les cèl·lules gials en cultiu poden expressar l'enzim que catalitza la síntesi d'histamina, anomenat Histidina Descarboxilasa (Kato Y.2001). Aquest enzim converteix la L-histidina en histamina i la seva presència fou confirmada en els nostres extractes cel·lular per western blot (dades no mostrades). Aquests resultats, juntament amb les dades de viabilitat dels agonistes i dels antagonistes H₂, suggereixen l'existència de fonts cel·lulars possiblement gials en el cultiu que poden alliberar histamina en resposta a una OGD. Contràriament a aquests resultats obtinguts, hi ha treballs anteriors que apunten la toxicitat del bloqueig dels receptors H₂ en una isquèmia cerebral, tant en hipocamp com en estriat (Fujitani 1993; Adachi N. 2001, 2002). Malgrat això aquests resultats foren obtinguts en un model basat en l'oclusió de quatre vasos en gerbs. EL nostre model està basat en cultius neurals de cortex de rata, els quals no posseeixen ni barrera hematoencefàlica ni microvasos, i la relació entre les diferents poblacions cel·lulars són molt diferents perquè no es mantenen les estructures histològiques. Per tot això les diferències dels treballs amb els nostres resultats podrien ser explicades en base als models utilitzats.

Tradicionalment, la mort cel·lular isquèmica fou descrita com una mort necròtica.

En les últimes dècades han anat sorgint evidències de l'existència d'una mort més retardada de caire apoptòtic. La importància d'aquest segon component de mort ha portat a redissenyar les teràpies neuroprotectores i a tenir en compte el possible bloqueig de les caspases com a executores del programa de mort (Dirnagl U. 1999). En el nostre treball, el pretractament amb ranitidina abans d'una OGD, bloquejava l'activació de la caspasa 3 i reduïa el nombre de nuclis apoptòtics. També la degradació de la MAP2 es veia reduïda i es conservava millor la integritat de la xarxa neurítica. Els mecanismes pels quals la ranitidina exerceix el seu paper neuroprotector es desconeixen. D'altra banda seria interessant estudiar si el fet de bloquejar els receptors H2 dels cultius neurals en una OGD afecta al grau d'expressió de citoquines proinflamàtores com el $TNF\alpha$. De fet Okajima K. Et al (2002) demostren que la ranitidina redueix el dany hepàtic induït per isquèmia/reperfusió en rates mitjançant la reducció de l'activació dels neutròfils directa o indirectament inhibint la producció de $TNF\alpha$. La rellevància d'aquest treball vindria donada per la funció que el $TNF\alpha$ exerceix en el nostre model.

En la majoria dels estudis publicats sobre neuroprotecció en isquèmia els fàrmacs són administrats abans del dany isquèmic. En aquest treball, contràriament, la ranitidina va mostrar tenir una finestra terapèutica d'almenys sis hores després de l'OGD. L'addició de ranitidina o de tiotidina després de l'OGD també prevenia l'activació de la caspasa 3 i de la condensació de cromatina. La Ranitidina presentava l'efecte neuroprotector màxim quan era afegida sis hores després de l'exposició a l'OGD. El seu efecte era superior a l'efecte aconseguit preincubant els cultius abans de la isquèmia *in vitro* i quan s'afegia la ranitidina al cap de tres hores d'haver finalitzat l'OGD.

D'altra banda, si s'afegia la ranitidina entre 9 i 12 hores després de l'OGD no s'aconseguia el mateix efecte neuroprotector. Tosaki et al (1993) atenuaven l'edema cerebral administrant intraperitonealment la ranitidina a les rates fins i tot una hora després de la isquèmia in vivo. En aquest cas però la ranitidina bloquejava a nivell de cèl·lules endotelials els mecanismes moleculars mediat per la histamina de transport d'aigua i electròlits des de la sang fins al cervell. Tosaki et al (1993) no va descriure però l'efecte del bloqueig dels receptors H2 en les neurones del cervell. En resum, els resultats d'aquest estudi demostren que els receptors H2 estan involucrats en la modulació de la mort neuronal isquèmica perquè el seu bloqueig es tradueix en neuroprotecció davant d'una OGD. Els antagonistes H2 bloquegen l'activació de la caspasa 3 i la conseqüent condensació de cromatina. A més demostren tenir una finestra terapèutica de sis hores després de la isquèmia in vitro. Així doncs, la ranitidina, un fàrmac conegut per la seva funció en la millora de les úlceres gàstriques, o bé altres antiH2 més potents poden ser un focus molt interessant d'estudi per determinar tractaments nou i més eficients per a la isquèmia cerebral.

6. BIBLIOGRAFIA

- Adachi N, Itoh Y, Oishi R, Saeki K. Direct evidence for increased continuous histamine release in the striatum of conscious freely moving rats produced by middle cerebral artery occlusion. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1992 May;12(3):477-83.
- Adachi N, Oishi R, Itano Y, Yamada T, Hirakawa M, Saeki K. Aggravation of ischemic neuronal damage in the rat hippocampus by impairment of histaminergic neurotransmission. *Brain Res.* 1993 Jan 29;602(1):165-8.
- Adachi N., Terao, K., Otsuka R. & Arai, T.. Histaminergic H2 blockade facilitates ischemic release of dopamine in gerbil striatum. *Brain research* 2002 926: 172-175
- Adachi N., Seyfried F.J., Arai T. Blockade of central histaminergic H2 receptors aggravates ischemic neuronal damage in gerbil hippocampus. 2001. *Crit Care Med* 29: 1189-1194
- Akassoglou K, Douni E, Bauer J, Lassmann H, Kollias G, Probert L. Exclusive tumor necrosis factor (TNF) signaling by the p75TNF receptor triggers inflammatory ischemia in the CNS of transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003 Jan 21;100(2):709-14.
- Ankacrona, M., Dypbukt, J.M., Bonfoco E., Zhivotovsky, B., Orrenius, S., Lipton, S.A., & Nicotera, P. Glutamate-induced neuronal death: a succession of necrosis or apoptosis depending on the mitochondrial function. *Neuron* 1995 15: 961-973
- Augé N., Adrien N., Nègre-Salvayre A., Thiers JS., Levade T. & Salvayre R. The sphingomyelin-ceramide signaling pathway is involved in oxidized low-density lipoprotein-induced cell proliferation. *J. Biol. Chem.* 1996 271:19251-19255
- Baker A.J., Zornow M.H., Sheller M. Changes in extracellular concentrations of glutamate aspartate glycine dopamine serotonin and dopamine metabolites after transient global ischemia in the rabbit brain. *J. Neurochem.* 1991 57: 1370-1379
- Baldwin AS Jr. The NF-kappa B and I kappa B proteins: new discoveries and insights. *Annu Rev Immunol.* 1996;14:649-83. Review.
- Barone F.C., Harbin B., White, R.F. & Feuerstein G.Z. Tumor necrosis factor-alpha: a mediator of focal ischemic brain injury. *Stroke* 1997; 28(6): 1233-1244
- Basu S. & Kolesnick R 1998. Stress signals for apoptosis: ceramide and c-jun kinase. *Oncogene* 17:3277-3285.
- Becker, K.J. Inflammation and acute stroke. *Curr. Opin. Neurobiol* 1998. 11:45-49
- Bekkers JM. Enhancement by histamine of NMDA-mediated synaptic transmission in the hippocampus. *Science* 1993 261(5117):104-6.
- Benchoua A, Guegan C, Couriaud C, Hosseini H, Sampaio N, Morin D, Onteniente B. Specific caspase pathways are activated in the two stages of cerebral infarction. *J. Neurosci.* 2001 Sep 15;21(18):7127-34.
- Benveniste, H., Drejer, J., Schousboe, A. & Diemer, N.H. Elevation of the extracellular concentrations of glutamate and aspartate in rat hippocampus during transient cerebral ischemia monitored by intracerebral microdialysis. *J. Neurochem.* 1984 43: 1369-1374
- Bhat RV, DiRocco R, Marcy VR, Flood DG, Zhu Y, Dobrzanski P, Siman R, Scott R, Contreras PC, Miller M. Increased expression of IL-1beta converting enzyme in hippocampus after ischemia: selective localization in microglia. *J Neurosci.* 1996 Jul 1;16(13):4146-54.
- Blazquez C, Galve-Roperh I, Guzman M. De novo-synthesized ceramide signals apoptosis in astrocytes via extracellular signal-regulated kinase. *FASEB J.* 2000 Nov;14(14):2315-22.
- Blomgren K, Zhu C, Wang X, Karlsson JO, Leverin AL, Bahr BA, Mallard C, Hagberg H. Synergistic activation of caspase-3 by m-calpain after neonatal hypoxia-ischemia: a mechanism of "pathological apoptosis"? *J Biol Chem.* 2001 Mar 30;276(13):10191-8.
- Botchkina GI, Geimonen E, Bilof ML, Villarreal O, Tracey KJ. Loss of NF-kappaB activity during cerebral ischemia and TNF cytotoxicity. *Mol Med.* 1999 Jun;5(6):372-81.
- Botchkina GI, Meistrell ME, Botchkina L. & Tracey KJ. Expression of TNF and TNF receptors (p55 and p 75) in the rat brain after focal cerebral ischemia. *Mol. Med.* 1997 3: 765-781

