

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA



TESIS DOCTORAL

Acciones anti-inflamatorias del receptor nuclear PPAR γ en la isquemia cerebral: papel de la 5-lipoxigenasa en la neuroprotección por rosiglitazona

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

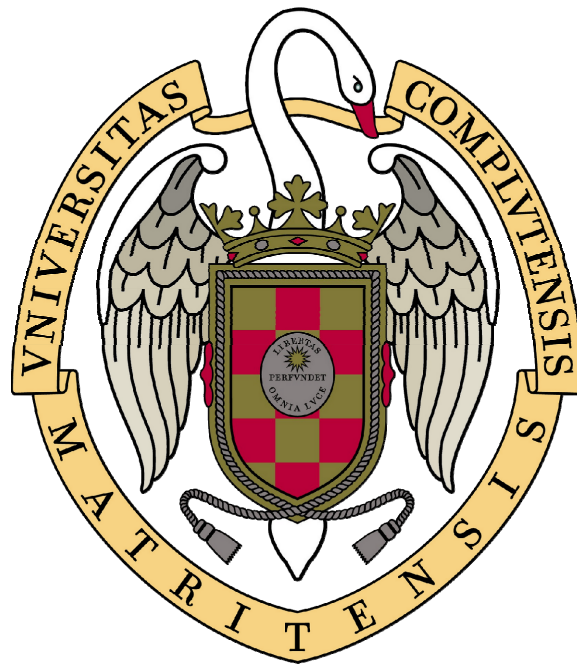
PRESENTADA POR

Iván Ballesteros Martín

Directores

María Ángeles Moro Sánchez
Ignacio Lizasoain Hernández
Olivia Hurtado Moreno

Madrid, 2013



**Acciones anti-inflamatorias del receptor nuclear PPAR γ
en la isquemia cerebral: Papel de la 5-lipoxigenasa en
la neuroprotección por rosiglitazona**

**TESIS DOCTORAL
IVÁN BALLESTEROS MARTÍN**

**Directores de Tesis
María Ángeles Moro Sánchez
Ignacio Lizasoain Hernández
Olivia Hurtado Moreno**

Madrid, 2012

ABREVIATURAS

5-LO 5-lipoxigenasa
15-HODE Ácido hidroxiocetadecadienoico
15-HETE Ácido hidroxiieicosatetraenoico
15dPGJ2 15-deoxi- Δ 12,14-prostaglandina J2
ACC Arteria carótida común
ADN Ácido desoxirribonucleico
AIF Factor inductor de apoptosis
AHR Receptor para hidrocarburos de arilo (*Aryl hydrocarbon receptor*)
Arg I Arginasa I
AMPA 2-amino-3-(hidroxi-5-metil-5-metilisoxazol-4-il) propionato
AP-1 Proteína activadora 1
ARNm Ácido ribonucleico mensajero
ASIC Canales iónicos sensibles a la concentración extracelular de protones
ATP Trifosfato de adenosina
CBA Ensayo de unión a citoquinas
CD11b Cluster de diferenciación 11b
CD18 Cluster de diferenciación 18
CD36 Cluster de diferenciación 36 (alias receptor de trombospondina)
CD45 Cluster de diferenciación 45
CD200 Cluster de diferenciación 200 (alias OX-2)
CD200R Receptor para CD200
CD206 Cluster de diferenciación 206 (alias receptor de manosa)
Cdk5 Quinasa dependiente de ciclina 5
COX-2 Cicloxigenasa-2
CXCL1 Quimiocina (C-X-C motivo) ligando 1 (alias fractalquina)
CXCL1R Receptor de fractalquina
cys-LTs Cisteinil leucotrienos
CYTC Citocromo C
DAMPs Patrones moleculares asociados a daño
DBD Dominio de unión al ADN
DMSO Dimetilsulfóxido
DC-SIGN *Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin*
EC₅₀ Concentración efectiva media
ECV Enfermedad cerebrovascular
EDTA Ácido etilendiaminotetraacético
EGTA Ácido etilenglicolaminoaciltetraacético
ELISA Enzimoimmunoensayo
EMSA Ensayo de movilidad electroforética retardada
EROs Especies reactivas de oxígeno
FITC Isocianato de fluoresceína
Fizz1 *Found in inflammatory zone 1* (alias *Resistin-like molecule α*)
GFAP proteína ácida fibrilar de la glía
FPRL1 Receptor de N-formil-péptido (alias Receptor de Lipoxinas o ALXR)
GM-CSF Factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos
HDAC Deacetilasa de histonas
HEPES Ácido (4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetanesulfónico)
HGMB1 *high-mobility group protein 1* o proteína de alta movilidad grupo 1
HRP Peroxidasa de rábano
HS Suero de caballo
HSP70 Proteína de choque térmico de 70 KDa
Iba1 Molécula adaptadora de unión a calcio inoxidado tipo 1
ICAM Molécula de adhesión intracelular
IFN- γ Interferón gamma
IgG Inmunoglobulina G
IL-1ra antagonista del receptor IL-1
IL-1 β Interleuquina 1 beta
IL-4 Interleuquina 4

IL-10 Interleuquina 10
IL-12 Interleuquina 12
IL-13 Interleuquina 13
IKK Quinasa del represor $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$
iNOS Sintasa de óxido nítrico inducible
Inyección i.c.v Inyección intracerebroventricular
Inyección i.p Inyección intraperitoneal
K-PBS Solución salina en tampón fosfato con potasio
LBD Dominio de unión al ligando
LTB₄ Leucotrieno B₄
LXA₄ Lipoxina A₄
LXR Receptor *liver X*
MCAO Oclusión de la arteria cerebral média
MCP-1 Proteína quimioatrayente de monocitos 1
M-CSF Factor estimulador de colonias de monocitos
MHC-I Complejo Mayor de Histocompatibilidad I
MHC-II Complejo Mayor de Histocompatibilidad II
MMP9 Metaloproteasa 9
NADPH nicotina adenina dinucleótido
NeuN *Neuronal nuclei*
NF- κ B Factor nuclear kappa B
NK *Natural killer*
NMDA N-metil-D-aspartato
NO Oxido nítrico
NPY Neuropeptido Y
OMS Organización mundial de la salud
PAMPS Patrones moleculares asociados a patógenos
PBS Solución salina en tampón fosfato
P/E Penicilina/Estreptomina
PE Ficoeritrina
PercP Proteína peridinin clorofila
PFA Paraformaldehido
PGC-1 β Coactivador 1 beta de PPAR γ
PLA2 fosfolipasa A2
PPAR γ receptor activado por proliferadores de peroxisomas gamma
PPRE Elementos de respuesta a PPAR
PTEN fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato 3-fosfatasa
RMN Resonancia magnética nuclear
RSG Rosiglitazona
RT-FRET Transferencia de energía de resonancia por fluorescencia resuelta en tiempo
R-tPA Activador tisular del plasminógeno recombinante
RT-PCR Reacción en cadena de la polimerasa transcripción inversa
RXR Receptor X de retinoides
SFB Suero fetal bovino
SHIP Fosfatasa 5' inositol que contiene dominios SH2
SMAD Superfamilia *mothers against DPP homolog*
SNC Sistema nervioso central
SOCS Supresores de la señalización dependiente de citocinas
STAT Transductor de señal y activador de la transcripción
TBS Solución de Tris tamponada
TGF- β Factor de crecimiento transformante beta
TLRs Receptores *Toll-like*
TNF α Factor de necrosis tumoral alfa
TRAIL *TNF Related Apoptosis Inducing Ligand* o Ligando inductor de la apoptosis relacionado con TNF
TTC Cloro de 2,3,5-trifenil-tetrazolio
TZDs Tiazolidindionas
WT *Wild type* (fenotipo salvaje)
Ym1 alias *Chitinase-3-like protein 3*

ÍNDICE

I INTRODUCCIÓN **4**

1.1 Enfermedad cerebrovascular	5
1.2 Fisiopatología del ictus: La cascada isquémica	7
1.3 Inmunomodulación e isquemia cerebral	7
1.3.1 Sistema nervioso central y sistema inmune: la difusa frontera	9
1.3.2 La respuesta inflamatoria aguda en la isquemia cerebral	11
1.3.3 ¿Cómo mata la inflamación en el SNC?	13
1.3.4 La dinámica de la inflamación en el proceso isquémico	16
1.3.5 La modulación inmune innata: Los beneficios de reducir el daño	19
1.3.6 La activación alternativa del macrófago	22
1.3.7 Los marcadores del fenotipo inmune en el macrófago	26
1.3.8 El papel de los neutrófilos en la isquemia cerebral	26
1.4 El Receptor Activado por Proliferadores de Peroxisomas Gamma: PPAR γ	28
1.4.1 PPAR γ y la modulación inmune	31
1.4.2 PPAR γ en la isquemia cerebral	33
1.5 Las lipoxigenasas	36
1.5.1 Implicación de 5-lipoxigenasa en la neuroprotección mediada por PPAR γ en isquemia cerebral	38

II HIPÓTESIS Y OBJETIVOS **41**

2.1 Hipótesis	43
2.2 Objetivos	43

III MATERIAL Y MÉTODOS **45**

3.1 Materiales	46
3.2 Diseño del protocolo experimental	46
3.2.1 Estudios <i>in vivo</i>	46
3.2.2 Estudios <i>in vitro</i>	49
3.3 Procesamiento de muestras	53
3.3.1 Extracción de ARN	54
3.3.2 Homogenado de corteza total	54
3.3.3 Extracción de núcleos y citosoles	55
3.3.4 Preparación de cerebros para inmunofluorescencia	55
3.3.5 Preparación de suspensiones de células de la corteza cerebral para citometría de flujo	56

3.4	Técnicas experimentales	56
3.4.1	RT-PCR	56
3.4.2	Western blot	57
3.4.3	Caracterización celular por citometría de flujo	58
3.4.4	Ensayo de actividad transcripcional de PPAR γ	59
3.4.5	Determinación de los niveles de LXA $_4$	60
3.4.6	Determinación del volumen de infarto	61
3.4.7	Inmunofluorescencia	62
3.4.8	Cuantificación celular por estereología	64
3.4.9	Ensayo TR-FRET	65
3.4.10	Determinación de citoquinas por citometría	66
3.4.11	Análisis de la fagocitosis de neutrófilos	66
3.4.12	Análisis de la función fagocítica de macrófagos en cultivo	67
3.4.13	Análisis estadístico	68

V RESULTADOS

69

4.1	Estudio de la implicación de 5-LO en los efectos anti-inflamatorios de PPARγ en la isquemia cerebral: inhibición de la activación clásica o M1	70
4.1.1	Caracterización de RSG como agonista PPAR γ	70
4.1.2	Estudio del papel de 5-LO en la inhibición de la activación M1 inducida por RSG en isquemia cerebral en rata	73
4.1.3	Estudio del efecto del agonista de PPAR γ RSG sobre la expresión de 5-LO tras isquemia cerebral en rata	75
4.2	Estudio de la activación alternativa o M2 en la isquemia cerebral experimental y del papel de la vía PPARγ-5-LO en este proceso	78
4.2.1	Estudio del papel de 5-LO en la neuroprotección inducida por RSG en la isquemia cerebral experimental en ratón	78
4.2.2	Análisis de la expresión celular de 5-LO en isquemia cerebral experimental en ratón. Efecto de PPAR γ	79
4.2.3	Estudio del papel de 5-LO en la expresión y señalización de PPAR γ en isquemia cerebral experimental en ratón	79
4.2.4	Estudio de los niveles del producto de 5-LO LXA $_4$ en isquemia cerebral experimental en ratón. Efecto de PPAR γ	82
4.2.5	Estudio de la activación alternativa o M2 en el cerebro de ratón: efecto de la isquemia y de la vía PPAR γ -5-LO	82

4.2.6	Análisis de la localización celular de marcadores M2 en el cerebro isquémico en ratón	84
4.2.7	Caracterización de la fagocitosis de neutrófilos por microglía/macrófagos en isquemia cerebral en ratón. Efecto de la vía PPAR γ -5-LO	91
4.3	Efecto del producto de 5-LO LXA $_4$ en neuroprotección y activación M2	93
4.3.1	Estudio del efecto neuroprotector de LXA $_4$ en isquemia cerebral experimental en rata	93
4.3.2	Caracterización de la producción de LXA $_4$ <i>in vitro</i>	93
4.3.3	Estudio <i>in vitro</i> del efecto de LXA $_4$ en la activación M2 y en la función fagocítica de macrófagos	96

V DISCUSIÓN **99**

5.1	PPAR γ y neuroprotección: Papel de 5-LO	100
5.2	PPAR γ y activación M1: Papel de 5-LO	101
5.3	PPAR γ y activación M2: Papel de 5-LO	103
5.4	PPAR γ y fagocitosis de neutrófilos: Papel de 5-LO	108
5.5	Intermodulación de la actividad 5-LO y de la expresión de PPAR γ	110
5.5.1	Expresión y actividad transcripcional de PPAR γ en isquemia: Implicación de 5-LO	110
5.5.2	PPAR γ y la inducción de la expresión de 5-LO	111
5.6	LXA $_4$ como mediador de las acciones de la vía PPAR γ -5-LO	112
5.6.1	Implicación de RSG en la síntesis de LXA $_4$	112
5.6.2	Neuroprotección mediada por LXA $_4$	114
5.6.3	Implicación de LXA $_4$ en la polarización M2	115
5.7	Sumario: La vía PPAR γ -5-LO en la isquemia cerebral	116

VI CONCLUSIONES **119**

VII SUMMARY **122**

VIII BIBLIOGRAFÍA **137**

I Introducción

1.1 Enfermedad cerebrovascular

La Organización Mundial de la Salud (1989) define la Enfermedad Cerebrovascular (ECV) como “el rápido desarrollo de signos focales o globales de compromiso de la función cerebral, con síntomas de 24 horas o más, o que lleven a la muerte sin otra causa que el origen vascular”. La gravedad del episodio varía desde la discapacidad grave y la muerte hasta la recuperación parcial a casi completa.

Actualmente, la ECV es la cuarta causa de muerte en los Estados Unidos (después del infarto agudo de miocardio, el cáncer y las enfermedades respiratorias crónicas). Cada año se presentan en este país aproximadamente 795.000 nuevos casos de ictus, de los cuales 610.000 son primeros eventos y 185.000 recurrentes. Además, se estima que para el año 2030, 4 millones de estadounidenses sufrirán un infarto cerebral, produciéndose un 24,9% de incremento en la prevalencia de la ECV respecto a 2010 (Roger et al., 2012). De hecho, actualmente, la ECV es la primera causa de incapacidad en el adulto (Feigin, 2007). El coste directo e indirecto debido al ictus isquémico en la Unión Europea en el año 2003 se valoró en 34 billones de euros (Leal et al., 2006) y para Estados Unidos este mismo cálculo fue de 62,7 miles de millones de dólares (Rosamond et al., 2007). Según datos del Instituto Nacional de Estadística (2009), en nuestro país, la enfermedad cerebrovascular es la primera causa de muerte en mujeres y la segunda causa de muerte en hombres, ocupando el segundo lugar como causa de mortalidad en la sociedad española (Tabla 1.1) y consumiendo un 3-4% del gasto total sanitario. Además, no debemos de olvidar que la carga provocada por las enfermedades cerebrovasculares está aumentando rápidamente debido al envejecimiento de la población española.

Tabla 1: Principales causas de defunción en España en el año 2009*

Número de defunciones según las causas de muerte más frecuentes¹			
Año 2009	Total	Hombres	Mujeres
Total defunciones	384.933	199.095	185.838
Enfermedades isquémicas del corazón	35.607	20.316	15.291
Enfermedades cerebrovasculares	31.143	13.210	17.933
Cáncer de bronquios y pulmón	20.401	17.279	3.122
Insuficiencia cardiaca	17.601	6.117	11.484
Enfermedades crónicas de las vías respiratorias inferiores	15.940	11.912	4.028
Demencias	13.732	4.441	9.291
Enfermedad de Alzheimer	11.161	3.477	7.684
Cáncer de colon	10.846	6.266	4.580
Diabetes mellitus	10.000	4.181	5.819
Neumonía	8.603	4.360	4.243
Enfermedad hipertensiva	8.249	2.697	5.552
Insuficiencia renal	6.656	3.206	3.450
Cáncer de mama	6.201	71	6.130
Cáncer de estómago	5.696	3.533	2.163
Cáncer de próstata	5.522	5.522	-

(1) Causas con peso relativo superior al 1,4%

*Instituto Nacional de Estadística (<http://www.ine.es/prensa/np664.pdf>)

En los últimos 15 años se ha llevado a cabo un gran progreso en el tratamiento en fase aguda del ictus isquémico. Se han implementado unidades especializadas en el manejo del ictus con protocolos unificados de tratamiento y con un riguroso control de las medidas generales (Hanger et al., 2007). Esto ha ido acompañado de una gran inversión en investigación en la búsqueda de un agente neuroprotector efectivo (Auriel and Bornstein, 2010). Sin embargo, hasta la fecha, el único tratamiento aprobado es la recanalización del vaso ocluido por medio del rt-PA (Activador del Plasminógeno Tisular Recombinante -Alteplasa-). Este procedimiento fibrinolítico es un tratamiento coste-efectivo: no incrementa los costes del proceso y es eficiente. El factor principal para ello es la disminución de la incapacidad, lo que resulta en una mejor calidad de vida del paciente y una reducción de los costes sanitarios a largo plazo (Marsh and Keyrouz, 2010). Adicionalmente, la principal limitación de este tratamiento es la corta ventana terapéutica -entre 3 y 4,5 horas post-ictus- y, debido a los exigentes criterios de exclusión e inclusión, son muy pocos pacientes los beneficiados. Solo entre el 20 y el 25% de los pacientes llegan a tiempo a un

centro hospitalario, y entre el 3 y 5% de ellos son candidatos a trombolisis, de los cuales reperfundan aproximadamente un 50% (Hacke et al., 2008).