- Boullerne AI, Nedelkoska L, Benjamins JA. Synergism of nitric oxide and iron in killing the transformed murine oligodendrocyte cell line N20.1. *J Neurochem.* 1999 Mar;72(3):1050-60.
- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976 May 7;72:248-54.
- Brown A.w & Brierley J.B. Anoxic-ischemic cell change in rat brain:light microscopic and fine-structural observations. *J.Neurol.Sci.* 1972 16:59-84
- Brown R.E., Stevens, D.R., Haas H.L. The physiology of brain histamine. *Prog Neurobiol.* 2001 63: 637-672
- Bruce AJ, Boling W, Kindy MS, Peschon J, Kraemer PJ, Carpenter MK, Holtzman FW, Mattson MP. Altered neuronal and microglial responses to excitotoxic and ischemic brain injury in mice lacking TNF receptors. *Nat Med.* 1996 Jul;2(7):788-94.
- Cao G, Minami M, Pei W, Yan C, Chen D, O'Horo C, Graham SH, Chen J. Intracellular Bax translocation after transient cerebral ischemia: implications for a role of the mitochondrial apoptotic signaling pathway in ischemic neuronal death. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2001 Apr;21(4):321-33.
- Cao G, Pei W, Lan J, Stetler RA, Luo Y, Nagayama T, Graham SH, Yin XM, Simon RP, Chen J. Caspase-activated DNase/DNA fragmentation factor 40 mediates apoptotic DNA fragmentation in transient cerebral ischemia and in neuronal cultures. *J Neurosci.* 2001 Jul 1;21(13):4678-90.
- Castillo J, Noya M. [Mechanisms of progression of cerebral infarction] *Neurologia.* 1999 May;14 Suppl 2:2-12. Review.
- Cervos-Navarro, J. & Diemer, N.H. Selective vulnerability in brain hypoxia. *Crit.Rev.Neurobiol.* 1991 6:149-182.
- Clemens JA, Stephenson DT, Smalstig EB, Dixon EP, Little SP. Global ischemia activates nuclear factor-kappa B in forebrain neurons of rats. *Stroke.* 1997 May;28(5):1073-80; discussion 1080-1.
- Clemens JA. Cerebral ischemia: gene activation, neuronal injury, and the protective role of antioxidants. *Free Radic Biol Med.* 2000 May 15;28(10):1526-31. Review.
- Cohen, G.M. et al. Key morphological features of apoptosis may occur in the absence of internucleosomal DNA fragmentation. *J.Biochem.* 1992 286: 331
- Craighead M, Pole J, Waters C. Caspases mediate C2-ceramide-induced apoptosis of the human oligodendroglial cell line, MO3.13. *Neurosci Lett.* 2000 Jan 14;278(3):125-8.
- Cuvillier O, Edsall L, Spiegel S. Involvement of sphingosine in mitochondria-dependent Fas-induced apoptosis of type II Jurkat T cells. *J Biol Chem.* 2000 May 26;275(21):15691-700.
- Chalecka-Franaszek E, Chuang DM. Lithium activates the serine/threonine kinase Akt-1 and suppresses glutamate-induced inhibition of Akt-1 activity in neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999 Jul 20;96(15):8745-50.
- Chen G & Goeddel DV. TNF-R1 signaling: a beautiful pathway. *Science* 2002; 296:1634-1635
- Chen M, Won DJ, Krajewski S, Gottlieb RA. Calpain and mitochondria in ischemia/reperfusion injury. *J Biol Chem.* 2002 Aug 9;277(32):29181-6.
- Chen Y, Ginis I, Hallenbeck JM. The protective effect of ceramide in immature rat brain hypoxia-ischemia involves up-regulation of bcl-2 and reduction of TUNEL-positive cells. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2001 Jan;21(1):34-40.
- Chen, J., Jin, K., Chen, M., Pei, W., Kawaguchi, K., Greenberg, D.A. & Simon, R.P. Early detection of DNA strand breaks in the brain after transient focal ischemia: implications for the role of DNA damage in apoptosis and neuronal cell death. *J. Neurochem.* 1997 69: 232-245
- Chen, J. Induction of caspase-3-like protease may mediate neuronal delayed death in the hippocampus after transient cerebral ischemia. *J.Neurosci.* 1998 18: 4914-4928.
- Cheng B, Christakos S, Mattson MP. Tumor necrosis factors protect neurons against metabolic-excitotoxic insults and promote maintenance of calcium homeostasis. *Neuron.* 1994 Jan;12(1):139-53.
- Choi D.W.. Glutamate neurotoxicity and diseases of the nervous system. *Neuron.* 1998 1:623-634

- Choi D.W. & Rothman S.M. The role of glutamate neurotoxicity in hypoxic/ischemic neuronal death. *Annu.Rev.Neurosci.* 1990 13: 171-182.
- Choi DW. Excitotoxic cell death. *J Neurobiol.* 1992 Nov;23(9):1261-76. Review.
- Choi, D.W. Calcium: still center-stage in hypoxic-ischemic neuronal death. *TINS.* 1995 18: 58:60
- Choi, D.W. Ischemia-induced apoptosis. *Curr.Op.Neurobiol.* 1996 6:667-672
- Chua BT, Guo K, Li P. Direct cleavage by the calcium-activated protease calpain can lead to inactivation of caspases. *J Biol Chem.* 2000 Feb 18;275(7):5131-5.
- Darzynkiewicz, Z. Critical aspects in the analysis of apoptosis and necrosis. *Human Cell* 1998 11:3
- Dbalbo GS, El-Asaad W, Krikorian A, Liu B, Diab K, Idriss NZ, El-Sabban M, Driscoll TA, Perry DK, Hannun YA. Ceramide generation by two distinct pathways in tumor necrosis factor alpha-induced cell death. *FEBS Lett.* 2001 Aug 10;503(1):7-12.
- Dirnagl, U., Iadecola, C., & Moskowitz, A. Pathobiology of ischemic stroke: an integrated view. *TINS.* 1999 22: 391-397
- Domanska-Janik K, Bronisz-Kowalczyk A, Zajac H, Zablocka B. Interrelations between nuclear-factor kappa B activation, glial response and neuronal apoptosis in gerbil hippocampus after ischemia. *Acta Neurobiol Exp (Warsz).* 2001;61(1):45-51.
- Dugan, L. & Choi, D.W. Hypoxic-ischemic brain injury and Oxidative stress. *Basic neurochemistry.* 1999 34: 712-729
- Ebner S, Dunbar M, McKinnon RD. Distinct roles for PI3K in proliferation and survival of oligodendrocyte progenitor cells. *J Neurosci Res.* 2000 Nov 1;62(3):336-45.
- Eliasson, M.J.L., Sampei, K. & Dawson, V.L. Poly(ADP-ribose) polymerase gene disruption renders mice resistant to cerebral ischemia. *Nature Medicine.* 1997 Vol 3, 10: 1089-1095
- Enright H, Hebbel RP, Nath KA. Internucleosomal cleavage of DNA as the sole criterion for apoptosis may be artifactual. *J Lab Clin Med.* 1994 Jul;124(1):63-8.
- Faddis BT, Hasbani MJ, Goldberg MP. Calpain activation contributes to dendritic remodeling after brief excitotoxic injury in vitro. *J Neurosci.* 1997 Feb 1;17(3):951-9.
- Faleiro L, Lazebnik Y. Caspases disrupt the nuclear-cytoplasmic barrier. *J Cell Biol.* 2000 Nov 27;151(5):951-9.
- Farreras, P. & Rozman, C. *Medicina interna.* 1992 Vol II 12^a ed. 1994-1407
- Feuerstein GZ, Liu T, Barone FC. Cytokines, inflammation, and brain injury: role of tumor necrosis factor-alpha. *Cerebrovasc Brain Metab Rev.* 1994 Winter;6(4):341-60. Review.
- Flores AI, Mallon BS, Matsui T, Ogawa W, Rosenzweig A, Okamoto T, Macklin WB. Akt-mediated survival of oligodendrocytes induced by neuregulins. *J Neurosci.* 2000 Oct 15;20(20):7622-30.
- Fujitani T, Adachi N, Nagaro T, Miyazaki H, Nakamura Y, Kataoka K, Arai T. Histaminergic H2 action protects hippocampal CA1 neurons by prolonging the onset of the anoxic depolarization in gerbils. *J Neurochem.* 1996 Dec;67(6):2613-5.
- Fukuda S, Del Zoppo GJ. Models of focal cerebral ischemia in the nonhuman primate. *ILAR J.* 2003;44(2):96-104.
- Furuya K, Ginis I, Takeda H, Chen Y, Hallenbeck JM. Cell permeable exogenous ceramide reduces infarct size in spontaneously hypertensive rats supporting in vitro studies that have implicated ceramide in induction of tolerance to ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2001 Mar;21(3):226-32.
- Gabriel C, Justicia C, Camins A, Planas AM. Activation of nuclear factor-kappaB in the rat brain after transient focal ischemia. *Brain Res Mol Brain Res.* 1999 Feb 19;65(1):61-9.
- Gallo V. et al. The role of depolarization in the survival and differentiation of cerebellar granule cells in culture. *J. Neuroscience.* 1987 7: 2203-2213
- Gallo P. Selective release of glutamate from cerebellar granule cells differentiating in culture. *PNAS.* 1982 79:6919-7023.