1.2 Fisiopatología del ictus: La cascada isquémica

La lesión y la muerte celular que se producen tras la isquemia cerebral están directamente vinculadas a la caída de ATP que presentan las áreas cerebrales expuestas a la depleción del flujo sanguíneo. El establecimiento de un déficit energético en el cerebro es una situación de extrema gravedad, dado que el ATP es imprescindible para multitud de procesos celulares. Este fallo bioenergético desencadena el desarrollo de una serie de eventos conocidos como **cascada isquémica** (Figura 1.1).

1.3 Inmunomodulación e isquemia cerebral

La isquemia cerebral lleva consigo una importante respuesta inflamatoria. Dicha respuesta se ha asociado a un aumento del daño cerebral y a un peor pronóstico en pacientes que han sufrido un infarto isquémico. Sin embargo, y dado que la inflamación es imprescindible para iniciar el proceso de neovascularización y regeneración, una respuesta inflamatoria contenida puede ser necesaria y beneficiosa. Los últimos avances en el campo de la inmunomodulación, junto con los avances en el conocimiento del fenómeno de tolerancia isquémica y el papel de la inmunidad innata en este fenómeno, nos van a permitir abrir una posibilidad para la aplicación de las terapias inmunomoduladoras en esta enfermedad.

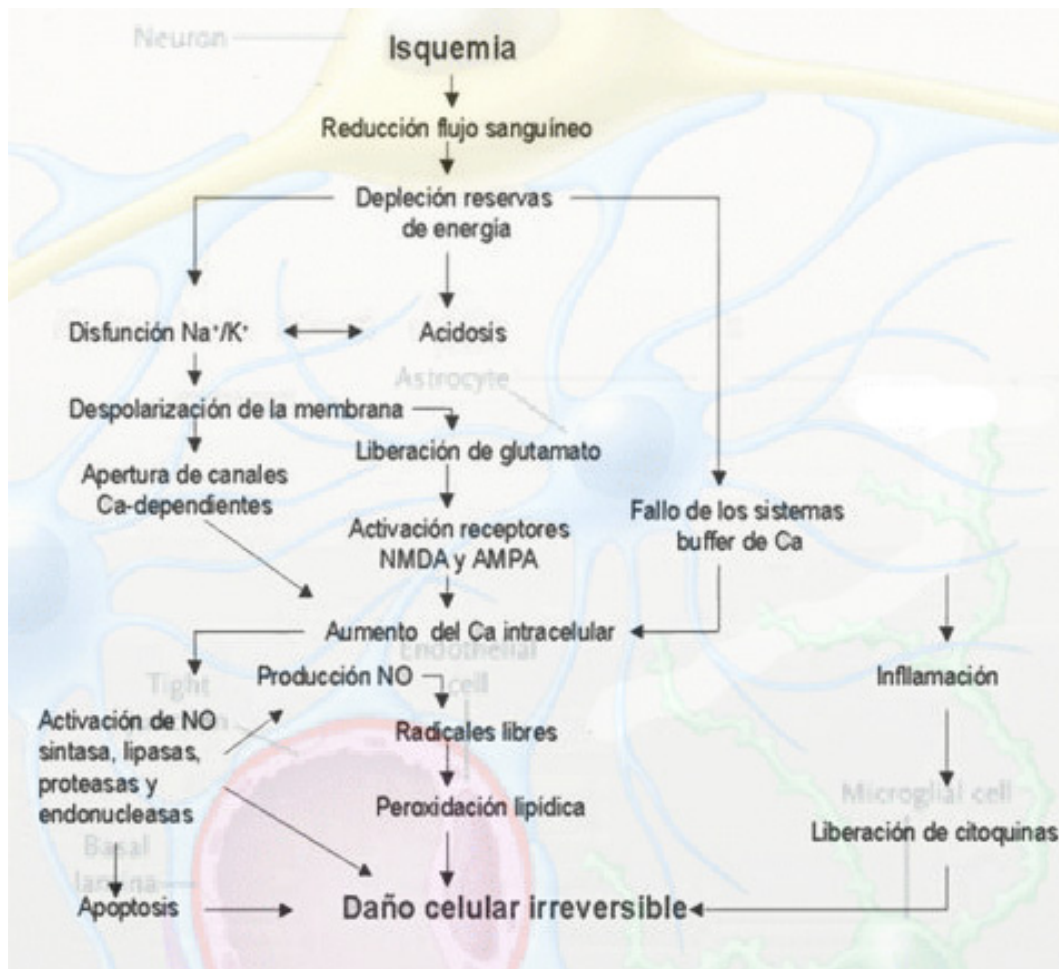


Figura 1.1 La cascada isquémica: En la isquemia producida por la oclusión de la arteria cerebral media, la causa más común de infarto, el daño es más rápido e intenso en el centro del territorio isquémico (core isquémico), donde el flujo sanguíneo es mínimo. En la periferia de la región isquémica, también llamada *penumbra*, el daño neuronal se desarrolla más lento porque el flujo sanguíneo procedente de los territorios vasculares adyacentes (flujo colateral) mantiene la perfusión cerebral sobre el umbral letal. En el core isquémico, el principal mecanismo de muerte celular es el fallo energético. Sin oxígeno ni glucosa, las neuronas no pueden generar el ATP necesario para mantener el gradiente iónico a través de las membranas neuronales, principalmente mediante la ATP-asa Na⁺/K⁺. Debido a esto, una acumulación masiva de Na⁺ y Ca²⁺ en el citoplasma lleva a pérdida de turgencia y degeneración de los organelos, pérdida de la integridad de la membrana y la disolución de la célula (muerte por necrosis). En la penumbra isquémica, aunque en un primer momento la reducción del flujo no es suficiente para provocar un fallo energético y las neuronas permanecen viables durante un periodo prolongado de tiempo después del daño isquémico, éstas están sometidas a estrés y son muy vulnerables a eventos patogénicos que puedan romper su frágil equilibrio metabólico. La excesiva acumulación de glutamato en el espacio extracelular es uno de los principales factores que contribuye a la muerte de la penumbra isquémica. La resultante sobreactivación de los receptores NMDA lleva a la acumulación de Ca²⁺ que activará a las enzimas dependientes de este catión, como proteasas (calpaína y caspasa) y enzimas productoras de óxido nítrico, especies oxidantes y metabolitos del ácido araquidónico. Estos eventos conducen a la necrosis o a la muerte celular programada (dependiendo de la intensidad del estímulo y del estado metabólico de la neurona). Las células dañadas y muertas además tienen un papel importante en la inducción de la inflamación postisquémica porque liberarán “señales de peligro” que activarán al sistema inmune (Iadecola and Anrather, 2011).

1.3.1 Sistema nervioso central y sistema inmune: la difusa frontera

En el año 1948, Peter Medawar observó un curioso fenómeno: cuando se realizaba un trasplante de tejido heterólogo en el sistema nervioso central (SNC) no se producía rechazo inmunológico (Medawar, 1948). Este hallazgo le llevó a proponer al sistema nervioso y al inmune como dos sistemas aislados e independientes. Dicho dogma ha persistido hasta épocas recientes; sin embargo, actualmente, un gran número de evidencias indican que el cerebro y el sistema inmune están estrechamente conectados en una comunicación continua que mantiene la homeostasis del tejido nervioso. De hecho, células del sistema inmune, al igual que sus mediadores, se encuentran de forma rutinaria en el SNC tanto en condiciones normales como patológicas.

La comunicación entre los sistemas inmune y nervioso se produce de forma local y distante (Figura 1.2). Localmente, la respuesta inmune en el SNC induce la activación de las células gliales y los macrófagos residentes y la infiltración de las células inmunes circulantes. En localizaciones distantes, existen muchas evidencias de comunicación neuroinmunológica, por ejemplo, en relación con la inmunosupresión post-ictus. Este fenómeno parece proteger al cerebro del daño inflamatorio, pero tiene una importante contrapartida derivada del incremento en la susceptibilidad a infecciones, hecho al que se asocia un incremento considerable de la mortalidad (Meisel et al., 2005).

Muchas de las respuestas inducidas en esta comunicación continua se basan en las citoquinas secretadas por las células inmunes para comunicarse entre sí. Pero, curiosamente, estos mediadores tradicionalmente asociados a una función exclusivamente inmunitaria también se comunican con las neuronas y la glía y tienen la capacidad de influir en la función sináptica (Stevens et al., 2007), la plasticidad neuronal (Huh et al., 2000) y la neuroprotección (Farina et al., 2007). Y, a la inversa, se ha descrito la expresión de receptores de neurotransmisores en células del sistema inmune con capacidad para influir en la función inmunológica (Rosas-Ballina et al., 2011;

Wong et al., 2011). Valga de ejemplo la implicación de los receptores nicotínicos para acetilcolina de los macrófagos esplénicos en la inhibición de la producción de $\text{TNF}\alpha$ (Probert and Selmaj, 1997). Estas evidencias, y otras tantas que indican que muchos de los elementos que se creían propios de uno u otro sistema se comparten y complementan, involucran estrechamente al sistema inmune en el destino del cerebro isquémico y en su supervivencia tras una isquemia cerebral.

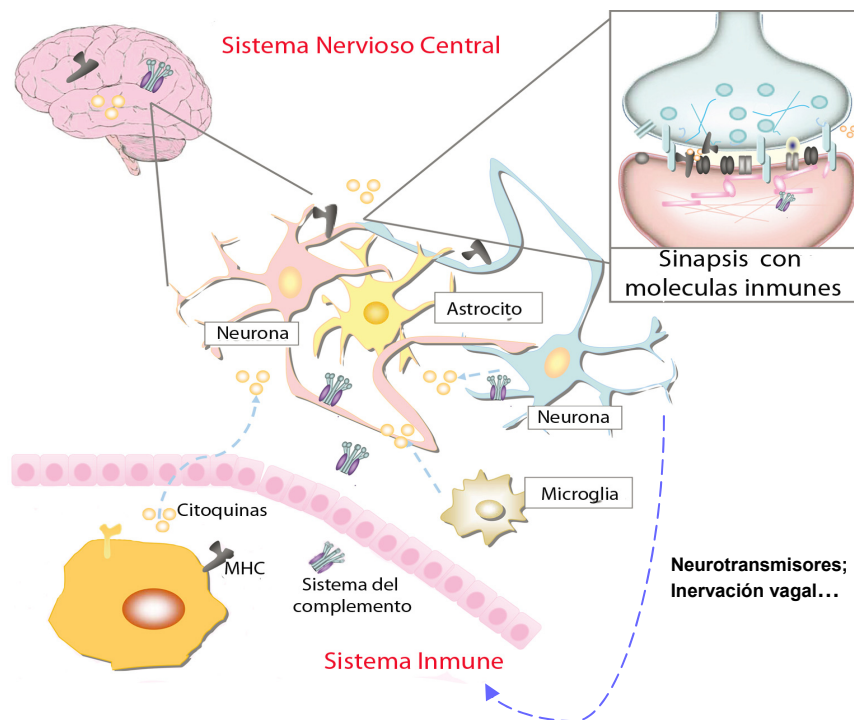


Figura 1.2 Comunicación entre el SNC y el sistema inmune: Las moléculas inmunes se expresan en el cerebro durante su desarrollo normal. Se ha identificado un papel importante para el complejo mayor de histocompatibilidad I (MHC-I), el sistema del complemento y las citoquinas en el funcionamiento, modelado y plasticidad de las sinapsis. A su vez, diversos neurotransmisores pueden influir directamente en la funcionalidad del sistema inmune. (Adaptado de Garay and McAllister, 2010).

1.3.2 La respuesta inflamatoria aguda en la isquemia cerebral

La respuesta inflamatoria ante la isquemia cerebral se caracteriza por el establecimiento de una secuencia de eventos que implican al cerebro, su vasculatura, la sangre circulante y los órganos linfoides. La exquisita sensibilidad de las neuronas al daño isquémico coexiste con otros procesos que se producen de manera muy rápida tras la isquemia. En la **microvasculatura cerebral**, el estrés oxidativo y las especies reactivas de oxígeno (EROs) inducen la activación del sistema del complemento, las plaquetas y las células endoteliales (Iadecola and Anrather, 2011). El endotelio activado perderá la permeabilidad selectiva de barrera produciéndose la extravasación de constituyentes del plasma al cerebro. Además, se inducirá la sobreexpresión de selectinas endoteliales que favorecerán la unión de leucocitos a los vasos. Todo esto, sumado a un incremento en la secreción de proteasas de origen leucocitario, junto con la regulación a la baja de la expresión de las proteínas endoteliales de unión estrecha que sellan la unidad neurovascular, favorecerá la extravasación paracelular de proteínas y leucocitos circulantes al parénquima cerebral (del Zoppo, 2010). En definitiva, el endotelio isquémico va a propiciar una interfaz de intercambio entre el SNC y el sistema circulatorio durante el desarrollo de la respuesta inflamatoria.

Mientras la cascada isquémica progresa, la muerte celular, asociada principalmente a la necrosis tisular que induce la isquemia, lleva a una nueva fase de la respuesta inflamatoria. Las células muertas liberan “**señales de peligro**” que activan el sistema inmune (Figura 1.3). Dicha activación se lleva a cabo mediante un ingenioso conjunto de receptores capaces de detectar pequeños motivos moleculares que se encuentran en patógenos o, en el caso de la isquemia, en situaciones asociadas a daño tisular (Matzinger, 2002). Son de especial importancia los receptores Toll-like (TLRs) y los receptores *scavenger*, dado que se expresan de manera extensa en la microglía, los macrófagos perivasculares y las células endoteliales. La activación de estos receptores induce la **expresión de moléculas pro-inflamatorias** en sus

células diana. Todo este proceso de activación inmunológica, asociado a la defensa del huésped y a la eliminación de restos celulares, puede considerarse como una parte integral de la inmunidad innata.

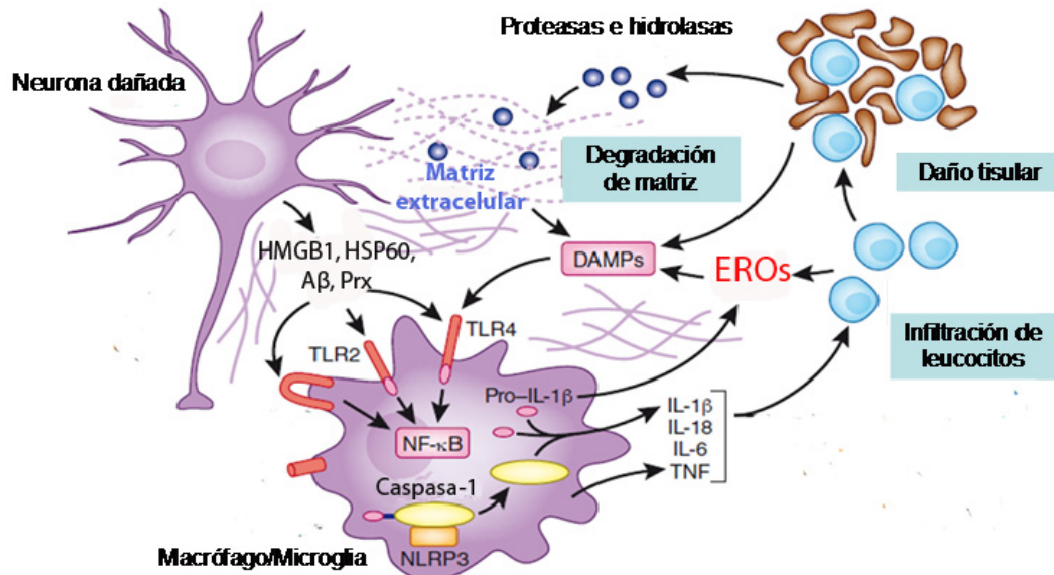


Figura 1.3 Muerte celular y activación de receptores de la inmunidad innata: La muerte isquémica conlleva la liberación de patrones moleculares asociados a daño (DAMPs), que activan los receptores TLR, especialmente TLR4 y TLR2. Los DAMPs liberados por la isquemia incluyen a la proteína HMGB1 (una proteína intracelular de unión al ADN), la proteína HSP60 y la proteína β -amiloide ($A\beta$), entre otras. También, recientemente se ha descrito que la liberación de peroxirredoxinas (Prx) tras la isquemia es un importante mediador en la activación de los receptores de la inmunidad innata (Shichita et al., 2012). Los receptores TLRs activarán la expresión de genes proinflamatorios mediante la activación del factor nuclear NF- κ B. Los DAMPs también se derivan de la ruptura de la matriz extracelular por enzimas líticas liberadas desde las células muertas y por la acción de las especies reactivas de oxígeno sobre los lípidos. La producción de citoquinas y la activación del complemento derivada de estos eventos llevan al incremento de la infiltración de leucocitos que aumentan el daño tisular y provocan la producción de más DAMPs. (Adaptado de Iadecola and Anrather, 2011).

Más concretamente, y como un proceso específico de activación inmune en el sistema nervioso central, la propia **muerte neuronal** es capaz de activar la microglía cerebral. Este proceso se produce tras la pérdida de las interacciones físicas que existen entre la microglía y las neuronas y cuya principal misión es mantener en estado quiescente la microglía. Entre estas

interacciones físicas, cabe destacar la expresión de CD200 y fractalquina (CXCL1) en la superficie de las neuronas. Estas proteínas interactúan con sus receptores microgliales CD200R y CXCL1R manteniendo a la microglía en un fenotipo de reposo. Por lo tanto, la ruptura de las interacciones neurona-microglía producirá la **activación microglial** (Cardona et al., 2006; Matsumoto et al., 2007). De forma paracrina, el incremento de las concentraciones de glutamato extracelular derivado de la muerte neuronal va a activar a los receptores metabotrópicos de glutamato que se encuentran en la microglía, conduciéndola a la expresión de un fenotipo pro-inflamatorio (Chapman et al., 2000). Así, la extensión de la muerte neuronal desde el core isquémico a las áreas de penumbra es concomitante a una activación microglial.