- Garcia JH. The neuropathology of stroke. *Hum Pathol.* 1975 Sep;6(5):583-98. Review.
- Gary DS, Bruce-Keller AJ, Kindy MS, Mattson MP. Ischemic and excitotoxic brain injury is enhanced in mice lacking the p55 tumor necrosis factor receptor. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1998 Dec;18(12):1283-7.
- Gill JS, Windebank AJ. Ceramide initiates NFkappaB-mediated caspase activation in neuronal apoptosis. *Neurobiol Dis.* 2000 Aug;7(4):448-61.
- Goldberg M.P. & Choi, D.W. Combined oxygen and glucose deprivation in cortical cell culture: calcium dependent and calcium independent mechanisms of neuronal injury. *J. Neurosci.* 1993 13:3510-3524
- Gottron F.J., Ying, H.S. & Choi, D.W. Caspase inhibition selectively reduces the apoptotic component of oxygen-glucose deprivation-induced cortical neuronal cell death. *Mol. Cell. Neurosci.* 1997 9:159-169
- Graham, D.I. Vascular disorders of the CNS. *Greenfield's neuropathology.* 1984 157-207.
- Gschwind M. & Huber, G. Detection of apoptotic or necrotic death in neuronal cells by morphological, biochemical and molecular analysis. *Neuromethods* 1993 29:13-31
- Gu C, Casaccia-Bonnel P, Srinivasan A, Chao MV. Oligodendrocyte apoptosis mediated by caspase activation. *J Neurosci.* 1999 Apr 15;19(8):3043-9.
- Gwag, B.J., Lobner, D., Koh, K.Y., Wie, M.W. & Choi, D.W. Blockade of glutamate receptors unmasks neuronal apoptosis after OGD in vitro. *Neuroscience.* 1995 68: 615-619.
- Haas H, Panula P. The role of histamine and the tuberomammillary nucleus in the nervous system. *Nat Rev Neurosci.* 2003 Feb;4(2):121-30. Review.
- Haas HL. Histamine potentiates neuronal excitation by blocking a calcium-dependent potassium conductance. *Agents Actions.* 1984 Apr;14(3-4):534-7.
- Hallenbeck JM. The many faces of tumor necrosis factor in stroke. *Nat Med.* 2002 Dec;8(12):1363-8.
- Hara, H. & Moskowitz, M.A. Inhibition of interleukin 1beta converting enzyme family proteases reduces ischemic and excitotoxic neuronal damage. *PNAS* 1997 94:2007-2012
- Harrison DC, Davis RP, Bond BC, Campbell CA, James MF, Parsons AA, Philpott KL. Caspase mRNA expression in a rat model of focal cerebral ischemia. *Brain Res Mol Brain Res.* 2001 Apr 18;89(1-2):133-46.
- Hartfield PJ., Bilney AJ. & Murray AW. 1998. neurotrophic factors prevent ceramide-induced apoptosis downstream of c-jun N-terminal kinase activation in PC12 cells. *J. Neurochem.* 71:161-169
- Herr I, Martin-Villalba A, Kurz E, Roncaioli P, Schenkel J, Cifone MG, Debatin KM. FK506 prevents stroke-induced generation of ceramide and apoptosis signaling. *Brain Res.* 1999 May 1;826(2):210-9.
- Hill WD, Hess DC, Carroll JE, Wakade CG, Howard EF, Chen Q, Cheng C, Martin-Studdard A, Waller JL, Beswick RA. The NF-kappaB inhibitor diethylthiocarbamate (DDTC) increases brain cell death in a transient middle cerebral artery occlusion model of ischemia. *Brain Res Bull.* 2001 Jun;55(3):375-86.
- Hisahara S, Takano R, Shoji S, Okano H, Miura M. Role of caspase-1 subfamily in cytotoxic cytokine-induced oligodendrocyte cell death. *J Neural Transm Suppl.* 2000;(58):135-42.
- Hisahara S, Yuan J, Momoi T, Okano H, Miura M. Caspase-11 mediates oligodendrocyte cell death and pathogenesis of autoimmune-mediated demyelination. *J Exp Med.* 2001 Jan 1;193(1):111-22.
- Hofmann K. & Dixit VM.. Ceramide in apoptosis- Does it really matter? *TIBS* 1998 23:374-377
- Hossman, K.A. Viability thresholds and the penumbra of focal ischemia. *Ann. Neurol.* 1994 36:557-565.
- Hsu H, Xiong J, Goeddel DV. The TNF receptor 1-associated protein TRADD signals cell death and NF-kappa B activation. *Cell.* 1995 May 19;81(4):495-504.
- Huang R, Shuaib A, Hertz L. Glutamate uptake and glutamate content in primary cultures of mouse astrocytes during anoxia, substrate deprivation and simulated ischemia under normothermic and hypothermic conditions. *Brain Res.* 1993 Aug 6;618(2):346-51.

- Huszti Z., Prast H., Tran M.H., Fischer H., Philippu A. Glial cells participate in histamine inactivation in vivo *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1998 357:49-53
- Jacobson, M.D. Reactive oxygen species and programmed cell death. *TIBS* 1996. 21:83-86
- Jander S, Schroeter M, Stoll G. Role of NMDA receptor signaling in the regulation of inflammatory gene expression after focal brain ischemia. *J Neuroimmunol.* 2000 Sep 22;109(2):181-7.
- Johnson EM Jr. Possible role of neuronal apoptosis in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging.* 1994;15 Suppl 2:S187-9. Review.
- Juan TS, McNiece IK, Argento JM, Jenkins NA, Gilbert DJ, Copeland NG, Fletcher FA. Identification and mapping of Casp7, a cysteine protease resembling CPP32 beta, interleukin-1 beta converting enzyme, and CED-3. *Genomics.* 1997 Feb 15;40(1):86-93.
- Kang SJ, Wang S, Hara H, Peterson EP, Namura S, Amin-Hanjani S, Huang Z, Srinivasan A, Tomaselli KJ, Thornberry NA, Moskowitz MA, Yuan J. Dual role of caspase-11 in mediating activation of caspase-1 and caspase-3 under pathological conditions. *J Cell Biol.* 2000 May 1;149(3):613-22.
- Kato H, Kogure K, Liu XH, Araki T, Itoyama Y. Progressive expression of immunomolecules on activated microglia and invading leukocytes following focal cerebral ischemia in the rat. *Brain Res.* 1996 Sep 23;734(1-2):203-12.
- Katoh Y., Niimi M., Yamamoto Y., Kawamura T., Morimoto-Ishizuka T., Sawada M., Takemori H., Yamatodani A. Histamine production by cultured microglial cells of the mouse. *Neurosci Lett* 2001 305 (3): 181-184
- Katsura, K. & Siesjo, B.K. Coupling among energy failure, loss of ion homeostasis and phospholipase A2 and C activation during ischemia. *J. Neurochem.* 1993 61:1677-1684
- Katsura, K. & Siesjo, B.K. Energy metabolism, ion homeostasis, and cell damage in the brain. *Biochem. Soc. Trans.* 1994 22:991-996
- Keane RW, Srinivasan A, Foster LM, Testa MP, Ord T, Nonner D, Wang HG, Reed JC, Bredesen DE, Kayalar C. Activation of CPP32 during apoptosis of neurons and astrocytes. *J Neurosci Res* 1997 Apr 15;48(2):168-80
- Kerr, J.F.R., Wylie, A.R & Currie R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer.* 1972 24: 239
- Kim G, Xu J, Xu J, Song S, Yan P, Ku G, Xu X & Hsu C. Tumor necrosis factor receptor deletion reduces nuclear factor kappa B activation, cellular inhibitor of apoptosis protein 2 expression and functional recovery after traumatic spinal cord injury. *J Neurosci* 2001; 21(7):6617-6625
- Kirkova M, Alexandrova A., Iordanova N. Bismuth increases .OH-scavenging activity of Histamine H2-receptor antagonists. Abstract book of European Histamine Research Society. 2001 30th Annual Meeting Turku Finland. P-58
- Knobloch SM, Nikolaeva M, Huang X, Fan L, Krajewski S, Reed JC, Faden AI. Multiple caspases are activated after traumatic brain injury: evidence for involvement in functional outcome. *J Neurotrauma.* 2002 Oct;19(10):1155-70.
- Koh, J.Y. & Choi, D.W. Quantitative determination of glutamate mediated cortical neuronal injury in cell culture by lactate dehydrogenase efflux assay. *J. Neurosci. Methods* 1987 20: 83-90.
- Kolesnick R. & Golde DW. The sphingomyelin pathway in tumor necrosis factor and interleukin-1 signaling. *Cell.* 1994 77:325-328
- Kolesnick R. The therapeutic potential of modulating the ceramide/sphingomyelin pathway. *J. Clin. Invest.* 2002 110 (1): 3-8
- Kolesnik R., Golde DW. The sphingomyelin pathway in tumor necrosis factor and interleukin-1 signalling. *Cell* 1994 77:325-328
- Koller H, Trimborn M, von Giesen H, Schroeter M & Arendt G. TNFalpha reduces glutamate induced intracellular Ca²⁺ increase in cultured cortical astrocytes. *Brain Res* 2001; 893(1-2):237-43