Teniendo en cuenta la alta densidad vascular existente en el cerebro, los mediadores inflamatorios secretados por las células activadas del parénquima son capaces de extenderse a lo largo de los compartimentos vasculares y perivasculares, amplificando y reforzando la expresión de citoquinas, quimioquinas y moléculas de adhesión que dirigen la **infiltración de las células inmunes circulantes** al cerebro isquémico (Iadecola and Anrather, 2011). Se genera así una respuesta inmunológica característica de la isquemia cerebral. Estos procesos de inflamación aguda tienen como principal problema lo que se ha denominado daño asociado a la inflamación y, por tanto, la modulación de estos fenómenos neuroinmunológicos es actualmente un importante objeto de estudio como diana terapéutica en el tratamiento de la isquemia cerebral.

1.3.3 ¿Cómo mata la inflamación en el SNC?

Las especies reactivas de oxígeno, el óxido nítrico, el sistema del complemento, los receptores de inducción de la apoptosis y la vía de las perforinas representan los efectores más importantes de la muerte celular inducida durante el proceso inflamatorio.

-Especies reactivas de oxígeno y nitrógeno:

En los procesos inflamatorios se producen aniones O_2^- derivados de la actividad de la enzima NADPH oxidasa. Esta proteína se expresa en todas las células inflamatorias. Además de la producción de EROs, se produce una gran cantidad de óxido nítrico (NO) derivada de la expresión *de novo* de la enzima inducible de la síntesis de NO (iNOS). El NO reacciona preferentemente con superóxido formando peroxinitrito, especie altamente citotóxica (Iadecola et al., 1995). El H_2O_2 se deriva de la dismutación del O_2^- y lleva asociado la aparición de radicales hidroxilo tóxicos mediante la reacción de Haber-Weiss, facilitada además por el incremento de la disponibilidad de hierro libre en la isquemia (Lipton, 1999). Todas estas moléculas alteran proteínas celulares, lípidos y ácidos nucleicos produciendo disfunción celular o muerte y han sido implicadas en el daño tisular producido durante la inflamación post-ictus. De hecho, la supresión de la actividad NADPH oxidasa o de la enzima iNOS es capaz de proteger al cerebro durante las fases tardías de la isquemia cerebral (Iadecola and Anrather, 2011).

-El sistema del complemento:

El sistema del complemento es una cascada proteolítica compuesta por varias subunidades (C1-C9) que conduce a la lisis celular a través de la formación de una estructura en forma de poro denominada "complejo de ataque de membrana". El complemento también es capaz de incrementar la fagocitosis (opsonización) o actuar como un estímulo de activación de la quimiotaxis para las células inflamatorias. Después de isquemia, el complemento se activa y sus componentes se sobreexpresan en la glía y las neuronas o entran al cerebro debido a la ruptura de la barrera hematoencefálica. La implicación del sistema del complemento en el daño isquémico se pone de manifiesto debido a que la eliminación de sus inhibidores, como es el caso de los ratones deficientes en CD95a, o la delección de sus subunidades, como C3a o C5a, incrementa el daño cerebral (Iadecola and Anrather, 2011).

-Receptores inductores de la apoptosis:

Fas (CD95) es un miembro de la superfamilia de los receptores para TNF. Se expresa en las neuronas y en la glía después de isquemia. Mientras tanto, su ligando FasL (CD95L) se encuentra en neuronas, microglía, células T citotóxicas y células NK. La activación de CD95 induce la formación del *complejo de señalización de la muerte inducida* y la subsecuente activación de la caspasa-8 y del factor proapoptótico Bid (Strasser et al., 2009). De forma similar, el *ligando inductor de la apoptosis relacionado con TNF* (TRAIL) se expresa *de novo* después de isquemia en astrocitos y microglía e induce apoptosis mediante la unión a sus receptores en neuronas y glía (Cui et al., 2010). Estas vías de señalización se implican en la muerte celular isquémica puesto que la inhibición de TRAIL o la mutación de Fas reducen el daño isquémico (Martin-Villalba et al., 1999).

-Perforinas y granzimas:

Este mecanismo es usado por las células T citotóxicas y las células NK, las cuales liberan perforina y granzima mediante el reconocimiento de antígenos asociados al complejo mayor de histocompatibilidad I (MHC-I). La degranulación de la proteasa granzima y la perforina, que es análoga a la subunidad C9 del complemento, forma un complejo que es internalizado por la célula diana. Una vez en el interior de la célula, la granzima activa la apoptosis vía activación de la caspasa-3 y Bid. La implicación de esta vía en el daño isquémico se sugiere por la observación de que la delección génica de perforinas es protectora (Liesz et al., 2011).

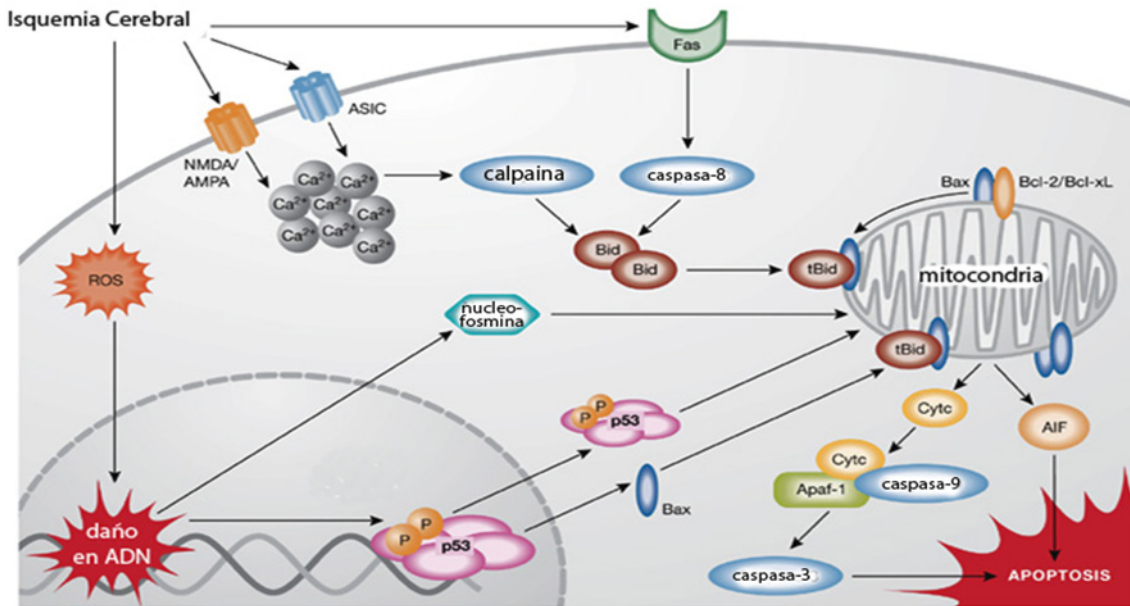


Figura 1.4 Implicación del factor proapoptótico Bid en los mecanismos de muerte neuronal tras isquemia. La inflamación juega un importante papel en la inducción de la muerte de las neuronas tras el proceso isquémico. Las especies reactivas de oxígeno derivadas de las NADPH oxidasas de las células inmunes producen daño en el ADN. Como respuesta a ese daño, se produce la activación de p53 o la traslocación de la nucleofosmina a la mitocondria produciendo disfunción mitocondrial. En el caso de la apoptosis inducida por receptores, la activación del receptor FAS neuronal por su ligando procedente de las células inmunes desencadena una cascada de señalización vía activación de caspasas o del factor inducible de apoptosis (AIF) que culmina en la muerte de la célula. Ambos procesos, junto con la excitotoxicidad mediada por los receptores del glutamato AMPA, NMDA y de los canales iónicos sensibles a ácidos (ASIC) permiten la formación de dímeros entre los reguladores proapoptóticos tBid y Bax. Esta interacción forma poros en la membrana externa de la mitocondria produciendo la liberación de citocromo c (Cytc) y de AIF, que respectivamente activan la apoptosis de la célula de una manera dependiente o independiente de caspasas. La acción proapoptótica de tBid también se induce por acción de las granzimas o del receptor TRAIL. (Adaptado de Culmsee and Kriegstein, 2007).

1.3.4 La dinámica de la inflamación en el proceso isquémico

Como hemos comentado anteriormente, tras la activación del endotelio y las células residentes, se produce en el cerebro isquémico la infiltración de células inflamatorias circulantes, que incluyen granulocitos (neutrófilos), células T, monocitos/macrófagos y otras células. Este proceso de infiltración se ha puesto de manifiesto tanto en modelos animales como en pacientes isquémicos (Jin et al., 2010). En la fase aguda de la isquemia cerebral, que comprende de minutos a horas, se promueve la adhesión y migración transendotelial de los

leucocitos circulantes al parénquima cerebral. En la fase subaguda (horas a días), estos infiltrados liberarán citoquinas y quimioquinas, producirán especies reactivas de oxígeno e inducirán la activación de metaloproteinasas, lo que exacerbará la respuesta inmune cerebral causando una mayor activación de las células residentes y daño (Amantea et al., 2009; Kriz, 2006). De todas formas, hay que tener en cuenta que muchos de estos factores pro-inflamatorios tienen un papel dual. Así, por ejemplo, la contribución de la MMP-9 a la ruptura de la barrera hematoencefálica promoverá posteriormente la regeneración cerebral y la neovascularización (Amantea et al., 2009). Esta dualidad hace imprescindible el estudio de la dinámica de la inflamación en el ictus con el fin de poder aplicar las terapias inmunomoduladoras más beneficiosas para el paciente. Por lo tanto, podríamos afirmar que rara vez algo es simplemente malo o bueno, de hecho, casi todos los procesos tienen tanto aspectos beneficiosos como deletéreos y, probablemente, la mejor visión del efecto de la inflamación en el ictus sea en términos de coste *versus* beneficio. Así, muchos de los procesos secundarios y factores inhibidores de la regeneración persisten porque han debido ser adaptativos en términos evolutivos.

Actualmente, los estudios que se han realizado sobre la dinámica de la infiltración de células inflamatorias al cerebro isquémico se basan principalmente en las técnicas de inmunohistoquímica y de citometría de flujo. Estas técnicas presentan importantes limitaciones ya que, en el caso de la citometría de flujo, el aislamiento celular usando procesos de digestión enzimática y su posterior procesamiento *ex vivo* pueden provocar cambios en la expresión de antígenos en las células estudiadas. Además, en ambas técnicas no existe la posibilidad de examinar alteraciones dinámicas en el mismo animal, dado que el procedimiento requiere de su sacrificio (Jin et al., 2010). Teniendo en cuenta estas limitaciones, diferentes autores han presentado distintos modelos de infiltración tras isquemia (Figura 1.5). En este punto, focalizaré mi atención en dos estudios en particular. El estudio presentado por el grupo de Stenzel-Poore evaluó la infiltración de las células inflamatorias mediante el empleo de la citometría de flujo en un modelo de

isquemia focal en ratón (Stevens et al., 2002). En este estudio encontraron un incremento de microglía/macrófagos activados a 18h tras MCAO, alcanzando un pico de activación a las 48h que duró hasta las 96h post-isquemia. Los neutrófilos alcanzaron su pico de infiltración a las 48h tras isquemia y continuaron elevados hasta las 96h tras la oclusión. En el caso de los linfocitos T, este incremento fue más lento, alcanzando su pico a partir de las 72h tras isquemia. En el estudio presentado por Gelderblom y colaboradores, donde se llevaron a cabo las mismas condiciones experimentales (Gelderblom et al., 2009), la acumulación de la microglía y la infiltración de macrófagos precedió a la infiltración de los neutrófilos. Las diferencias encontradas a nivel de la dinámica de la infiltración de neutrófilos requiere de atención, dado que la infiltración de los neutrófilos en la isquemia es un proceso importante por su contribución al daño cerebral y es preciso conocer si los mecanismos principales que inducen su extravasación se derivan del daño isquémico o de la señalización desencadenada por las células infiltradas.

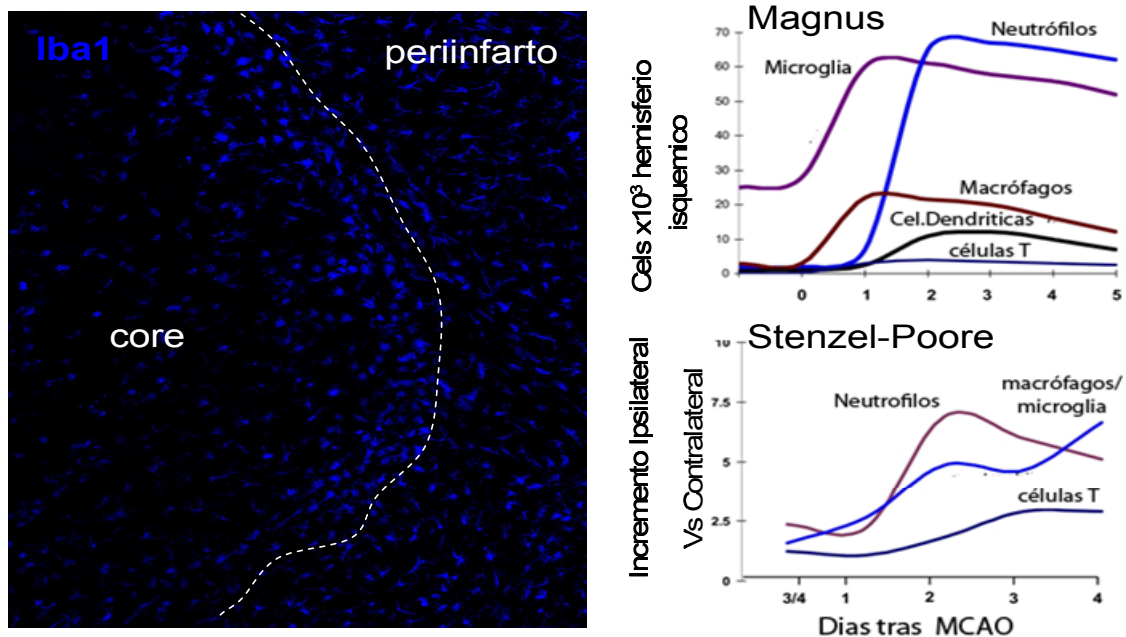


Figura 1.5 Dinámica del reclutamiento de células inflamatorias al cerebro isquémico en ratón. Las gráficas obtenidas a partir de los estudios de los grupos de Magnus y Stenzel-Poore (Gelderblom et al., 2009; Stevens et al., 2002), muestran la infiltración de las principales células inflamatorias tras la isquemia (Adaptado de Jin et al., 2010). A su vez, se muestra una imagen de inmunofluorescencia en cerebro de ratón 24h tras el proceso isquémico tomada en nuestro laboratorio (Ballesteros, observaciones no publicadas). En ella se observan que las células inmunorreactivas para el marcador Iba1 (microglía/macrófagos) presentan una morfología ameboides a lo largo de las regiones peri-infarto y core situadas en el hemisferio ipsilateral, lo que indica su activación tras la isquemia

En mi trabajo de investigación nos focalizaremos en la inmunidad innata y en la posibilidad de ejercer un efecto inmunomodulador en los macrófagos/microglía residentes o monocitos infiltrados. En este caso, gracias a técnicas de inmunofluorescencia empleadas rutinariamente en nuestro grupo de investigación y coincidiendo con los modelos descritos, sabemos que su activación se establece ya 24 horas tras isquemia, donde la aparición de células ameboides Iba1+ alrededor y, de forma menos frecuente, en el interior del core isquémico evidencian dicho estado (Ballesteros, observaciones no publicadas).

1.3.5 La modulación inmune innata: Los beneficios de reducir el daño

En el proceso isquémico agudo todo sucede muy rápido. Aquí, el establecimiento de un *core* isquémico limitado a un área del cerebro donde no hay riego sanguíneo es un proceso físico donde las alternativas que existen para salvar al tejido son nulas hasta donde llega nuestro conocimiento. Sin embargo, el estudio de los procesos inflamatorios que desencadenan la extensión del daño isquémico indica que estos procesos son teóricamente manipulables y que su correcta modulación podría ser un gran avance en el tratamiento y disminución de las secuelas neurológicas que produce la isquemia (Cuenca-Lopez et al., 2010). Más importante todavía es la posibilidad de que esta modulación pueda propiciar una resolución de la inflamación más efectiva y enfocada a potenciar los posteriores eventos de neuroreparación que podrían reducir aún más estas secuelas neurológicas. Aún así, y mientras la investigación en neurogénesis no cambie esta situación, nuestro cerebro presenta un potencial neurogénico limitado, con lo que la pérdida de neuronas post-mitóticas debido a la toxicidad mediada por el sistema inmune provoca un grave impacto en el organismo.

Tabla 2: Estrategias inmunomoduladoras empleadas para el tratamiento de ictus

Intervención	Diana	Características	Fase de desarrollo
Inhibición de TLR, sistema de complemento o receptores <i>scavenger</i>	Eventos desencadenantes de la cascada inflamatoria	Empeoramiento de infecciones después del infarto	Preclínico
Minociclina	Múltiples, incluyendo eventos iniciales del proceso inflamatorio	Generalmente seguro, pero neurotóxico en determinadas situaciones	Clínico (fase III comenzada)
Ligandos TCR	Celulas T	Mecanismo desconocido	Preclínico
Tolerización	Promueve respuesta Th2	Sólo preventivo: respuesta humoral deletérea	Preclínico
Precondicionamiento Remoto	Múltiple, incluyendo inflamación	Preventivo, pero puede ser probado en isquemia aguda	Clínico (Fase I en hemorragia subaracnoidea completa)
Inhibición de integrinas (anti-ICAM; anti-CD18)	Adherencia y transmigración de leucocitos	Potencial inmunogénico. Poco efectivo en ocasiones	Clínico (Fase III)
IL1-ra	Inhibición IL-1 β	Seguro, útil clínicamente en artritis	Clínico (Fase II completada)

*Datos adaptados de las revisiones de (del Zoppo, 2010; Iadecola and Anrather, 2011)

En los últimos 10 años, varios estudios sobre la función de los macrófagos en los tejidos periféricos, como el pulmón o el hígado, han abierto el camino hacia la comprensión de la heterogeneidad y funcionalidad de estas células efectoras de la inmunidad innata. Así, se ha definido una fase “tóxica” inicial de la respuesta inmune caracterizada por la expresión de moléculas pro-inflamatorias, como el TNF- α , la IL-12 o la IL-1 β . Esta respuesta inicial, que está principalmente mediada por el IFN- γ , se caracteriza por la aparición en el macrófago de un fenotipo denominado clásico o M1. Este fenotipo es claramente beneficioso para la defensa del huésped ante patógenos o daño. Pero, como hemos comentado anteriormente, presenta un importante componente deletéreo en la isquemia cerebral (Colton, 2009).

Así, de manera fisiológica, el organismo es capaz de reducir esta fase tóxica inicial, resolver la infección o el daño y restaurar la homeostasis tisular.

Por lo tanto, la respuesta inmune innata al daño evoluciona hacia un estado donde se requiere el reemplazamiento de las células perdidas o dañadas y la reparación de la matriz extracelular. Estos mecanismos, que reducen la fase de defensa inicial y promueven la resolución de la inflamación, son integrantes intrínsecos de la respuesta inmune innata. Así, la activación clásica del macrófago es reducida mediante bucles de retroalimentación que regulan etapas específicas del proceso de señalización de la inflamación.

Tabla 3: Mecanismos que promueven la resolución de una respuesta inmune innata al daño

Reducción de la carga patógena/endógena (PAMPs; DAMPs)
Catabolismo de mediadores pro-inflamatorios
Eliminación de las células inmunes activadas
Apoptosis de macrófagos
Liberación vía drenaje linfático o vasculatura
Retroalimentación negativa de las vías de activación
Pérdida de TLRs/otros receptores
Ubiquitinación y degradación
Disminución de la expresión
Activación de proteínas reguladoras negativas de la activación
Proteínas de la familia tirosina fosfatasa (CD45, PTEN, SHIP)
Supresión inducible de la señalización de citoquinas (SOCS)
Inhibidores de la vía NF- κ B (A20, fosforilación de IKK)
Receptores solubles /ligandos señuelo (IL1ra, sTNFR1)
Micro-ARNs
Función neuronal (Acetilcolina, NPY, noradrenalina)
Regulación del fenotipo funcional del macrófago
Activación alternativa
Desactivación adquirida
*Adaptado de (Colton, 2009)

Una interesante forma de detener la fase dañina de la activación clásica del macrófago y de restaurar la homeostasis tisular después del daño es cambiar el estado de activación del macrófago desde un fenotipo pro-inflamatorio o M1 hacia un fenotipo que promueva la reparación y la reconstrucción tisular. Este estado del macrófago se ha venido a denominar activación alternativa o M2.

1.3.6 La activación alternativa del macrófago

El término activación alternativa (M2) se adaptó tras asociar este estado de activación del macrófago con la respuesta inmune adaptativa Th2, y de aquí que el término M2 también haya sido usado para describir este estado de activación (Mantovani et al., 2005; Mosser and Edwards, 2008). Así, las citoquinas IL-4 e IL-13, comúnmente asociadas a las respuestas Th2, son sus inductores prototípicos, aunque otras citoquinas anti-inflamatorias, como la IL-10 o el TGF- β , también son capaces de producir en el macrófago cambios sustanciales que lo diferenciarían de su fenotipo clásico M1. Esta nomenclatura dicotómica M1/M2 nos es útil para el estudio de la modulación inmune en el proceso isquémico, ya que la idea de base es poder modular la inflamación hacia un fenotipo alejado del potencial dañino que presenta la activación clásica M1. Aún así, esta clasificación está muy alejada del verdadero espectro de estados de activación que pueden presentar los macrófagos. De hecho, dentro de la activación alternativa M2 hay una gran heterogeneidad, por lo que se han introducido nuevas subclasificaciones fenotípicas capaces de diferenciar distintos tipos de activación alternativa (Figura 1.6). Dentro de estos cambios, el más importante es el que propuso Gordon en 2003, al introducir un nuevo estado de macrófagos denominado “desactivación adquirida”, cuyos inductores serían principalmente la IL-10 y el TGF- β (Mosser, 2003). Así, siendo estrictos, una activación alternativa sería la inducida por las interleucinas IL-4 e IL-13, cuya principal función inmunológica está encaminada a la eliminación de parásitos, mientras que una activación clásica o M1 tiene una función citotóxica, destinada a la eliminación de patógenos intracelulares. Pero además, las actividades metabólicas y secretoras de los macrófagos activados alternativamente favorecen funciones tróficas más que líticas, la eliminación de cuerpos apoptóticos más que la inducción de necrosis y la inducción de tolerancia más que de autoinmunidad (Gordon and Martinez, 2010).

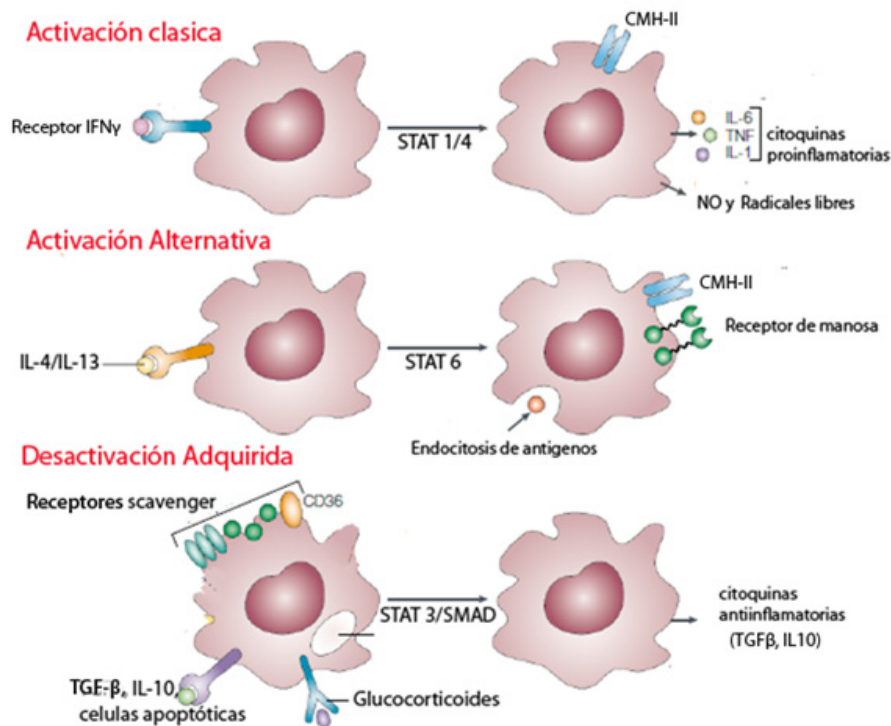


Figura 1.6 Activación del macrófago: La activación clásica está mediada por la señalización desencadenada por el IFN γ , donde se ha implicado directamente a la señalización vía STAT1 y 4. Su principal función es la defensa tisular ante patógenos intracelulares. Se caracteriza por la alta expresión de citoquinas pro-inflamatorias, MHC-II y una alta tasa respiratoria oxidativa. La activación alternativa mediada por la señalización de IL-4/13 vía STAT6 se relaciona con la reparación tisular y la reconstrucción de la matriz, aunque inmunológicamente está encaminada a la lucha contra parásitos. La desactivación adquirida, mediada por TGF- β e IL-10, vía STAT3 o SMAD se caracteriza por su capacidad de suprimir la inflamación y de fagocitar restos celulares. (Adaptado de Mosser, 2003)

Para comprender qué es la activación alternativa de un macrófago, hay que tener en cuenta que su activación hacia un estado plenamente funcional está influenciada por diferentes estímulos que van a determinar el destino de dicha célula (Figura 1.7). Así, aun de forma artificial, podemos diferenciar distintos procesos de activación del macrófago. Inicialmente, existe una fase primera de diferenciación, donde el monocito reclutado por el tejido madura a macrófago. En esta fase inicial, diferentes estudios *in vitro* indican que el balance de M-CSF, GM-CSF, ácido retinoico y lipoproteínas determinan diferencias sustanciales en el fenotipo del macrófago maduro. Durante el reclutamiento continuo de monocitos, estas células se encuentran expuestas a

concentraciones variables de mediadores que van a inducir una segunda fase de cebado (*priming*) por citoquinas. El término anglosajón *priming* deriva del hecho de que estos estímulos no son muy potentes *per se*, pero influyen en el potencial inflamatorio del macrófago y su respuesta a otros estímulos. En esta fase de la activación es donde podemos diferenciar entre un *priming* mediado por TNF- α (activación clásica) o por IL-4/IL-13 (activación alternativa). En la tercera fase de activación, que podríamos denominar *respuesta a estímulo*, el macrófago adquiere un fenotipo funcionalmente maduro. Este estado se produce en respuesta a estímulos microbianos, opsónicos o de daño tisular y está mediado por receptores TLR o análogos. En el caso de un macrófago activado alternativamente, la activación se produciría en un entorno Th2 como, por ejemplo, en el contexto de una infección crónica de un parásito seguida de un segundo estímulo microbiano (Gordon and Martinez, 2010). Una vez se ha establecido la activación de un macrófago, algunas propiedades de la activación alternativa pueden revertirse (plasticidad), mientras que otras son irreversibles (Stout et al., 2005).

Si el macrófago es capaz de sobrevivir a su tarea inflamatoria se debería producir una fase final comúnmente definida como *desactivación*. Este proceso de desactivación, en el que se ha implicado directamente a las citoquinas IL-10, TGF- β y a una multitud de mediadores anti-inflamatorios como nucleótidos, lipoxinas y glucocorticoides, contribuirá, como hemos descrito anteriormente, a la resolución de la inflamación, desactivando el potencial pro-inflamatorio del macrófago y produciendo cambios que le permitan eliminar los restos celulares y expresar funciones asociadas a la reparación. La desactivación adquirida del macrófago incluye por tanto una subpoblación con un fenotipo mixto con capacidad inmunosupresora asociada con la fagocitosis de células apoptóticas. Este tipo de activación se diferencia de la activación alternativa tanto por el agente inductor como por los cambios en la funcionalidad de la célula (Gordon and Martinez, 2010).

Mientras que mucho se conoce sobre la fuente de citoquinas anti-inflamatorias que inician la resolución y la reparación en los tejidos periféricos, este proceso es menos conocido en el SNC. Las células reguladoras de una

respuesta Th2 en el cerebro pueden no provenir de las mismas fuentes que en la periferia. Así, IL-4, IL-13, IL-10 y TGF- β se producen en el SNC por la microglía, los astrocitos y en algunos casos por las neuronas (Finch et al., 1993; Ledebuer et al., 2000; Morgan et al., 1993; Suzuki et al., 2005; Szczepanik et al., 2001). Se piensa que las señales que inducen su síntesis se deben a la existencia de patógenos o de factores secundarios secretados en respuesta a una actividad paracrina o autocrina. Aun así, en el caso particular de la IL-4 y la IL-13, sus niveles de ARN y proteína son muy variables y sólo se encuentran en determinados tipos de inducción (Ponomarev et al., 2007). Estos niveles de expresión pueden variar también dependiendo de la región cerebral. Por ejemplo, la microglía perivascular se encuentra expuesta a mayores niveles de IL-4 e IL-10 debido a su encuentro con células T activadas o T reguladoras que atraviesan la barrera hematoencefálica para entrar al parénquima (Perry et al., 2007; Tiemessen et al., 2007).

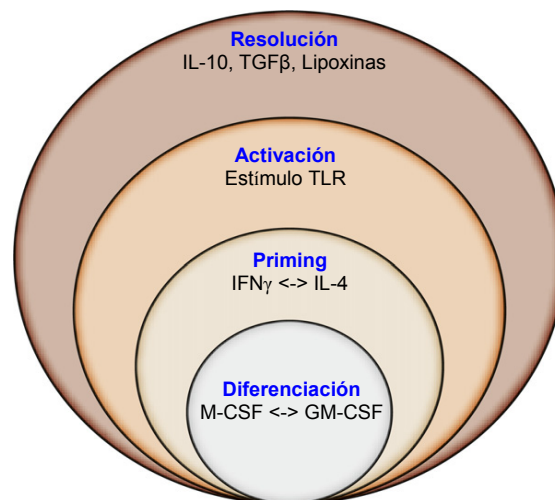


Figura 1.7 Paradigma de activación del macrófago: La activación plenamente funcional de macrófago le conduce a desarrollar diferentes papeles durante el proceso inflamatorio. Su fenotipo se establece por un complejo sistema de señalización en donde encontramos una gran multitud de citoquinas, metabolitos, proteínas plasmáticas, PAMPs y DAMPs. En este dibujo adaptado de Gordon y Martinez (2010) se resume de forma esquemática las fases más importantes del proceso de activación. Los procesos se esquematizan de forma jerárquica, donde una primera fase de diferenciación mediada principalmente por M-CSF y GM-CSF va a determinar diferencias sustanciales en el fenotipo de un macrófago maduro una vez se haya activado. La fase de cebado está influenciada por el contexto extracelular de citoquinas que aparecen en una determinada situación inmunológica. Así, en el contexto de una infección por parásitos, los elevados niveles de IL-4 propiciarán una activación alternativa. La activación plena del macrófago se produce por un estímulo inmunogénico y está mediada por los receptores de la inmunidad innata, como los TLRs o *scavenger*. Una vez se ha activado el macrófago, el perfil de citoquinas y su funcionalidad vendrán determinadas por los procesos anteriores de cebado y diferenciación. Cuando el proceso inflamatorio avanza, determinadas citoquinas, como el TGF- β o la IL-10 inducirán la desactivación del macrófago, permitiendo así la resolución de la inflamación y la vuelta a la homeostasis tisular. (Adaptado de Gordon and Martinez, 2010).

1.3.7 Los marcadores del fenotipo inmune en el macrófago

La base molecular de la heterogeneidad fenotípica y funcional del macrófago ha empezado a desvelarse mediante el análisis de los perfiles de expresión génica y de las funciones efectoras en diversas situaciones patológicas. Se han llevado a cabo un gran número de estudios para identificar marcadores fenotípicos claros capaces de distinguir una activación alternativa de una activación clásica. Al mismo tiempo, estos análisis han revelado diferencias muy significativas entre los perfiles de expresión de los macrófagos murinos y humanos. Este hecho genera una importante controversia, dado que existe la necesidad de validar marcadores alternativos en ambas especies y la extrapolación de resultados obtenida en modelos animales y humanos debe tomarse con cautela. Tal es el caso de la arginasa I o la quitinasa Ym1, los cuales no pueden considerarse un buen marcador de fenotipo alternativo en humano, pero sí en el ratón (Raes et al., 2005). Al mismo tiempo, existen marcadores específicos de activación alternativa en humanos que no se encuentran en el genoma murino, como es el caso de DC-SIGN (Puig-Kroger et al., 2004).

1.3.8 El papel de los neutrófilos en la isquemia cerebral

Como he comentado anteriormente, el daño isquémico se incrementa tras la respuesta inflamatoria, lo que implica una reacción local y un influjo de células sanguíneas reclutadas por citoquinas, moléculas de adhesión y quemoquinas (Jin et al., 2010). Entre estas células, los neutrófilos se movilizan desde la médula ósea permitiendo la respuesta efectiva de la inmunidad innata. A pesar de que como he comentado se han descrito diferentes patrones de infiltración para los neutrófilos, en general, se piensa que estas células se infiltran rápidamente al cerebro isquémico, a partir de las primeras horas tras la isquemia, alcanzando sus niveles de infiltración máxima entre los días 1 y 3 tras el establecimiento del infarto y disminuyendo su número con el paso del tiempo (Jin et al., 2010; Kriz, 2006).

Tabla 4: Marcadores empleados para la caracterización de las diferentes subpoblaciones de macrófagos

Marcador	Función	Expresión
Macrófagos M1		
IL-12	Induce el desarrollo de la respuesta Th1	Inducido por IFN γ
iNOS	Produce NO para matar microorganismos	Depende de IFN γ
CCL15	Atrae monocitos, linfocitos y eosinófilos	Sobreexpresión por IFN γ
CCL20	Atrae células dendríticas y células T	Sobreexpresión por IFN γ
CXCL9	Implicado en el tráfico de las células T	Inducido por IFN γ
CXCL10	Atrae células NK y células T a través de CXCR3	Inducido por IFN γ
CXCL11	Atrae células NK y células T a través de CXCR3	Inducido por IFN γ
Macrófagos M2		
CCL18	Atrae linfocitos, dendríticas inmaduras y monocitos	Inducido por IL-4
YM1	Unión a la matriz extracelular	Fuertemente inducido por IL-4
RELM α	Promueve deposición de la matriz extracelular	Fuertemente inducido por IL-4
CCL17	Atrae células T y macrófagos	Inducido por IL-4 y suprimido por IFN γ
Arginasa I	Contrarresta la actividad de la iNOS	Inducido por IL-4, también por LPS
IL-27R α	Inhibe la producción de citoquinas pro-inflamatorias	Sobreexpresión por IL-4
IGF1	Estimula la proliferación y supervivencia de fibroblastos	Inducido por IL-4
CCL22	Atrae células TH2 y otras células CCR4+	Inducido por IL-4
DCIR	Lectina tipo C que contiene un motivo ITIM	Inducido por IL-4
Estabilina 1	Receptor endocítico implicado en el <i>sorting</i> lisosomal	Inducido por IL-4
Factor XIII-A	Unión a matriz extracelular, contribuye a la cicatrización	Inducido por IL-4 y suprimido por IFN γ
DC-SIGN	Unión de carbohidratos y fagocitosis	Inducido por IL-4
CD206	Unión de carbohidratos y fagocitosis	Inducido por IL-4
Macrófagos de desactivación adquirida (M2C)		
IL-10	Potente citoquina antiinflamatoria	Inducido por TLRs junto a otros estímulos
SPHK1	Cataliza la fosforilación de la esfingosina	Inducido por TLRs y complejos inmunes
LIGHT	Promueve señales coestimuladoras en células T	Inducido por TLRs y complejos inmunes
CCL1	Atrae eosinófilos y células TH2	Inducido por TLRs junto a otros estímulos
Antígenos compartidos entre macrófagos M2 y de desactivación adquirida		
CD36	Receptor <i>scavenger</i> , fagocitosis	Inducido por IL-4 y LDL oxidado
CD163	Limpieza de la hemoglobina/haptohemoglobina	Inducido por IL10, glucocorticoides o junto IL-4
IL1ra	Inhibe la función de la IL-1	Inducido por IL-4 e IL-10

Sólo empleados como marcadores en humanos; Sólo empleados como marcadores en ratón.