- Krajewski S, Krajewska M, Ellerby LM, Welsh K, Xie Z, Deveraux QL, Salvesen GS, Bredesen DE, Rosenthal RE, Fiskum G, Reed JC. Release of caspase-9 from mitochondria during neuronal apoptosis and cerebral ischemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999 May 11;96(10):5752-7.
- Kubota M, Narita K, Nakagomi T, Tamura A, Shimasaki H, Ueta N, Yoshida S. Sphingomyelin changes in rat cerebral cortex during focal ischemia. *Neurol Res*. 1996 Aug;18(4):337-41.
- Lankiewicz S, Marc Luetjens C, Truc Bui N, Krohn AJ, Poppe M, Cole GM, Saido TC, Prehn JH. Activation of calpain I converts excitotoxic neuron death into a caspase-independent cell death. *J Biol Chem*. 2000 Jun 2;275(22):17064-71.
- Le DA, Wu Y, Huang Z, Matsushita K, Plesnila N, Augustinack JC, Hyman BT, Yuan J, Kuida K, Flavell RA, Moskowitz MA. Caspase activation and neuroprotection in caspase-3-deficient mice after in vivo cerebral ischemia and in vitro oxygen glucose deprivation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002 Nov 12;99(23):15188-93.
- Lee, J.M., Zipfel, G.J. & Choi, D.W.. The changing landscape of ischaemic brain injury mechanisms. *Nature* 1999 339 (supplement) : a7-a14
- Lee JM, Grabb MC, Zipfel GJ, Choi DW. Brain tissue responses to ischemia. *J Clin Invest*. 2000 Sep;106(6):723-31.
- Li H, Zhu H, Xu CJ, Yuan J. Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell*. 1998 Aug 21;94(4):491-501.
- Li P, Nijhawan D, Budihardjo I, Srinivasula SM, Ahmad M, Alnemri ES, Wang X. Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell*. 1997 Nov 14;91(4):479-89.
- Lievremont JP., Sciorati C., morandi E., Paolucci C, m Bunone G., Del la Valle G., Meldolesi J. & Clementi E. 1999. The p75(NTR)-induced apoptotic program develops through ceramide-caspase pathway negatively regulated by nitric oxide. *J Biol Chem*. 274:15466-15472
- Lindvall O, Ernfors P, Bengzon J, Kokaia Z, Smith ML, Siesjö BK, Persson H. Differential regulation of mRNAs for nerve growth factor, brain-derived neurotrophic factor, and neurotrophin 3 in the adult rat brain following cerebral ischemia and hypoglycemic coma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992 Jan 15;89(2):648-52.
- Linnik M.D. Evidence supporting a role for programmed cell death in focal cerebral ischemia in rats. *Stroke*. 1993;24:2002-2008.
- Lipton, P. Ischemic cell death in brain neurons. *Physiological reviews*. 1999 79:1432-1568
- Liu J, Ginis I, Spatz M, Hallenbeck JM. Hypoxic preconditioning protects cultured neurons against hypoxic stress via TNF-alpha and ceramide. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2000 Jan;278(1):C144-53.
- Liu T, Clark RK, McDonnell PC, Young PR, White RF, Barone FC, Feuerstein GZ. Tumor necrosis factor-alpha expression in ischemic neurons. *Stroke*. 1994 Jul;25(7):1481-8.
- Locksley RM, Killeen N & Lenardo MJ. The TNF and the TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell* 2001; 104: 487-501
- Loetscher H, Niederhauser O, Kemp J, Gill R. Is caspase-3 inhibition a valid therapeutic strategy in cerebral ischemia? *Drug Discov Today*. 2001 Jul 1;6(13):671-680.
- MacManus, J.P., Hill, I.E., Huang, Z.G., Rasquinha, I., Xue, D. & Buchan A.M.() DNA damage consistent with apoptosis in transient focal ischaemic neocortex. *Neuroreport* 1994 5:493-496
- Malagelada, C., Sabrià, J. & Rodríguez, J. Evidence of apoptosis in rat cortical cell cultures after oxygen and glucose deprivation. *Eur J Neurosci*. 2000 12:223. (FENS 2000, Brighton, abstract book)
- Martínez-Vila, E., Irimia-Sieira, P. & Gállego-Culleré, J.() Situación actual de la neuroprotección en el ictus. *Rev Neurol*. 1999 29: 526-536
- Martí-Vilalta J.L.. Enfermedades vasculares cerebrales. Ed MCR Barcelona 1993; 77-84
- Mathias S, Pena LA, Kolesnick RN. Signal transduction of stress via ceramide. *Biochem J*. 1998 Nov 1;335 (Pt 3):465-80. Review.
- Mattson MP, Barger SW, Furukawa K, Bruce AJ, Wyss-Coray T, Mark RJ, Mucke L. Cellular