*Adaptado de (Colton, 2009; Mantovani et al., 2005; Mosser and Edwards, 2008)

La infiltración de los neutrófilos al cerebro isquémico se ha asociado con un incremento del daño tisular debido a varios mecanismos inflamatorios, como adhesión al endotelio, generación de EROs o secreción de proteasas (Segel et al., 2011). Aun así, la contribución exacta de estas células al daño isquémico

continúa siendo objeto de debate. Un creciente número de estudios han comenzado a indicar que los neutrófilos presentan una funcionalidad heterogénea *in vivo* y una capacidad para cambiar su fenotipo *in vitro* tras su exposición a citoquinas (Mantovani et al., 2011). Estas evidencias indican que los neutrófilos son capaces de responder a estímulos extracelulares dependiendo del contexto en el que se encuentren (al-Essa et al., 1995; Chakravarti et al., 2009; Puellmann et al., 2006), por lo tanto, al igual que ocurre en macrófagos, determinados estímulos son capaces de inducir en los neutrófilos la expresión de distintos fenotipos. En este contexto, ya se ha descrito la existencia de neutrófilos asociados a tumores, con capacidad pro-tumorigénica, inducidos por TGF- β y con una expresión de citoquinas y marcadores específicos (Fridlender et al., 2009). En el campo de la isquemia cerebral, la contribución de los distintos fenotipos de neutrófilos al daño isquémico no se ha estudiado.

4 El Receptor Activado por Proliferadores de Peroxisomas Gamma: PPAR γ

Los receptores activados por proliferadores de peroxisomas (PPARs, peroxisome proliferator-activated receptors) pertenecen a la superfamilia de receptores nucleares. Sus funciones biológicas son muchas y variadas; abarcan desde el metabolismo de lípidos e hidratos de carbono o la proliferación y diferenciación celular, hasta la implantación y maduración del feto en mamíferos. Su localización tisular varía en función de la isoforma. PPAR α se localiza principalmente en hígado, corazón, músculo estriado, riñón y endotelio, mientras que PPAR β/δ se considera ubicuo, expresándose mayoritariamente en intestino, riñón y corazón. En cuanto a PPAR γ , existe constancia de que se expresa prácticamente en todas partes: cerebro, epitelio intestinal (Lambe and Tugwood, 1996), los distintos componentes del sistema inmunitario, la retina, músculo esquelético e hígado entre otros, aunque se

localiza principalmente en tejido adiposo, donde lleva a cabo uno de sus papeles más relevantes, el control del metabolismo lipídico (Dreyer et al., 1992).

Se ha descrito un gran número de ligandos de PPAR γ . Entre los ligandos endógenos destacan los prostanoides, en concreto, 15dPGJ2 (15-deoxi- Δ 12,14-prostaglandina J2) (Forman et al., 1995). Otros ligandos son las formas oxidadas de lipoproteínas de baja densidad (Nagy et al., 1998) y de esteroides (Gottlicher et al., 1992). También se han encontrado agonistas PPAR γ entre los metabolitos de lipoxigenación de ácidos grasos insaturados como linoleico, linolénico y araquidónico (Forman et al., 1997). Es importante destacar que otros mediadores lipídicos ejercen un agonismo indirecto al ser fuentes de producción de ligandos endógenos, como el ácido araquidónico, del que deriva 15dPGJ2, o el ácido linoleico. Ambos ácidos grasos se liberan de las membranas por acción de la fosfolipasa A2 (PLA2) ante diversos estímulos como la isquemia.

Además de los ligandos endógenos, se han sintetizado numerosos compuestos que actúan como agonistas PPAR γ . Destacan las tiazolidindionas (TZDs) o glitazonas, que son los primeros fármacos agonistas PPAR γ desarrollados y que se han usado para el tratamiento de la diabetes mellitus tipo II por su acción sensibilizadora a la glucemia en tejidos periféricos y por aumentar la expresión en membrana del transportador Glut-4 de glucosa (Hauer, 2002). Los principales representantes de las TZDs son rosiglitazona, pioglitazona y ciglitazona (Tugwood et al., 1996). Además de las glitazonas, existen otros agonistas sintéticos que derivan del ácido fenilacético: L-796,449; L-783,483 y L-165,461. Su naturaleza química es radicalmente distinta de la de otros agonistas PPAR γ como rosiglitazona y 15dPGJ2, y son capaces de activar el receptor en el rango de concentración nanomolar; de ellos, el más potente es L-796,449.

No se conocen ligandos antagonistas endógenos de PPAR γ , aunque su actividad transcripcional está inhibida por la unión de moléculas correpresoras. Sin embargo, existen antagonistas sintéticos. Algunos de ellos no son específicos para PPAR γ , y otros poseen cierta actividad agonista parcial. Los

más potentes y selectivos hoy en día son T0070907 (Lee et al., 2002) y GW9662 (Gupta et al., 2001), aunque este último, a altas concentraciones, también inhibe la actividad de PPAR α y PPAR β .

Los receptores nucleares, y en concreto PPAR γ , se encuentran en el núcleo de manera constitutiva e inactiva, formando un complejo con moléculas correpresoras con actividad deacetilasa de histonas (HDAC). Las moléculas correpresoras impiden la activación de PPAR γ , mientras que las HDACs mantienen la cromatina circundante condensada, inhibiendo la transcripción génica (McKenna and O'Malley, 2002). PPAR γ induce la transcripción de sus genes diana cuando el ligando agonista se une al receptor. Una vez activado, los correpresores se disocian del complejo y se acoplan moléculas coactivadoras. Todo ello se acopla al sistema natural de transcripción iniciando la transcripción génica a partir de los elementos de respuesta a PPAR, o PPREs. Para que PPAR γ sea activo como factor de transcripción debe, no sólo acoplar un ligando agonista a su estructura, sino también formar un dímero con el receptor del ácido retinoico (RXR) (Figura 1.8) (Kodera et al., 2000).

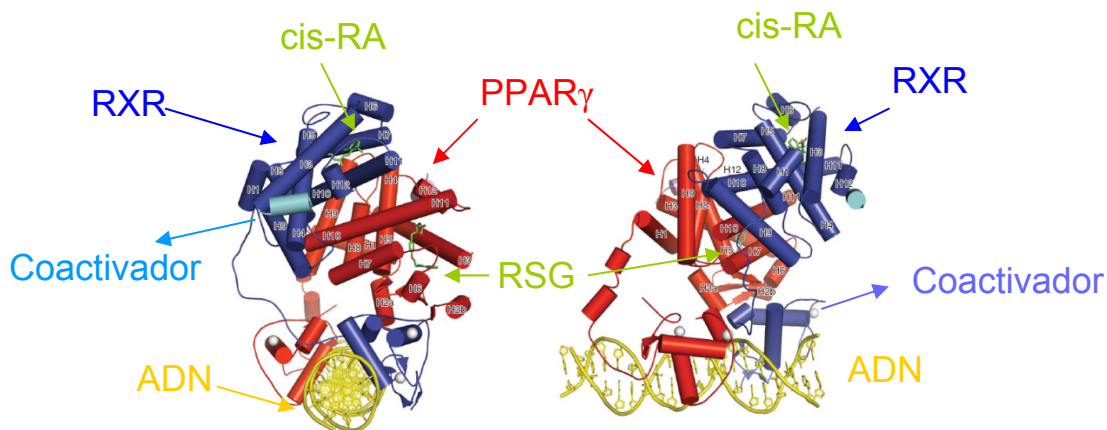


Figura 1.8 Estructura cristalográfica del complejo PPAR γ -RXR: En esta vista ortogonal se muestra al complejo PPAR γ -RXR transcripcionalmente activo. Aquí, los ligandos rosiglitazona y ácido cis-retinoico (en verde) están unidos a sus receptores. El complejo lleva asociado una serie de coactivadores y su unión al DNA se produce en los elementos de respuesta para PPAR γ (PPRE). (Adaptado de Chandra et al., 2008).

1.4.1 PPAR γ y la modulación inmune

La expresión de PPAR γ en macrófagos humanos y murinos fue descrita por primera vez en 1998 por tres grupos de investigación diferentes (Jiang et al., 1998; Ricote et al., 1998; Tontonoz et al., 1998). Este hecho condujo a una intensa investigación sobre el papel de este receptor en la regulación de la activación y el metabolismo del macrófago. Los estudios iniciales llevados a cabo por los laboratorios de Glass y Seed indicaban que la activación farmacológica de PPAR γ atenuaba la expresión de moléculas pro-inflamatorias como IL-1 β , TNF- α e IL-6 en estas células. Un estudio más exhaustivo de este mecanismo mostró que PPAR γ tiene un efecto represor sobre diversos factores de transcripción, como NF- κ B (por interacción con p50 y p65) (Chung et al., 2000), AP-1 (al interactuar con c-Jun) (Subbaramaiah et al., 2001; Wang et al., 2002) y STAT1 (Daynes and Jones, 2002). Al activarse, PPAR γ “secuestra” los coactivadores presentes en el núcleo, de tal manera que estos no están disponibles para otros factores de transcripción. Este método de inhibición se conoce como **trans-represión transcripcional** (Figura 1.9). Además puede interactuar físicamente con otros factores de transcripción (por ejemplo con la subunidad RelA/p65 de NF κ B) impidiendo su funcionamiento: este fenómeno se conoce como **acoplamiento cruzado**. Así, la activación de PPAR γ tiene la capacidad de inhibir la actividad de factores de transcripción implicados en la inflamación, disminuyendo la expresión de sus genes diana que comprenden citoquinas y sus receptores, moléculas de adhesión y enzimas inducibles.

Además de atenuar la activación M1 del macrófago, las propiedades inmunomoduladoras del receptor PPAR γ tienen un papel en la polarización M2 (Figura 1.9). Fue también el grupo de Glass quien observó que PPAR γ se inducía fuertemente por la IL-4 (Huang et al., 1999). Tras este descubrimiento, la familia de receptores PPAR ha sido objeto de estudio importante en el campo de la polarización del macrófago (Chawla, 2010). Ahora sabemos que la unión de IL-4 o IL-13 a sus receptores IL-4R α /IL-2R γ c o IL-13R α 1/IL-4R α , respectivamente, inicia una cascada de señalización citoplasmática que culmina en la fosforilación del factor de transcripción STAT6 (Signal transducer

and activator of transcription 6) (Martinez et al., 2009). Como consecuencia, STAT6 dimeriza y se transloca al núcleo donde induce la expresión de sus genes diana, incluyendo los marcadores alternativos arginasa I, CD206, Ym1 y Fizz1 y reguladores de la activación alternativa como PPAR γ , PPAR δ o PGC-1 β . De manera sinérgica, la activación de PPAR γ inducirá en el macrófago la expresión de marcadores M2, tales como arginasa I, CD36 o CD206 (Odegaard et al., 2007).

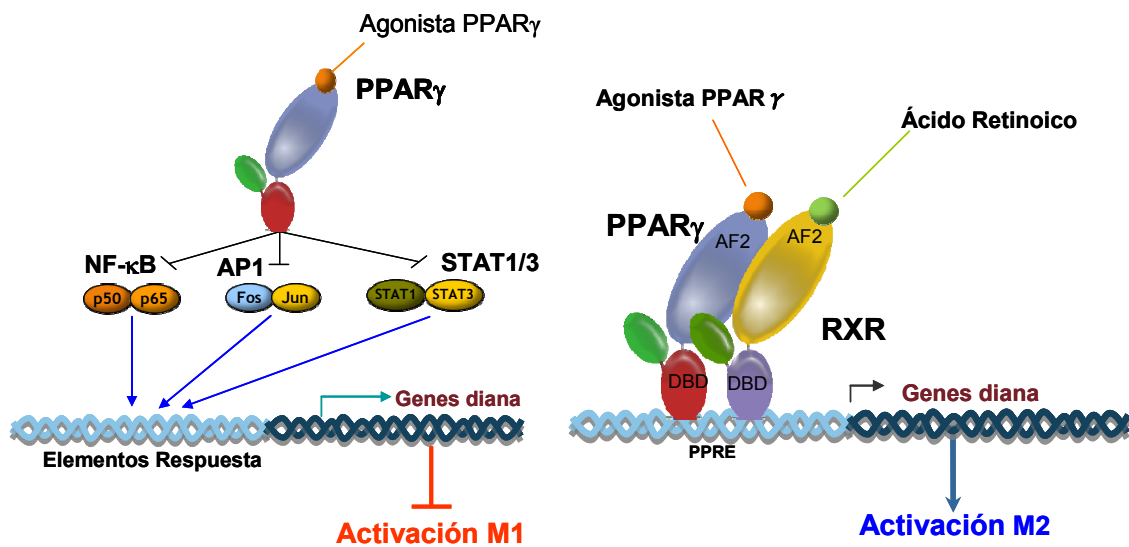


Figura 1.9 Implicación del receptor PPAR γ en la modulación inmune del macrófago: La habilidad de PPAR γ para inhibir la expresión de genes pro-inflamatorios derivada de su efecto transrepositor sobre diferentes factores de transcripción (NF κ B, AP-1, STAT1/3) se combina con su capacidad para activar la expresión de marcadores M2, como CD36, CD206 y arginasa I.

La habilidad de las células inmunes para llevar a cabo sus funciones efectoras está estrechamente unida y controlada por su estado metabólico. Así, hace ya un siglo, se observó que la glucólisis anaerobia es necesaria para mantener el programa microbicida de los macrófagos M1 (Levene, 1912), el cual está regulado transcripcionalmente por el Factor Inducible por Hipoxia 1 α (HIF-1 α) (Cramer et al., 2003). Estas observaciones sugerían que el metabolismo aerobio podría estar implicado en el mantenimiento de la activación alternativa del macrófago. Así, una serie de estudios demostraron que la estimulación del macrófago con IL-4 era capaz de inducir la captación y oxigenación de los ácidos grasos y la biogénesis mitocondrial (Odegaard et al.,

2007; Vats et al., 2006). Estos procesos están transcripcionalmente controlados por PPAR γ y su proteína coactivadora PGC-1 β en el macrófago. De este modo, el control de la cascada metabólica y de los reguladores del metabolismo oxidativo por IL-4 y STAT6 convierte a este metabolismo en un componente importante de la activación alternativa. Por lo tanto, la adquisición y el mantenimiento de un fenotipo M2 requiere de la regulación metabólica de PPAR γ . Este hecho se pone de manifiesto en el estudio con macrófagos PPAR $\gamma^{-/-}$, donde la imposibilidad de mantener un correcto metabolismo oxidativo comprometía la expresión de un fenotipo M2 (Chawla, 2010).

Además de la activación alternativa, estudios recientes han demostrado la implicación de los receptores nucleares PPAR δ y LXR (Liver X Receptor) en el proceso de desactivación adquirida tras la fagocitosis de células apoptóticas (Gonzalez et al., 2009; Mukundan et al., 2009). De hecho, se considera que la función de estos receptores es actuar como un sensor de células apoptóticas, coordinando la limpieza de estas células y suprimiendo la autorreactividad de la respuesta inmunológica. La adquisición mediada por PPAR γ de este fenotipo en el macrófago está aún poco explorada, pero muchas evidencias indican que su activación tiene un efecto importante en la fagocitosis. De hecho, PPAR γ es necesario para una eliminación efectiva de los neutrófilos y su activación se ha visto asociada a un incremento de la fagocitosis (Fernandez-Boyanapalli et al., 2009; Zhao et al., 2009a).

Por otra parte, la contribución del receptor PPAR γ a la polarización de los neutrófilos nunca ha sido estudiada, pero la expresión constitutiva de este receptor en los neutrófilos y su inducción tras la exposición a citoquinas en estas células sugiere un papel de PPAR γ en la polarización de estas células.

1.4.2 PPAR γ en la isquemia cerebral

Aunque el estudio del control de la inflamación modulado por estos receptores ha sido bastante intenso, las aplicaciones terapéuticas de los

agonistas PPAR en la regulación inmune continúa siendo una asignatura pendiente para la clínica. Los tejidos periféricos se han considerado inicialmente como el lugar de acción de PPAR γ , si bien hoy en día existen evidencias de que ejercen una actividad no despreciable en el cerebro. En este sentido, la mayor parte del trabajo se ha centrado en el aspecto anti-inflamatorio de PPAR γ (Daynes and Jones, 2002).

Los ligandos PPAR γ se presentan como importantes reguladores de la fisiología cerebral, constituyendo dianas en potencia para enfocar estrategias terapéuticas. Han demostrado efectos beneficiosos en modelos experimentales de enfermedades que cursan con neuroinflamación, como los de enfermedad de Alzheimer (Heneka et al., 1999), neuropatías autoinmunes (Diab et al., 2002; Feinstein et al., 2002) y enfermedad de Parkinson (Breidert et al., 2002).

En el campo de la isquemia cerebral, los agonistas PPAR γ han mostrado ejercer un efecto neuroprotector. Diferentes estudios, entre los que se encuentran trabajos de nuestro grupo de investigación, indican que diferentes agonistas de PPAR γ , a diferentes dosis y empleando diferentes ventanas terapéuticas, son capaces de reducir el volumen de infarto en modelos de isquemia cerebral en roedores (Tabla 1.5).

Muchos de estos estudios han concluido que las acciones anti-inflamatorias del receptor PPAR γ son las responsables de su efecto neuroprotector. Así, la inhibición de la expresión de mediadores pro-inflamatorios, de moléculas de adhesión y de la infiltración de células inmunes circulantes sería capaz de reducir el daño secundario derivado del proceso inflamatorio que se produce en la isquemia cerebral. De todos estos estudios podemos concluir que la activación de PPAR γ es una manera eficaz de atenuar la fase M1 inicial del proceso inflamatorio. En cualquier caso, si tenemos en cuenta lo expuesto anteriormente, la modulación del proceso inflamatorio y la polarización del macrófago hacia un fenotipo menos dañino y pro-resolutivo requeriría un enfoque más holístico de las acciones neuroprotectoras que ejerce este receptor tras la isquemia cerebral. Este enfoque, aun poco abordado, comprende el objeto de estudio de la presente tesis doctoral.

Tabla 5: Estudios de neuroprotección de agonistas PPAR γ en modelos animales de isquemia

Autor	Modelo	Agonista PPAR γ	Protocolo de Administración	Efecto Neuroprotector	Mecanismo
(Sundararajan et al., 2005)	2h tMCAO en ratas Wistar	Troglitazona (10-70mg/kg), pioglitazona (1 mg/kg) ip	- 24 y 0 h antes de MCAO - 1 h después MCAO	↓volumen infarto 24h y 22d ↑función neurológica	↓microglía/macrófago ↓IL-1 β , COX2, iNOS
(Shimazu et al., 2005)	90 min tMCAO en ratas S.D.	Pioglitazona oral	- varias administraciones comienza 72h antes de MCAO	↓volumen de infarto 24h	↑Cu,Zn-SOD
(Zhao et al., 2006)	90 min tMCAO en ratas	Pioglitazona i.c.v.	- Comenzando 5 días antes y hasta 2 días después de MCAO	↓volumen infarto, edema ↑función neurológica	↓microglía/macrófago
(Pereira et al., 2005)	pMCAO en ratas Fischer	L-796,449 (1-3 mg/kg) i.p.	- 10 minutos después de MCAO	↓volumen infarto a 2, 7d ↑función neurológica	↓iNOS, MMP9, vía Nf κ B, ↑HO-1 ↓actividad caspasa3
(Allahtavakoli et al., 2006)	Embolico MCAO en ratas	Rosiglitazona i.p. (0.3-3 mg/kg)	1h antes o 1h antes y 0 o 4h después MCAO	↓volumen infarto a 48h ↑función neurológica	
(Collino et al., 2006)	30 min CCAO en ratas Wistar	Rosi & pioglitazona (1-6 mg/kg i.v.)	30 min antes de MCAO		↓estrés oxidativo, COX2, activación de MAPKs yNF κ B
(Chu et al., 2006)	90 min tMCAO ratas S.D.	Rosiglitazona oral	7d antes hasta 3d después de MCAO	↓volumen de infarto 24h ↑recuperación funcional	↑angiogénesis ↓infiltración, apoptosis
(Lin et al., 2006)	30-50 min tMCAO en ratas L.E.	15dPGJ2 i.c.v.	-24 h antes de MCAO	↓volumen infarto	↓actividad caspasa 3 ↑niveles dePPAR γ
(Luo et al., 2006)	90 min tMCAO en ratones C57/B6	Rosiglitazona 3-12mg/kg i.p.	1h antes o 2 h después MCAO	↓volumen de infarto a 48h ↑función neurológica	↓infiltración neutrófilos, citoquinas y quemoquinas
(Ou et al., 2006)	180 min tMCAO en ratas L.E.	15dPGJ2 i.c.v.	15 min antes MCAO o 15 min después de reperusión	↓volumen de infarto a 24h	↑unión PPAR γ -DNA
(Pereira et al., 2006)	pMCAO en ratas Fischer	Rosiglitazona (1-3 mg/kg), 15dPGJ2 (1-3 mg/kg)	10 min o 2h después de MCAO	↓volumen de infarto a 48h ↑función neurológica	↓iNOS, MMP9, vía NF κ B ↑niveles de PPAR γ . Diferentes perfiles de expresión
(Victor et al., 2006)	90 min tMCAO en ratones C57/B6	Rosiglitazona (3-12 mg/kg) i.p.	1-2h después MCAO	↓volumen de infarto a 48h ↑función neurológica	↑unión PPAR γ -DNA
(Tureyen et al., 2007)	tMCAO en ratones normales, hipertensos y diabéticos	Rosiglitazona, pioglitazona, 15dPGJ2	4h antes hasta 6h después de MCAO	↓volumen de infarto a 3d ↑función neurológica	↓ICAM1, extravasación de leucocitos, IL1 β , IL6, MIP1 α , MCP1, COX2, iNOS, EGR1, CEBP β ↑catalasa, CuZnSOD
(Nakamura et al., 2007)	Ratas Stroke-prone	Pioglitazona (oral 1mg/kg día)	4 semanas	↓signos de comienzo de infarto y muerte	↓disfunción vascular, infiltración macrófagos, MCP1, TNF α
(Lee et al., 2008)	20 min isquemia global en ratones C57BI/6	Pioglitazona oral (40 mg/kg/day)	3 días antes hasta 3 días después	↓daño neuronal CA1, CA2, TUNEL	↓MMP9

MCAO: Oclusión de la arteria cerebral media; tMCAO: Oclusión transitoria de la cerebral media; pMCAO: Oclusión permanente de la cerebral media; CCAA: Oclusión de la arteria carótida común; S.D.: Sprague-Dawley; L.E.: Long Evans; i.p.: intraperitoneal; i.c.v.: intracerebroventricular; i.v.: intravenoso; COX-2: ciclooxigenasa 2; iNOS: sintasa inducible de óxido nítrico; HO-1: Hemoxigenasa 1; SOD: Superóxido dismutasa.

1.5 Las lipoxigenasas

Las lipoxigenasas, junto con las ciclooxigenasas y las epoxigenasas, constituyen el principal sistema enzimático celular en el metabolismo del ácido araquidónico (AA). Son una familia de enzimas que catalizan reacciones de oxigenación de ácidos grasos insaturados. En función de la posición del carbono del ácido graso sobre el que actúan, se distinguen tres tipos de lipoxigenasas en mamíferos, 5-, 12- y 15-lipoxigenasa, siendo la más importante la 5-lipoxigenasa (5-LO). Los metabolitos del sistema enzimático de las LOs son muchos y de características variadas. El metabolismo de 5-LO sobre el AA da lugar a un hidroperóxido inestable, el ácido 5-HPETE (5-hidroperoxieicosatetraenoico) que, por medio de 5-LO o de manera espontánea, da lugar a 5-HETE (ácido 5-hidroxeicosatetraenoico). Utilizando como sustrato 5-HETE, la 5-LO es capaz de sintetizar un producto intermedio inestable (un epóxido) que se denomina leucotrieno A₄ (LTA₄). A partir de este compuesto, se generan 3 tipos de productos que darán lugar a tres tipos de respuestas celulares distintas: el leucotrieno B₄ (LTB₄), los cisteinil-leucotrienos (cys-LTs) y las lipoxinas A₄ y B₄ (LXA₄, LXB₄) (Serhan and Levy, 2003).

LTB₄ es un conocido compuesto inflamatorio contra el que se han dirigido numerosas estrategias terapéuticas. Sus características principales son la capacidad de promover la quimiotaxis, la degranulación de leucocitos y la generación de superóxido en leucocitos polimorfonucleares actuando a través de receptores específicos de membrana. Por sí mismo, el LTB₄ es capaz de iniciar la respuesta inflamatoria y producir edema. Los cys-LTs, por su parte, forman en conjunto la sustancia de reacción lenta de la anafilaxia; son mediadores lentos de la inflamación al inducir una respuesta más fuerte y persistente.

En cuanto a las lipoxinas, estos mediadores ejercen un efecto contrario al LTB₄, contrarrestando los efectos de mediadores pro-inflamatorios donde se incluyen citoquinas. Tienen gran importancia en la resolución de la inflamación (Fierro and Serhan, 2001) y promueven la reparación en tejidos dañados. Al contrario que LTB₄, inhiben el reclutamiento de neutrófilos y facilitan la

resolución de la inflamación bloqueando la formación de anión superóxido y modulando la expresión de moléculas de adhesión (Chiang et al., 2000). Se ha visto que, en leucocitos humanos, las lipoxinas inhiben la formación de peroxinitrito, la actividad de los factores nucleares NF- κ B y AP-1 y la expresión del gen que codifica para IL-8 (Jozsef et al., 2002). Además de las lipoxinas, el metabolismo de 5-LO y otras LOs sobre ácidos grasos distintos del AA dan lugar a múltiples compuestos con una gran capacidad de resolver la inflamación, por lo que a algunos de ellos se les denominó resolvinas (Figura 1.10)

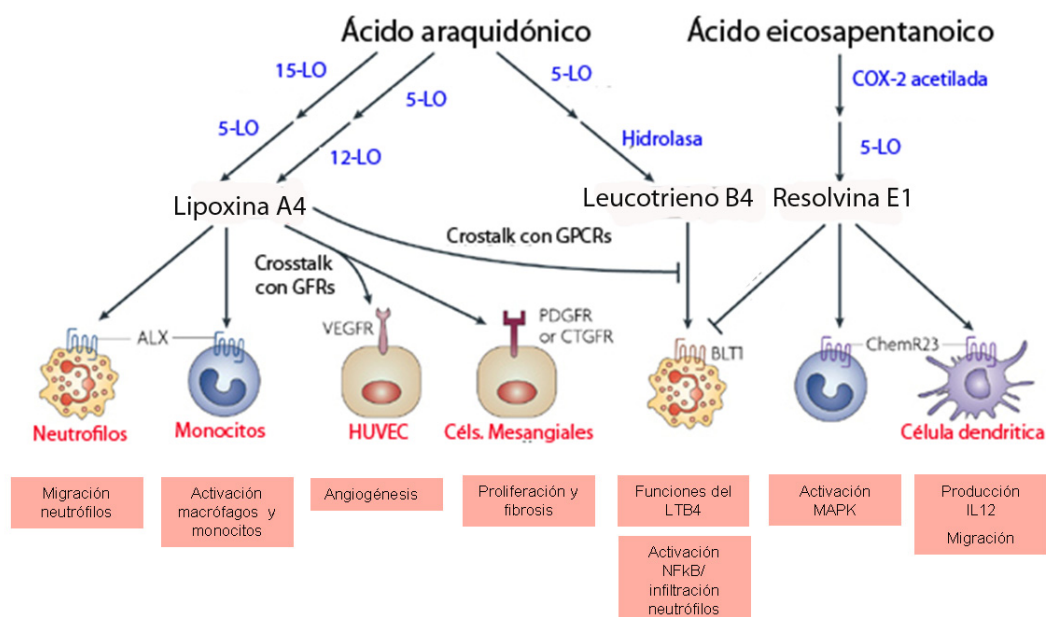


Figura 1.10 Implicación de las lipoxigenasas en la síntesis de LXA₄ y Resolvinas E1: Existen dos principales mecanismos clásicos para la generación de lipoxinas mediados por lipoxigenasa. El primero es la vía 5-LO-12-LO de neutrófilos y plaquetas en la vasculatura. El otro es la vía 15-LO-5-LO mediado por células epiteliales y neutrófilos en la superficie de las mucosas. La acción de la lipoxina *in vivo* se debe a sus interacciones con receptores acoplados a proteínas G (GPCRs) y receptores de factores de crecimiento. La activación directa del receptor de lipoxinas (ALX) por la lipoxina A₄ es una señal específica del tipo celular donde se induce. Así, en neutrófilos, inhibe su migración mientras que estimula la activación de monocitos y macrófagos. La inhibición indirecta, *vía* intercomunicación con receptores GPCR (por ejemplo, el receptor de leucotrieno B₄ o BLT1) o receptores de factores de crecimiento (VEGFR; PDGFR; CTGFR) mediada por LXA₄ reduce la angiogénesis en células HUVEC y la proliferación y fibrosis de las células mesangiales. Para la generación de resolvinas E1, la COX-2 del endotelio vascular acetilada por aspirina genera 18-HPEPE, que es convertido en el leucocito en resolvinas E1 por la acción de la 5-LO. La resolvinas E1 interactúan de manera directa con al menos dos GPCRs. La resolvinas E1 activa ChemR23, que se expresa en monocitos y células dendríticas e inhibe la expresión de BLT1. (Adaptado de Serhan et al., 2008).

1.5.1 Implicación de 5-lipoxigenasa en la neuroprotección mediada por PPAR γ en isquemia cerebral

Recientemente, el grupo de investigación en el que trabajo ha publicado un estudio en el que describimos que las acciones neuroprotectoras derivadas de RSG son concomitantes a una inducción de 5-LO en el cerebro isquémico de ratas (Pereira et al., 2006). Tras este hallazgo, se conformó una línea de investigación destinada a caracterizar la implicación de 5-LO en los efectos que media PPAR γ en neuroprotección. Algunos de los resultados previos obtenidos comprenden los antecedentes que constituyen el punto de partida del trabajo experimental que he desarrollado en esta tesis doctoral. Estos antecedentes experimentales indican que la actividad 5-LO está implicada en la neuroprotección mediada por RSG en ratas (Figura 1.11). Así, la inhibición de la actividad 5-LO empleando su inhibidor específico BWA4C elimina el efecto neuroprotector que induce RSG en isquemia experimental en rata (Sobrado et al., 2009). Esta acción implica a los productos de 5-LO en la neuroprotección mediada por el agonista PPAR γ .

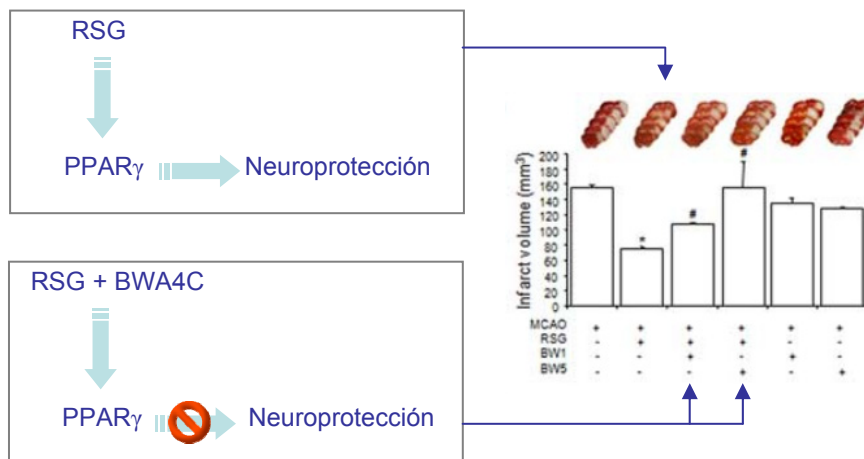


Figura 1.11 Efecto de 5-LO en la neuroprotección por RSG. En este esquema se muestra que la disminución en el volumen de infarto que induce RSG depende de la actividad 5-LO. El gráfico muestra los volúmenes de infarto en mm³ obtenidos en ratas Wistar sometidas a MCAO y tratadas con vehículo, RSG, BWA4C (BW1: 1mg/kg; BW5: 5mg/kg) o una combinación de RSG y BWA4C. (Adaptado de Sobrado et al., 2009)

Además de la dependencia de la actividad 5-LO en la neuroprotección mediada por RSG, los antecedentes experimentales obtenidos por mi grupo de investigación mostraron que RSG induce un cambio en la actividad metabólica de 5-LO destinado a la producción preferencial de LXA₄ (Figura 1.12). De este modo, el análisis de los principales productos metabólicos de 5-LO, LTB₄ y LXA₄, indica que la isquemia induce un incremento de los niveles de LTB₄ en el cerebro y que el tratamiento con RSG disminuye estos niveles a la vez que induce un incremento en los niveles de LXA₄ por un mecanismo mediado por 5-LO (Sobrado et al., 2009).

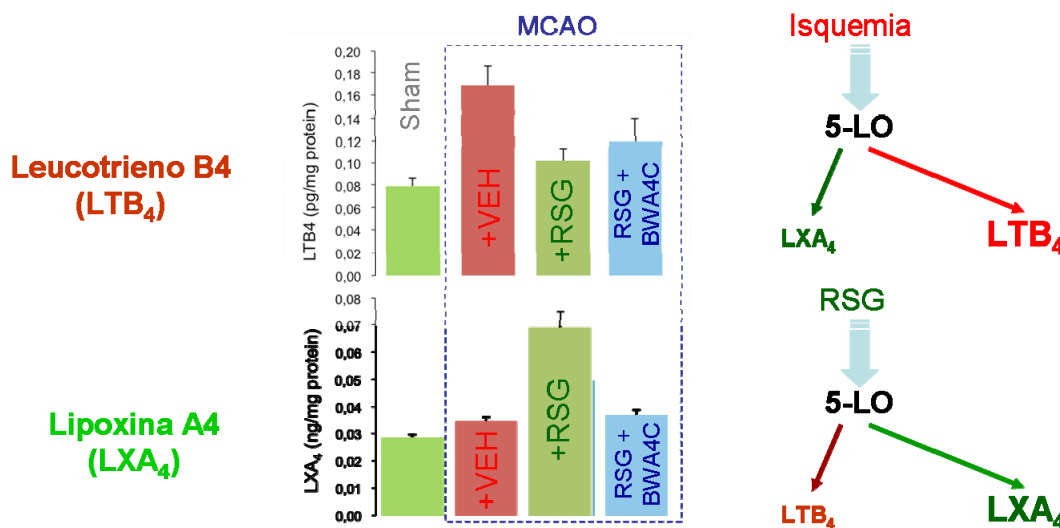


Figura 1.12 RSG modifica la actividad metabólica de 5-LO incrementando la producción de LXA₄. El agonista de PPAR_γ RSG produce un cambio en la actividad 5-LO destinado a la producción preferencial de LXA₄ y a la disminución de la síntesis de LTB₄. Los gráficos muestran los niveles de LTB₄ y LXA₄ encontrados en el cerebro de ratas sham o isquémicas tratadas con vehículo, RSG, o una combinación de RSG y BWA4C. (Adaptado de Sobrado et al., 2009)

Finalmente, resultados obtenidos en núcleos aislados de la corteza cerebral de rata sugieren que LXA₄ actúa como agonista PPAR_γ, ya que este producto de 5-LO es capaz de incrementar la actividad transcripcional del receptor al igual que lo hace RSG (Figura 1.13) (Sobrado et al., 2009). Estos resultados nos llevaron a establecer un modelo en el que sugerimos que la neuroprotección que media la activación de PPAR_γ por RSG depende de la síntesis de LXA₄ por 5-LO. Los resultados de este trabajo sugieren que RSG

podría ejercer un agonismo indirecto sobre PPAR γ , y que los metabolitos de 5-LO podrían mediar una activación sostenida de este receptor conduciendo a la neuroprotección.