- signaling roles of TGF beta, TNF alpha and beta APP in brain injury responses and Alzheimer's disease. *Brain Res Brain Res Rev.* 1997 Feb;23(1-2):47-61. Review.
- Mattson MP. Neuroprotective signal transduction: relevance to stroke. *Neuroscience and biobehavioral reviews.* 1997; 21(2): 193-206
- Mattson MP, Furukawa K & Bruce AJ. Fronteras en la enfermedad cerebrovascular: mecanismos, diagnóstico y tratamiento. Capítulo 15: 145-159. *Sèrie monogràfica de la American Heart Association 1998* traduida al castellà.
- Merrill AH., van Echten G., Wang E. & Sandhoff K. Fumoninsin B1 inhibits Sphingosine (sphinganine) N-acetyltransferase and de novo synthesis in cultured neurons in situ. *J.Biol.Chem.* 1993 268(36):27299-27306
- Merry, D.E. & Korsmeyer, S.J. BCL-2 gene family in the nervous system. *Annu.Rev.Neurosci.* 1997 20: 245-267
- Minger SL, Geddes JW, Holtz ML, Craddock SD, Whiteheart SW, Siman RG, Pettigrew LC. Glutamate receptor antagonists inhibit calpain-mediated cytoskeletal proteolysis in focal cerebral ischemia. *Brain Res.* 1998 Nov 9;810(1-2):181-99.
- Mochizuki H, Goto K, Mori H, Mizuno Y. Histochemical detection of apoptosis in Parkinson's disease. *J Neurol Sci.* 1996 May;137(2):120-3.
- Moore JD, Rothwell NJ, Gibson RM. Involvement of caspases and calpains in cerebrocortical neuronal cell death is stimulus-dependent. *Br J Pharmacol.* 2002 Feb;135(4):1069-77.
- Mosmann T.. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J.Immunol Methods* 1983 65 (1-2):55-63
- Mouw G, Zechel JL, Gamboa J, Lust WD, Selman WR, Ratcheson RA. Activation of caspase-12, an endoplasmic reticulum resident caspase, after permanent focal ischemia in rat. *Neuroreport.* 2003 Feb 10;14(2):183-6.
- Mouw G, Zechel JL, Zhou Y, Lust WD, Selman WR, Ratcheson RA. Caspase-9 inhibition after focal cerebral ischemia improves outcome following reversible focal ischemia. *Metab Brain Dis.* 2002 Sep;17(3):143-51.
- Muzio M, Chinnayan AM, Kishckel FC, O'rouke K, Shevchenko A, Ni J, Scaffidi C Bretz JD, Zhang M, & Gentz R. FLICE, a novel FADD homologous ICE/ced 3-like-protease, is recruited to de CD95(Fas/APO-1) death -including signaling complex. *Cell* 1996; 85:817-827
- Nakagawa T, Yuan J. Cross-talk between two cysteine protease families. Activation of caspase-12 by calpain in apoptosis. *J Cell Biol.* 2000 Aug 21;150(4):887-94.
- Nakagawa T, Zhu H, Morishima N, Li E, Xu J, Yankner BA, Yuan J. Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta. *Nature.* 2000 Jan 6;403(6765):98-103.
- Nakane M, Kubota M, Nakagomi T, Tamura A, Hisaki H, Shimasaki H, Ueta N. Lethal forebrain ischemia stimulates sphingomyelin hydrolysis and ceramide generation in the gerbil hippocampus. *Neurosci Lett.* 2000 Dec 22;296(2-3):89-92.
- Namura S, Zhu J, Fink K, Endres M, Srinivasan A, Tomaselli KJ, Yuan J, Moskowitz MA. Activation and cleavage of caspase-3 in apoptosis induced by experimental cerebral ischemia. *J Neurosci.* 1998 May 15;18(10):3659-68.
- Nath R, Probert A Jr, McGinnis KM, Wang KK. Evidence for activation of caspase-3-like protease in excitotoxin- and hypoxia/hypoglycemia-injured neurons. *J Neurochem.* 1998 Jul;71(1):186-95.
- Nellgard B, Wieloch T. Posts ischemic blockade of AMPA but not NMDA receptors mitigates neuronal damage in the rat brain following transient severe cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1992 Jan;12(1):2-11.
- Ness JK, Romanko MJ, Rothstein RP, Wood TL, Levison SW. Perinatal hypoxia-ischemia induces apoptotic and excitotoxic death of periventricular white matter oligodendrocyte progenitors. *Dev Neurosci.* 2001;23(3):203-8.
- Newcomb-Fernandez JK, Zhao X, Pike BR, Wang KK, Kampfl A, Beer R, DeFord SM, Hayes RL. Concurrent assessment of calpain and caspase-3 activation after oxygen-glucose deprivation in primary septo-hippocampal cultures. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2001 Nov;21(11):1281-94.

- Nicholson, D.W. & Thornberry, N.A. Caspases: killer proteases. *TIBS* 1997 22:299-314.
- Nicholls, D. & Attwell, D. The release and uptake of excitatory amino acids. *TIPS*. 1990 462-468.
- Niimi M., Yamamoto Y., Takemori H., Uno A., Kondo Y., Yamatodani A., Lipopolysaccharide and interleukin-1 β augmented histidine decarboxylase activity in cultured cells of the rat embryonic brain. *J. Neurochem.* 1997 69: 851-858
- Nishibori, M., Oishi, R., Itoh, Y., Saeki, K. Morphine-induced changes in Histamine dynamics in mouse brain. *J. Neurochem* 1985 45, 719-724
- Noshita N, Lewen A, Sugawara T, Chan PH. Evidence of phosphorylation of Akt and neuronal survival after transient focal cerebral ischemia in mice *J Cereb Blood Flow Metab.* 2001 Dec;21(12):1442-50.
- Obeid LM, Linardic CM, Karolak LA, Hannun YA. Programmed cell death induced by ceramide. *Science.* 1993 Mar 19; 259(5102):1769-71.
- Obrenovitch, T.P. Glutamate neurotoxicity and stroke. *Clinical Pharmacology of cerebral ischemia.* Humana Press Inc. 1995 101-125.
- Okajima K, Harada N, Uchiba M. Ranitidine reduces ischemia/reperfusion-induced liver injury in rats by inhibiting neutrophil activation. *J Pharmacol Exp Ther.* 2002 Jun;301(3):1157-65.
- Okamoto S, Li Z, Ju C, Scholzke MN, Mathews E, Cui J, Salvesen GS, Bossy-Wetzel E, Lipton SA. Dominant-interfering forms of MEF2 generated by caspase cleavage contribute to NMDA-induced neuronal apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002 Mar 19;99(6):3974-9.
- Orth, K., et al. Molecular ordering of apoptotic mammalian CED-3/ICE-like proteases. *J. Biol. Chem.* 1996 271:16443
- Otersen O.P. & Landsend, A.S. Organization of glutamate receptors at the synapse. *Eur. J. Neurosci.* 1997 9: 2219-2224
- Ouyang YB, Tan Y, Comb M, Liu CL, Martone ME, Siesjo BK, Hu BR. Survival- and death-promoting events after transient cerebral ischemia: phosphorylation of Akt, release of cytochrome C and Activation of caspase-like proteases. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1999 Oct;19(10):1126-35.
- Palmada, M. & Centelles J.J. Mecanismos d'acció del glutamat en cervell. *NPQ* 1997 376: 29-38
- Patel, A.J.() Observations on cell growth and regulation of glutamine synthetase by dexamethasone in primary cultures of forebrain and cerebellar astrocyte *Dev. Brain. Res.* 1985 8:31-38
- Petito CK, Olarte JP, Roberts B, Nowak TS Jr, Pulsinelli WA. Selective glial vulnerability following transient global ischemia in rat brain. *J Neuropathol Exp Neurol.* 1998 Mar;57(3):231-8.
- Pettus BJ, Chalfant CE, Hannun YA. Ceramide in apoptosis: an overview and current perspectives. *Biochim Biophys Acta.* 2002 Dec 30;1585(2-3):114-25.
- Plesniak N, Zinkel S, Le DA, Amin-Hanjani S, Wu Y, Qiu J, Chiarugi A, Thomas SS, Kohane DS, Korsmeyer SJ, Moskowitz MA. BID mediates neuronal cell death after oxygen/ glucose deprivation and focal cerebral ischemia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001 Dec 18;98(26):15318-23.
- Porn-Ares MI, Samali A, Orrenius S. Cleavage of the calpain inhibitor, calpastatin, during apoptosis. *Cell Death Differ.* 1998 Dec;5(12):1028-33.
- Posse de Chaves EI., Bussiere M., Vance D.E Campenot RB & Vance JE. 1997.... *J. Biol. Chem.* 272:3028-3035
- Prehn, J.H.M. Mitochondrial transmembrane potential and free radical production in excitotoxic neurodegeneration. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol.* 1998 357: 316-322
- Preiss, J.E., Loomis, C.R., Bell, R.M. & Niedel, J.E. Quantitative measurement of sn-1,2-diacylglycerols. *Methods Enzymol.* 141, 294-300 (1987).
- Prell G.D., Green JP. () Histamine as a neuroregulator. *Annu Rev. Neurosci* 1986 9, 209
- Rodríguez, F.J., Lluç, M., Dot, J., Blanco, I. & Rodríguez-Álvarez, J.() Histamine modulation of glutamate release from hippocampal synaptosomes. *Eur. J. Pharmacol.* 1997 323: 283-286.
- Rodríguez, J et al. Differential regulation of cerebellar granule neurons by two types