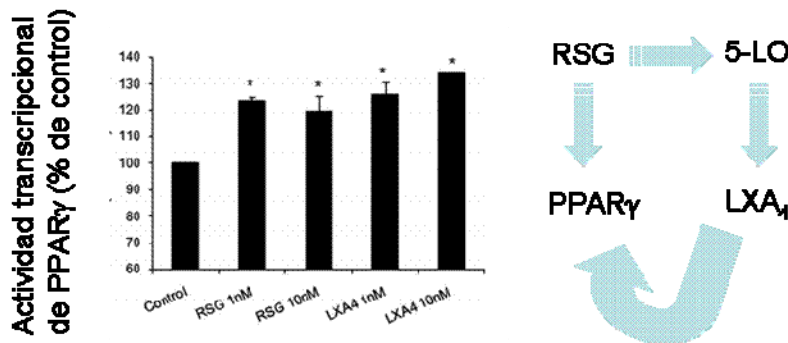


Figura 1.13 Modelo de activación de PPAR γ mediada por 5-LO. LXA $_4$ actúa como un agonista de PPAR γ incrementando su actividad transcripcional. Su producción se induce por la acción de RSG sobre 5-LO, conformando a RSG como un inductor de la producción de agonistas endógenos de PPAR γ . La gráfica muestra el incremento de la actividad transcripcional de PPAR γ en núcleos aislados de cerebros de rata tratados con RSG y LXA $_4$.

En el contexto de la neuroprotección por agonistas PPAR γ en isquemia cerebral, todos los trabajos realizados apuntan a los efectos anti-inflamatorios mediados por la activación del receptor como los responsables de la neuroprotección (Ver tabla 1.5). De hecho, la profunda implicación de PPAR γ en la modulación del fenotipo del macrófago indica que su activación en un contexto pro-inflamatorio, como es el caso de la isquemia cerebral, podría mediar la resolución de la inflamación y la vuelta a la homeostasis tisular (Chawla, 2010). Así, la implicación de 5-LO en las acciones neuroprotectoras de los agonistas PPAR γ requiere del estudio y caracterización de la influencia de esta enzima en la modulación inmune mediada por PPAR γ . Estas propiedades comprenden tanto la transrepresión de mediadores pro-inflamatorios, como la inhibición de la infiltración o la eliminación de restos celulares. En este punto, el papel clave que juega PPAR γ en la polarización M2 de macrófagos (Chawla, 2010) sugiere que RSG, por activación de PPAR γ , puede inducir una polarización M2 en isquemia. En este contexto, se desconoce si 5-LO pudiera estar implicada en los efectos descritos.

II Hipótesis y objetivos

Hipótesis

El efecto neuroprotector e inmunomodulador de PPAR γ en isquemia cerebral experimental es dependiente de la enzima 5-LO, cuya actividad metabólica es necesaria tanto para la polarización M2 de las células inmunes como para la resolución de la inflamación.

2.2 Objetivos

Los objetivos planteados para demostrar la hipótesis son:

A) Estudio de la implicación de 5-LO en los efectos antiinflamatorios de PPAR γ en la isquemia cerebral: inhibición de la activación clásica o M1

1- Caracterización de RSG como agonista PPAR γ

2- Estudio del papel de 5-LO en la inhibición de la activación M1 inducida por RSG en isquemia cerebral en rata

3- Estudio del efecto del agonista de PPAR γ RSG sobre la expresión de la 5-LO tras isquemia cerebral en rata

B) Estudio de la activación alternativa o M2 en la isquemia cerebral experimental y del papel de la vía PPAR γ -5-LO en este proceso

1- Estudio del papel de 5-LO en la neuroprotección inducida por RSG en la isquemia cerebral experimental en ratón

2- Análisis de la expresión celular de 5-LO en isquemia cerebral experimental en ratón. Efecto de PPAR γ

3- Estudio del papel de 5-LO en la expresión y señalización de PPAR γ en isquemia cerebral experimental en ratón

4- Estudio de los niveles del producto de 5-LO LXA $_4$ en isquemia cerebral experimental en ratón. Efecto de PPAR γ

5- Estudio de la activación alternativa o M2 en el cerebro de ratón: efecto de la isquemia y de la vía PPAR γ -5-LO

6- Análisis de la localización celular de marcadores M2 en el cerebro isquémico en ratón

7- Caracterización de la fagocitosis de neutrófilos por microglía /macrófagos en isquemia cerebral en ratón. Efecto de la vía PPAR γ -5-LO

C) Efecto del producto de 5-LO LXA $_4$ en neuroprotección y activación M2

1-Estudio del efecto neuroprotector de LXA $_4$ en isquemia cerebral experimental en rata

2- Caracterización de la producción de LXA $_4$ *in vitro*

3- Estudio *in vitro* del efecto de LXA $_4$ en la activación M2 y en la función fagocítica de macrófagos

III Material y métodos

3.1 Materiales

Para nuestro estudio empleamos los siguientes compuestos: como agonista específico de PPAR γ utilizamos maleato de rosiglitazona (RSG) (Alexis); como metabolito de la 5-LO, LXA $_4$ (Ácido 5S,6R,15S-trihidroxi-7,9,13-*trans*- 11-*cis*-eicosatetraenoico; Calbiochem); como inhibidor específico de la 5-LO, BWA4C (Sigma); como antagonista específico de PPAR γ , T0070907 (Cayman Chemical); LPS (Sigma) y M-SCF (Gibco).

3.2 Diseño del protocolo experimental

3.2.1 Estudios *in vivo*

-Animales

Se utilizaron ratones macho adultos C57BL/6 de 8 a 10 semanas de edad. Adicionalmente se utilizó un grupo de ratones deficientes para la enzima 5-lipoxigenasa (B6;129S2-Alox5^{tm1F un} /J; 5-LO $^{-/-}$) junto con sus correspondientes controles salvajes obtenidos de los laboratorios Jackson (Bar Harbor, Maine, USA).

Para estudios sobre la expresión de 5-LO, su implicación en la inhibición de marcadores pro-inflamatorios mediada por RSG y la neuroprotección inducida por LXA $_4$, se utilizaron ratas Wistar macho adultas de un peso aproximado de 250 gramos (Harlan Ibérica).

Todos los protocolos experimentales se rigieron bajo las guías de experimentación animal del Comité de la Universidad Complutense de Madrid

(directivas de la UE 86/609/CEE y 2003/65/CE). Los animales se estabularon en jaulas individuales y se mantuvieron en condiciones estándar de temperatura y humedad, libre acceso a comida y agua, y ciclo de luz/oscuridad de doce horas (comenzando el periodo de luz a las 08:00 horas).

-Modelo de isquemia experimental por Oclusión Permanente de la Arteria Cerebral Media (pMCAO)

Los animales se introdujeron en una cámara de inducción de anestesia con una mezcla de oxígeno/aire comprimido (0,2/0,8 L/min) e isoflurano al 1,5-2% por 5min. Durante la cirugía, la anestesia se mantuvo al 1,5-2% de isoflurano y con igual mezcla de oxígeno/aire comprimido. La temperatura corporal se controló con una sonda de temperatura rectal, y se mantuvo a $36,5\pm 0,5^{\circ}\text{C}$ usando una plataforma emisora de calor sobre la cual se coloca al animal.

El procedimiento quirúrgico es una variante del modelo descrito por Chen y colaboradores (Chen et al., 1986). La ligadura de la arteria carótida común izquierda (ACC) se hizo mediante una incisión en la línea media cervical, para proceder después a la disección y ligadura con una seda 6/0 de dicha arteria. Posteriormente, se realizó una incisión desde el canto lateral del ojo izquierdo y el canal auditivo externo para exponer y retraer el músculo temporal. Tras una pequeña craneotomía (2mm) a nivel del tronco de la ACM izquierda y sobre la fisura rinal, se expuso dicha arteria, que se ligó de forma permanente a nivel del tronco –justo antes de su bifurcación en las ramas frontal y parietal- con una sutura monofilamento de 9/0 (Nylon, S&T). La interrupción del flujo sanguíneo se confirmó bajo el microscopio quirúrgico (WILD M650). Después de la cirugía, los animales fueron devueltos a sus jaulas con libre acceso a comida y agua.

-Grupos experimentales

- 1) Sham: animales sometidos a la exposición de la arteria cerebral media sin ligadura y administración i.p. de vehículo (salino/ DMSO al 10% en salino).
- 2) Sham + RSG: animales sometidos a la exposición de la arteria cerebral media sin ligadura y administración i.p. de RSG (3mg/kg). Esta dosis se escogió en base a la experiencia del laboratorio
- 3) Sham + RSG + BWA4C: animales sometidos a la exposición de la arteria cerebral media sin ligadura y administración i.p. de RSG (3mg/kg) y BWA4C (5mg/kg).
- 4) MCAO: animales sometidos a MCAO a los que se le administra vehículo i.p. (salino/ DMSO al 10% en salino).
- 5) MCAO + RSG: animales sometidos a MCAO tratados i.p. con RSG 3mg/Kg 10 minutos después de la cirugía.
- 6) MCAO + RSG + BWA4C: animales sometidos a MCAO tratados i.p. con RSG 3mg/Kg 10 minutos después de la cirugía y con BWA4C 5mg/Kg, 10 minutos después de la cirugía.

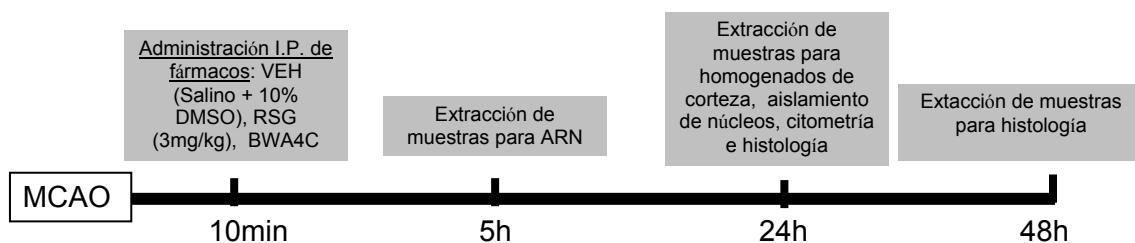


Figura 3.1 Protocolo de administración de fármacos y de extracción de muestras realizado en los estudios *in vivo* de inmunomodulación y resolución de la inflamación en ratón. Este protocolo se realizó también en ratas Wistar para demostrar la implicación de la 5-LO en la disminución de los mediadores pro-inflamatorios inducida por RSG y estudiar su regulación

-Administración intracerebroventricular (i.c.v)

Para estudiar el efecto neuroprotector de LXA₄ sobre ratas Wistar, se llevó a cabo un protocolo de administración intracerebroventricular (i.c.v) de LXA₄ (5µl de una solución 0,2mM), del antagonista específico de PPAR_γ T0070907 (5µl de una solución 2mM) o de vehículo (5 µl de DMSO al 20% en tampón fosfato) previo a la isquemia experimental. Así, las ratas se anestesiaron con una mezcla de oxígeno/aire comprimido (0,2/0,8 L/min) e isoflurano al 1,5–2% por 5 minutos procediéndose a la colocación de una cánula de administración i.c.v. de calibre 28 (Alzet) en el ventrículo lateral izquierdo empleando un aparato estereotáxico (David Kopf instruments). Las coordenadas empleadas fueron las siguientes: anteroposterior 0,8mm; lateral 1.0mm; dorsoventral 3,6mm desde el bregma. La barra incisiva se colocó a 3,3 mm bajo el plano interaural. Las cánulas se fijaron al cráneo empleando gel de cianocrilato (Loctite 454, Alzet) y la administración de los fármacos se realizó inmediatamente después de la MCAO.

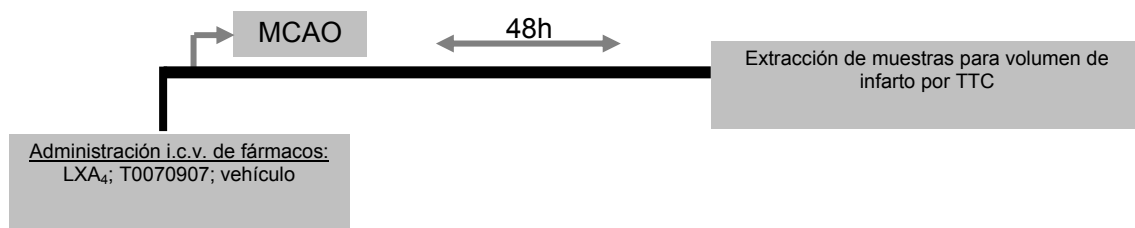


Figura 3.2 Protocolo de administración i.c.v. de fármacos para el estudio del volumen de infarto por TTC

3.2.2 Estudios *in vitro*

-Cultivo de macrófagos RAW 264.7

Los macrófagos murinos RAW 264.7 fueron cedidos por el Profesor Lisardo Boscá (IIB, CSIC). Las células RAW 264.7 son una línea celular de macrófagos obtenidas a partir de la infección de ratones Balb/c por el virus causante de la leucemia Abelson (Raschke et al., 1978). Esta línea se

mantiene por pases sucesivos en medio RPMI 1640 (GIBCO) suplementado con 10% SFB (Gibco) y 1% P/E (Gibco). Las células se sembraron a una densidad de $1 \cdot 10^5$ células/ml en placas petri de 90mm de diámetro (Falcon). Los tratamientos correspondientes se realizaron una vez se alcanzó la confluencia. El cultivo se mantuvo en un incubador (INCO 2/246, Memmert, Schwabach, Alemania) con un ambiente saturado de humedad y con 95% aire/ 5% CO₂ y a una temperatura constante de 37°C.

Grupos experimentales

-RAW + VEH: Macrófagos RAW tratados con VEH (EtOH) durante 5 horas.

-RAW + LXA₄: Macrófagos RAW tratados con LXA₄ 100nM disuelta en EtOH durante 5 horas.

El porcentaje final de etanol en el medio fue de 0,01% en ambos casos

-Cultivo de macrófagos de médula ósea (B.M.)

Para la obtención de macrófagos de médula ósea se sacrificaron ratones C57BL/6 de 6 a 8 semanas por dislocación cervical. Se extrajeron los fémures y el estroma óseo se lavó con medio de cultivo compuesto por RFLC (RPMI 1640 (Gibco); 10% SFB (Gibco); 1% P/E (Gibco); 2mM glutamina (Gibco); M-CSF 5000U/ml (Gibco) (1ml/fémur). Las células se sembraron en botellas de 175cm³ (Falcon). Al tercer día se recolectaron las células no adherentes en tubos falcon de 50ml y se centrifugaron a 1600rpm durante 7 minutos a 4°C. El *pellet* celular se resuspendió en RFLC y las células se sembraron en placas petri iwaki® de 90mm de diámetro a una densidad de 10^5 células por placa. Los tratamientos correspondientes se realizaron cuando el cultivo celular alcanzó la confluencia. El cultivo se mantuvo en un ambiente saturado de humedad con 95% aire/5% CO₂ y a una temperatura constante de 37°C.

Grupos experimentales

-BM + VEH: Macrófagos de médula ósea tratados con vehículo (10% DMSO en RFLC); 18h después del tratamiento se procedió al aislamiento de núcleos celulares.

-BM + RSG: Macrófagos de médula ósea tratados con 1 μ M de RSG; 18h después del tratamiento se procedió al aislamiento de núcleos celulares.

-BM + VEH + LPS: Macrófagos de médula ósea tratados con vehículo (10% DMSO en RFLC); 18h después del tratamiento se añadió al medio 0,1 μ g/ml de LPS y 6h después se extrajo el RNA celular.

-BM + RSG + LPS: Macrófagos de médula ósea tratados con 1 μ M de RSG; 18h después del tratamiento se añadió al medio 0,1 μ g/ml de LPS y 6h después se extrajo el RNA celular.

-BM + RSG + TO: Macrófagos de médula ósea tratados con una combinación de 1 μ M de RSG y 1 μ M de T0070907; 18h después del tratamiento se añadió al medio 0,1 μ g/ml de LPS y 6h después se extrajo el ARN celular.

El porcentaje final de DMSO en el medio fue de 0,01% en todos los casos.