- of quisqualate receptors. *Neuroreport*. 1991 2: 517-520
- Rogers,D.C.& Hunter,J. Dissociation of effects of glutamate receptors antagonists on excitotoxic and hypoxic neuronal cell death in a novel rat cortical culture system. *Brain Res. Bull.* 1997 4: 131-139
- Rossi D.J., Oshima, T., Attwell D.. Glutamate release in severe brain ischemia is mainly by reversed uptake. *Nature* 2000 403: 316-321
- Scaffidi C, Fulda S, Srinivasan A, Friesen C, Li F, Tomaselli KJ, Debatin KM, Krammer PH, Peter ME. Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. *EMBO J.* 1998 Mar 16;17(6):1675-87.
- Schneider A, Martin-Villalba A, Weih F, Vogel J, Wirth T, Schwaninger M. NF-kappaB is activated and promotes cell death in focal cerebral ischemia. *Nat Med.* 1999 May;5(5):554-9.
- Schwandner R, Wiegmann K, Bernardo K, Kreder D, Kronke M. TNF receptor death domain-associated proteins TRADD and FADD signal activation of acid sphingomyelinase. *J Biol Chem.* 1998 Mar 6;273(10):5916-22.
- Shen W, Zhang C, Zhang G. Nuclear factor kappaB activation is mediated by NMDA and non-NMDA receptor and L-type voltage-gated Ca(2+) channel following severe global ischemia in rat hippocampus. *Brain Res.* 2002 Apr 12;933(1):23-30.
- Shibata M, Hisahara S, Hara H, Yamawaki T, Fukuuchi Y, Yuan J, Okano H, Miura M. Caspases determine the vulnerability of oligodendrocytes in the ischemic brain. *J Clin Invest.* 2000 Sep;106(5):643-53.
- Shibata,S.& Watanabe, S. A neuroprotective effect of histamine H1 receptor antagonist on ischemia-induced decrease in 2-deoxyglucose uptake in rat hippocampal slices. *Neurosci.Lett.* 1993 151:138-141
- Shu HB, Takeuchi M, Goeddel DV. The tumor necrosis factor receptor 2 signal transducers TRAF2 and c-IAP1 are components of the tumor necrosis factor receptor 1 signaling complex. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996 Nov 26;93(24):13973-8.
- Siebenlist U, Franzoso G, Brown K. Structure, regulation and function of NF-kappa B. *Annu Rev Cell Biol.* 1994;10:405-55. Review
- Siegel GJ.,Agranoff BW., Albers RW.,Fisher SK& Uhler MD. *Basic Neurochemistry* 6th edition.Lippincott-raven 1999
- Simon,R.P. & Meldrum,B.S. Blockade of NMDA receptors may protect against ischemic damage in the brain.*Science.* 1984 226:850-852
- Siskind LJ, Kolesnick RN, Colombini M. Ceramide channels increase the permeability of the mitochondrial outer membrane to small proteins. *J Biol Chem.* 2002 Jul 26;277(30):26796-803.
- Snider,B.J., Lobner,D.,Yamada,K.A. & Choi,D.W. Conditioning heat stress reduces excitotoxic and apoptotic components of oxygen-glucose deprivation-induced neuronal death in vitro. *J.Neurochem.* 1998 70:120-129.
- Soane L, Cho HJ, Niculescu F, Rus H, Shin ML. C5b-9 terminal complement complex protects oligodendrocytes from death by regulating Bad through phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway. *J Immunol.* 2001 Aug 15;167(4):2305-11.
- Sonenshein GE. Rel/NF-kappa B transcription factors and the control of apoptosis. *Semin Cancer Biol.* 1997 Apr;8(2):113-9. Review.
- Stout, A.k., Raphael, H., Kanterewicz, B.I., Klann, E. & Reynolds, I. Glutamate – induced neuron death requires mitochondrial calcium uptake. *Nature Neuroscience* 1998 1: 366-373.
- Strasser,U.,Lobner,D.,Behrens,M., Canzoniero,L. & Choi,D.W. Antagonists for group I mGluRs attenuate excitotoxic neuronal death in cortical cultures.*Eur.J.Neurosci.* 1998 10: 2848-2855
- Sugimoto K, Abe K, Lee TH, Sakurai E, Yanai K, Kogure K, Itoyama Y, Watanabe T. Histamine depletion in brain caused by treatment with (S)alpha-fluoromethylhistidine enhances ischemic damage of gerbil hippocampal CA2 neurons.*Brain Res.* 1994 Dec 15;666(2):279-83.
- Szatkowsky, M. & Attwell, D. Triggering and execution of neuronal death in brain ischemia: two phases of glutamate release by different mechanisms. *TINS* 1994 17: 359-365.

- Takano R, Hisahara S, Namikawa K, Kiyama H, Okano H, Miura M. Nerve growth factor protects oligodendrocytes from tumor necrosis factor- α -induced injury through Akt-mediated signaling mechanisms. *J Biol Chem.* 2000 May 26;275(21):16360-5.
- Tamatani, M. Ogawa,S., Niitsu,Y & Tohyama,M. Roles of Bcl-2 and caspases in hypoxia-induced neuronal cell death: a possible mechanism of peptidegrowth factors. *Mol.Brain.Res.* 1998 58:27-39.
- Tamatani M.,Ho Che Y., Matsuzaki H., Ogawa S.,Okado H., Miyake S., Mizuno T. & Tohyama M.Tumor necrosis factor induces Bcl-2 and Bcl-x expresión through NF κ B activation in primary hippocampal neurons. *JBC* 1999;274(93):8531-8538
- Tang G, Yang J, Minemoto Y& Lin A. Blocking Caspase 3-mediated proteolysis of IKK β supresses TNF α -induced apoptosis. *Molecular Cell* 2001; 8:1005-1016
- Taylor,C.P. & Lopachin,R.M. Oxygen-glucose deprivation in hippocampal slices: altered intraneuronal elemental composition predicts structural and functional damage. *J.Neurosci.* 1999 19: 619-629.
- Tenneti L, Lipton SA. Involvement of activated caspase-3-like proteases in N-methyl-D-aspartate-induced apoptosis in cerebrocortical neurons. *J Neurochem.* 2000 Jan;74(1):134-42.
- Thornberry, N.A. & Lazebnik. Caspases: enemies within. *Science.* 1998 281: 1312-1316
- Tosaki A, Szerdahelyi P, Joo F. Treatment with ranitidine of ischemic brain edema. *Eur J Pharmacol.* 1994 Nov 3;264(3):455-8.
- Tracey KJ & Cerami A. Tumor necrosis factor: a pleyotropic citokyne and therapeutic target. *Annu Rev Med.*1994; 5: 491-503
- Traiffort E., Pollard H., Moreau J., Ruart,M. Schwartz J.C. Martinez Mir, M.I. Palacios J.M. Pharmacological characterization and autoradiographic localization of histamine H2 receptors in human brain identified with [¹²⁵I] iodoaminopotentidine.*J.Neurochem.*1992 59 : 290-299
- Ueno T, Sawa Y, Kitagawa-Sakakida S, Nishimura M, Morishita R, Kaneda Y,Kohmura E, Yoshimine T, Matsuda H. Nuclear factor-kappa B decoy attenuates neuronal damage after global brain ischemia: a future strategy for brain protection during circulatory arrest.*J Thorac Cardiovasc Surg.* 2001 Oct;122(4):720-7.
- Velier,J.J.,Ellison,J.A.,Kikly,K.K.,Spera,P.,barone, F.C. & Feuerstein,G. Caspase-8 and caspase-3 are expressed by different population of cortical neurons undergoing delayed cell death after focal stroke in the rat. *J.Neurosci.* 1999 19:5932-5941.
- Vorobjev VS, Sharonova IN, Walsh IB, Haas HL. Histamine potentiates N-methyl-D-aspartate responses in acutely isolated hippocampal neurons. *Neuron.* 1993 11:837-844.
- Wang CX. & Shuaib A. 2002. Involvement of inflammatory cytokines in central nervous system injury.*Progress in Neurobiol.* 67:161-172
- Wang KK, Posmantur R, Nadimpalli R, Nath R, Mohan P, Nixon RA, Talanian RV,Keegan M, Herzog L, Allen H.Caspase-mediated fragmentation of calpain inhibitor protein calpastatin during apoptosis. *.Arch Biochem Biophys.* 1998 Aug 15;356(2):187-96.
- Wang KK. Calpain and caspase: can you tell the difference? *Trends Neurosci.* 2000 Jan;23(1):20-6. Review.
- Wang SJ, Omori N, Li F, Jin G, Zhang WR, Hamakawa Y, Sato K, Nagano I, Shoji M, Abe K. Potentiation of Akt and suppression of caspase-9 activations by cerebral artery occlusion in rats.*Neurosci Lett.* 2002 Oct 11;331(2):115-8.
- Wilde GJ, Pringle AK, Sundstrom LE, Mann DA, Iannotti F. Attenuation and augmentation of ischaemia-related neuronal death by tumour necrosis factor- α in vitro. *Eur J Neurosci.* 2000 Nov;12(11):3863-70.
- Wolf BB, Goldstein JC, Stennicke HR, Beere H, Amarante-Mendes GP, Salvesen GS, Green DR. Calpain functions in a caspase-independent manner to promote apoptosis-likeevents during platelet activation.*Blood.* 1999 Sep 1;94(5):1683-92.
- Wong GH.Protective roles of citokynes against radiation: induction of mitochondrial MnSOD. *Biochim.Biophys.Acta* 1995: 1271:205-209
- Yamashima T. Implication of cysteine proteases calpain, cathepsin and caspase in ischemicneuronal death of primates.*Prog Neurobiol.* 2000 Oct;62(3):273-95.

- Yang L, Lindholm C, Konishi Y, Li R & Shen Y. Target depletion of distinct tumor necrosis factor receptor subtypes reveals hippocampal neuron death and survival through different signal transduction pathway. *J.Neurosci* 2002; 22(8):3025-3032
- Yenari MA, Giffard RG. Ischemic vulnerability of primary murine microglial cultures. *Neurosci Lett.* 2001 Jan 26;298(1):5-8.
- Yin XM, Luo Y, Cao G, Bai L, Pei W, Kuharsky DK, Chen J. Bid-mediated mitochondrial pathway is critical to ischemic neuronal apoptosis and focal cerebral ischemia. *J Biol Chem.* 2002 Nov 1;277(44):42074-81.
- Ying,H.S.,Weishaupt,J.H.,Grabb,M.,Canzoniero,L.,Sensi,S.,Sheline,C.T.,Monyier,H. & Choi,D.W. Sublethal oxygen-glucose deprivation alters hippocampal neuronal AMPA receptor expression and vulnerability to Kainate-induced death. *J.Neurosci.* 1997 17:9536-9544.
- Yoshimura S., Banno Y., Nakashima S., Takenaka K., Sakai H., Nishimura Y., Sakai N., Shimizu S., Eguchi Y., Tsujimoto Y. & Nozawa Y. 1998. Ceramide formation leads to caspase-3 activation during hypoxic PC12 cell death. *JBC.* 273(12): 6921-6927
- Yoshioka A, Yamaya Y, Saiki S, Kanemoto M, Hirose G, Beesley J, Pleasure D. Non-N-methyl-D-aspartate glutamate receptors mediate oxygen-glucose deprivation-induced oligodendroglial injury. *Brain Res.* 2000 Jan 31;854(1-2):207-15.
- Yu ZF, Nikolova-Karakashian M, Zhou D, Cheng G, Schuchman EH, Mattson MP. Pivotal role for acidic sphingomyelinase in cerebral ischemia-induced ceramide and cytokine production, and neuronal apoptosis. *J Mol Neurosci.* 2000 Oct;15(2):85-97.
- Yu,S.P.,Sensi,S.L,Canzoniero,L, Buisson,A. & Choi, D.W.(1997) Membrane-delimited modulation of NMDA currents by metabotropic glutamate receptors subtypes 1/5 in cultured mouse cortical neurons. *J.Physiol.*499:721
- Yu,S.P., Yeh,C.H.,Strasser,U.,Tian,M. & Choi, D.W. NMDA receptor-mediated K⁺ efflux and neuronal apoptosis. *Science.* 1999 284: 336-338.
- Yuan J, Yankner BA. Apoptosis in the nervous system. *Nature.* 2000 Oct 12;407(6805):802-9. Review.
- Zhang,Y. & Lipton,P. Cytosolic Ca²⁺ changes during in vitro ischemia in rat hippocampal slices: major roles for glutamate and Na⁺-dependent Ca²⁺ release from mitochondria.*J.Neurosci.* 1999 19: 3307-3315.
- Zhao X, Bausano B, Pike BR, Newcomb-Fernandez JK, Wang KK, Shohami E, Ringger NC, DeFord SM, Anderson DK, Hayes RL. TNF-alpha stimulates caspase-3 activation and apoptotic cell death in primary septo-hippocampal cultures. *J Neurosci Res.* 2001 Apr 15;64(2):121-31.
- Zhou H, Li XM, Meinkoth J, Pittman RN. Akt regulates cell survival and apoptosis at a postmitochondrial level. *J Cell Biol.* 2000 Oct 30;151(3):483-94.
- Zhu C, Wang X, Hagberg H, Blomgren K. Correlation between caspase-3 activation and three different markers of DNA damage in neonatal cerebral hypoxia-ischemia. *J. Neurochem* 2000 Aug;75(2):819-29
- Zwart R, Blank T, Spiess J. Histamine slows the onset of desensitization of rat cortical NMDA receptors. *Neuroreport.* 1996 Sep 2;7(13):2206-10.