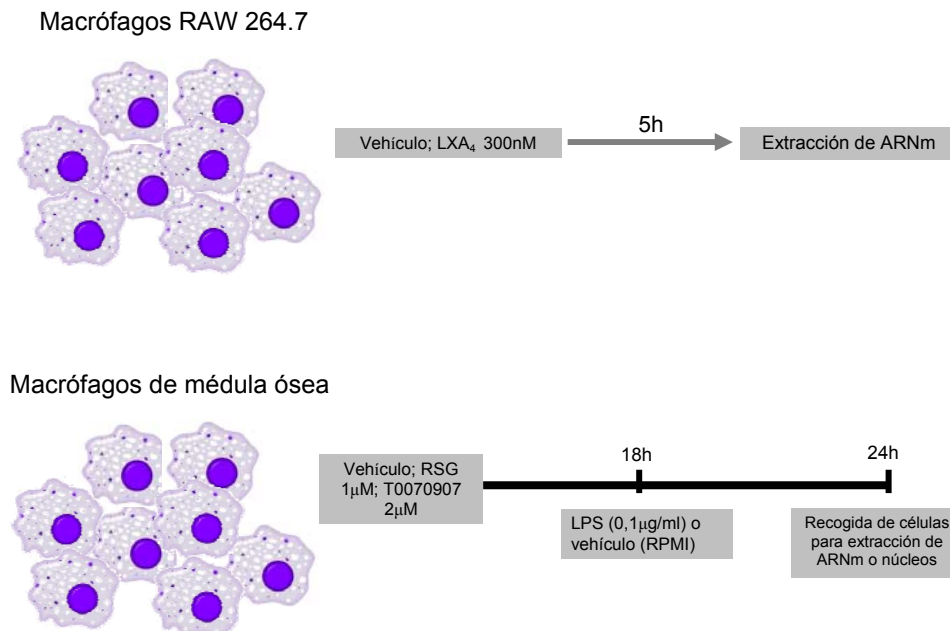


Figura 3.3 Protocolo de tratamiento de cultivos de macrófagos RAW 264.7 y de médula ósea para la extracción de muestras para análisis por RT-PCR o para aislamiento nuclear

-Cultivos primarios de astrocitos

Estas células se obtuvieron a partir de la corteza cerebral de ratas Wistar recién nacidas (día postnatal 0, P0), según un método descrito anteriormente (McCarthy and de Vellis, 1980). Las cortezas se disociaron mecánicamente en un medio de incubación compuesto básicamente por MEM suplementado con glucosa (16,5 mM), glutamina (2,6 mM), penicilina (25 U.I./ml) y estreptomicina (25 U.I./ml) y suero bovino fetal (SFB, 10%) (*medio de cultivo de astrocitos*). Una vez llevada a cabo la disociación, las células se sembraron en botellas de plástico a una densidad de $6,5 \times 10^5$ células/cm², y se mantuvieron en un incubador a 37°C, con una atmósfera húmeda compuesta por 95% aire/5%CO₂. Los astrocitos se mantuvieron así alrededor de dos semanas, hasta que llegaron a confluencia.

Grupos experimentales

-Astrocitos + VEH: Astrocitos tratados con vehículo (DMSO); 8h después del tratamiento se procedió al aislamiento de ARNm. Además, 24h después del tratamiento se recogieron los sobrenadantes de los cultivos para medir la concentración de LXA₄.

-Astrocitos + RSG: Astrocitos tratados con 1μM de RSG; 8h después del tratamiento se procedió al aislamiento de ARNm. Además, 24h después del tratamiento se recogieron los sobrenadantes de los cultivos para medir la concentración de LXA₄.

-Cultivos primarios de neuronas corticales de rata

Para estos cultivos, se utilizaron cerebros de fetos de rata Wistar en el día embrionario 16 (E16) a los que se les extrajeron las cortezas, que se disociaron mecánicamente en un medio de incubación básico (MEM, *Eagle's Minimum Essential Medium*) suplementado con glucosa (33 mM), glutamina (2 mM), gentamicina (16 mg/l), suero de caballo (HS, 10%) y suero bovino fetal (SFB, 10%) (*medio de cultivo*). Una vez disociadas, las células se sembraron a

una densidad de 3×10^5 células/cm³ en placas de 6 ó de 12 pocillos previamente tratadas con poli-L-lisina (Sigma) para facilitar su adhesión. Las placas se mantuvieron a 37°C, en atmósfera húmeda compuesta por 95% de aire y 5% de CO₂. En el día 4 de cultivo se cambió el medio por *medio de crecimiento* que tiene la misma composición que tiene el medio de cultivo que acabamos de describir, pero sin suero fetal. Los experimentos se llevaron a cabo entre los días *in vitro* 9 y 10.

Grupos experimentales

-Neuronas + VEH: Neuronas tratadas con vehículo (DMSO); 8h después del tratamiento se procedió al aislamiento de ARNm. Además, 24h después del tratamiento se recogieron los sobrenadantes de los cultivos para medir la concentración de LXA₄ y se fijaron las células con paraformaldehído al 4% para inmunofluorescencia.

-Neuronas + RSG: Neuronas tratadas con RSG (0,1-1µM); 8h después del tratamiento se procedió al aislamiento de ARNm. Además, 24h después del tratamiento se recogieron los sobrenadantes de los cultivos para medir la concentración de LXA₄ y se fijaron las células con paraformaldehído al 4% para inmunofluorescencia.

-Neuronas + RSG + T009007: Neuronas tratadas con T009007 (2µM) y RSG (1µM); 24h después del tratamiento se fijaron las células con paraformaldehído al 4% para inmunofluorescencia.

3.3- Procesamiento de muestras

En el caso de los estudios *in vivo*, el material de partida para la extracción de ARN, homogenados totales de corteza, citometría de flujo y aislamiento de núcleos y citoplasmas, se obtuvo a partir de la disección de la corteza cerebral infartada y contralateral sana. Para este procedimiento, el animal se sacrifica por dislocación cervical, el cerebro se extrae rápidamente y se coloca en una matriz cerebral (Brain Matriz, WPI, UK) donde se hacen

cortes coronales de 2mm. En los estudios *in vitro*, el aislamiento de las células se realizó según lo especificado y teniendo en cuenta el tipo de ensayo.

3.3.1 Extracción de ARN

En los estudios *in vitro*, el ARNm de los macrófagos, astrocitos y neuronas se extrajo a partir del cultivo celular empleando el *RNeasy Mini kit* (QIAGEN) siguiendo las instrucciones del fabricante. La cantidad de ARN se determinó espectrofotométricamente (Nanodrop ND-1000 Spectrophotometer) y su pureza se expresó como el cociente entre los valores de absorbancia a 260nm y 280nm (1,8-2,0). Las muestras de ARN fueron almacenadas a -80°C hasta su utilización.

En el caso de las muestras de corteza cerebral, la extracción del ARN se realizó siguiendo el protocolo en un paso, basado en la separación de componentes celulares por su solubilidad en soluciones acuosas u orgánicas (Chomczynski and Sacchi, 1987). En este procedimiento, el tejido se homogeniza mecánicamente utilizando Trizol® Reagent (Invitrogen). Una vez homogenizado, se añadió cloroformo a partes iguales y tras mezclar por agitación, se centrifugaron las muestras obteniéndose dos fases: una acuosa donde está el ARN y otra orgánica donde están la mayoría de los componentes celulares. Se descartó la fase orgánica y el ARN se precipitó con isopropanol durante 10 minutos a temperatura ambiente. Una vez precipitado se lavó con etanol al 75% y se resuspendió en agua libre de RNasa (Invitrogen). La cantidad de ARN se determinó espectrofotométricamente (Nanodrop ND-1000 Spectrophotometer) y la pureza se evaluó como el cociente entre los valores de absorbancia a 260nm y 280nm (1,8-2,0). Las muestras de ARN fueron almacenadas a -80°C hasta su utilización.

3.3.2 Homogenado de corteza total

Para obtener una muestra del homogenado total de corteza cerebral se homogenizó un trozo de tejido de no más de 3 gramos mediante ultrasonidos

en un volumen de 400µl de una solución de homogenización a 4°C. La solución de homogenización es una solución tamponada de la siguiente composición: sacarosa (320 mM), DL-ditiotreitol (1mM), leupeptina (10 µg/ml), inhibidor de tripsina de soja (10 µg/ml), aprotinina (2 µg/ml), Nonidet (0.2%) (Roche), y Tris (50 mM), pH 7,0). Tras la homogenización se midió la concentración de proteína de cada muestra mediante el ensayo de Bradford (Bradford, 1976). Estas muestras se emplearon para la determinación de lipoxinas intracerebrales, para la determinación de citoquinas por un *array* de citometría, *cytometric bead array*, (CBA) y para la técnica de Western blot.

3.3.3 Extracción de núcleos y citosoles

Las muestras destinadas a la obtención de las fracciones citosólica y nuclear se procesaron inmediatamente tras sacrificar a los animales o tras recoger las células de los cultivos. En un primer paso se procedió a la disociación mecánica del tejido en una solución hipotónica (tampón HEPES 10mM a pH 7.9, EDTA 1mM, EGTA 1mM, KCl 10mM, NaF 50µM, NaVO₄ 50µM y Na₂MoO₄ 0,1mM). Tras dejar reposar en frío se añadió detergente (0.5%; Nonidet P-40, Roche) y se agitó para facilitar la rotura de las membranas plasmáticas. Se centrifugó durante 1 minuto a 4°C y 13000rpm y se recogió el sobrenadante que constituye el extracto citosólico. En un segundo paso, se añadió una solución hipertónica (tampón HEPES 20 mM a pH 8.0, EDTA 1mM, EGTA 1mM, NaCl 10mM, NaF 50µM, NaVO₄ 50µM y Na₂MoO₄ 0,1mM) al precipitado y se agitó suavemente a 4°C durante 30 minutos. Tras este tiempo, la muestra se centrifugó 5 minutos a 13000rpm en frío, se recogió el sobrenadante correspondiente al extracto nuclear y se almacenó a -80°C hasta su utilización.

3.3.4 Preparación de cerebros para inmunofluorescencia

Los roedores se sacrificaron mediante una dosis letal de pentobarbital sódico y se perfundieron con una solución de lavado a través del ventrículo izquierdo (tampón fosfato 0,2 M), seguido de una solución fijadora de

paraformaldehído al 4% en tampón fosfato 0,2 M. Se extrajo el cerebro y se prosiguió su fijación durante 12 horas a 4°C en la misma solución. Posteriormente, el tejido se mantuvo durante 72 horas en una solución de sacarosa al 30% en tampón fosfato 0,1 M a 4°C para proteger su integridad al congelarlo. Finalmente, se congeló a -80°C. Para llevar a cabo la histología por inmunofluorescencia, se cortaron secciones coronales de cerebro de 30µm de grosor con la ayuda de un microtomo (Leica).

3.3.5 Preparación de suspensiones de células de la corteza cerebral para citometría de flujo

24 horas tras el procedimiento quirúrgico, se aislaron los cerebros de ratón y se procedió a la disección del tejido isquémico mediante un escalpelo. El tejido diseccionado se colocó en un tubo falcon de 15ml que contenía PBS frío y se disgregó hasta obtener una suspensión celular usando un disociador gentleMACS™ (Miltenyi) siguiendo las instrucciones del fabricante. La suspensión de células se filtró mediante una malla de nylon de 50µm de diámetro (BD Biosciences) tras lo cual se centrifugó a 300g durante 10 minutos. El precipitado se resuspendió en 3ml de Percoll® al 50% (Sigma) y se cubrió cuidadosamente con otra solución de Percoll al 30%. Este gradiente se centrifugó a 500g durante 20 minutos a temperatura ambiente y sin freno. El halo celular localizado en la interfase 30-50% del Percoll se recogió empleando una pipeta Pasteur de plástico. Las células se lavaron en PBS frío y se resuspendieron dando lugar a una suspensión para el análisis por citometría.

3.4- Técnicas experimentales

3.4.1 RT-PCR

A partir de las muestras de ARN se llevó a cabo la síntesis del ADN complementario (ADNc) por transcripción reversa empleando la enzima

Superscript II Reverse transcriptase (Invitrogen), siguiendo las indicaciones del fabricante. El ADNc se almacenó a -20°C . El estudio de la expresión de ARNm se realizó por triplicado en un termociclador Bio-Rad iQ5. Dicha expresión se normalizó de acuerdo a la expresión génica de la actina, y todos los genes se sometieron a una desnaturalización a 95°C por 5 min seguida de 45 ciclos de 95°C por 10 s, 60°C por 30 s, y 72°C por 40 s. Se incluyó un análisis de la curva de fusión con el fin de confirmar la formación de un único producto de PCR. Las secuencias de los cebadores (*primers*) usados se tomaron usando la biblioteca PUBMED:

Tabla 6: Secuencias de *primers* empleadas para los estudios de PCR a tiempo real

TNF α (<i>Rattus norvegicus</i>)	F: 5'-GACCCTCACACTCAGATCATCTTCT-3' R: 5'-TGCTACGACGTGGGCTACG-3'
MMP9 (<i>Rattus norvegicus</i>)	F: 5'-GTGCCCTGGAACCTCACACAAC-3' R: 5'-CCAGAAAGTATTTGTCATGGCAGAA-3'
COX-2 (<i>Rattus norvegicus</i>)	F: 5'-GCATTCTTTGCCAGCACTTCACT-3' R: 5'-TTTAA GTCCACTCCATGGCCCAGT-3'
iNOS (<i>Rattus norvegicus</i>)	F: 5'-AACCCAAGGTCTACGTTCAAG-3' R: 5'-AAAGTGGTAGCCACATCCCG-3'
5-LO (<i>Rattus norvegicus</i>)	F: 5'-GTGTCTGAGGTGTTCCGGTA-3' R: 5'-AGTGTGATGGCAATGGT-3'
15-LO (<i>Rattus norvegicus</i>)	F: 5'-CCGGAGACTCCAAGTACGC-3' R: 5'-CGTAGCAGCTTCCCGAGAG-3'
12-LO (<i>Rattus norvegicus</i>)	F: 5'-GGGCCACTGCAGTTCGTGA-3' R: 5'-CGGCCTCTGCGCTCATC-3'
Actina (<i>Rattus norvegicus</i>)	F: 5'-TGAGCGCAAGTACTCTGTGTGGAT-3' R: 5'-TAGAAGCATTGCGGT-GCACGATG-3'
CD36 (<i>Mus musculus</i>)	F: 5'-TTTCCTCTGACATTTGCAGGTCTA-3' R: 5'-AAAGGCATTGGCTGGAAGAA-3'
CD206 (<i>Mus musculus</i>)	F: 5'-CTCGTGGATCTCCGTGACAC-3' R: 5'-GCAAATGGAGCCGTCTGTGC-3'
Arginasa I (<i>Mus musculus</i>)	F: 5'-GGAAGACAGCAGAGGAGGTG-3' R: 5'-TATGGTTACCCTCCCCTTGA-3'
TNF α (<i>Mus musculus</i>)	F: 5'-TTCCGAATTCAGTGGAGCCTCGAA-3' R: 5'-TGCACCTCAGGGAAGAATCTGGAA-3'
Ym1 (<i>Mus musculus</i>)	F: 5'-ACAATTTAGGAGGTGCCGTG-3' R: 5'-CCAGCTGGTACAGCAGACAA-3'
Actina (<i>Mus musculus</i>)	F: 5'-TGTGATGGTGGGAATGGGTGAGAA-3' R: 5'-TGTGGTGCCAGATCTTCTCCATGT-3'

3.4.2 Western blot

Para determinar los niveles proteicos corticales de arginasa I, CD36, Ym1, PPAR γ , iNOS, COX-2, TNF α y MMP9 se emplearon homogenados cerebrales de ratas y ratones sacrificados 24h después de la cirugía. La concentración proteica se determinó con el ensayo de Bradford (Bradford, 1976) y así, se transfirió igual cantidad de proteína (25 μg) de cada muestra a

membranas de nitrocelulosa (Amersham Biosciences). Las membranas se bloquearon con leche desnatada al 5% en TBS-T (0.05% Tween 20 en TBS) y se incubaron con sus anticuerpos primarios correspondientes:

Tabla 7: Anticuerpos empleados para inmunodetección por la técnica de Western blot

Anticuerpo Primario	Dilución	Casa Comercial
Anti iNOS (<i>Rattus norvegicus</i>)	(1:100)	Santa Cruz
Anti COX-2 (<i>Rattus norvegicus</i>)	(1:200)	Santa Cruz
Anti TNF α (<i>Rattus norvegicus</i>)	(1:250)	Peprotech
Anti MMP9 (<i>Rattus norvegicus</i>)	(1:2000)	Millipore
Anti CD36 (<i>Mus musculus</i>)	(1:500)	R&D systems
Anti Arginasa I (<i>Mus musculus</i>)	(1:100)	BD Biosciences
Anti Ym1 (<i>Mus musculus</i>)	(1:1000)	StemCell Technologies Inc.
Anti CD206 (<i>Mus musculus</i>)	(1:500)	Antibodies on line
Anti PPAR γ (<i>Mus musculus</i>)	(1:1000)	Santa Cruz
Anti Beta Actina	(1:10000)	Sigma

Posteriormente, las membranas se incubaron con los correspondientes anticuerpos secundarios acoplados a peroxidasa de rábano conjugada a IgG (Santa Cruz Biotechnology) con posterior exposición a reactivos de detección quimioluminiscentes (PerkinElmer Life and Analytical Sciences). Las bandas inmunorreactivas se visualizaron utilizando el software GeneSnap Image Acquisition (SynGene; Version 7.08). Las bandas específicas se cuantificaron usando el software GeneTools Gel Analysis (SynGene version 4.01). Los niveles de actina se emplearon como control de carga para la normalización de los valores obtenidos.

3.4.3 Caracterización celular por citometría de flujo

Para determinar la expresión de marcadores M2 en el cerebro isquémico se diseñó un experimento de citometría de flujo para medir niveles de CD36 y arginasa I en suspensiones celulares de tejido infartado 24 horas tras el procedimiento quirúrgico. El análisis se realizó en los siguientes grupos experimentales: Sham + VEH; MCAO + VEH; MCAO + RSG; MCAO + RSG + BWA4C. Tras la obtención de las suspensiones celulares, las muestras se

distribuyeron en tubos de citometría (BD Pharmigen) a los que se añadió 200 μ l de PBS-BSA 5% junto con 2 μ l de solución de bloqueo (CD16/CD32 mouse BD Fc Block -BD Pharmigen-). Posteriormente, se procedió a su incubación con anticuerpos directos para citometría anti-CD45 conjugado a PE (Miltenyi Biotec) y anti-CD11b (Miltenyi Biotec) conjugado a FITC durante 1 hora a 4°C. En el caso particular de la detección de CD36, al tratarse de un receptor de membrana, se llevó a cabo su incubación con un anticuerpo anti-CD36 conjugado a PerCP (Santa Cruz). Las muestras destinadas a la detección de este antígeno se lavaron con PBS y se resuspendieron en 150 μ l de FACS FLOW (BD Pharmigen) para proceder a su análisis por citometría.

Las muestras destinadas a la detección del antígeno intracelular arginasa I se lavaron con PBS frío, se fijaron con PFA al 4% y se permeabilizaron con PBS-Tween20 0,1%. Las células permeabilizadas se incubaron con rabbit anti mouse arginasa I (GeneTex) en PBS-BSA 5% durante toda la noche a 4°C. Al día siguiente, se lavaron con PBS y se incubaron con un anticuerpo secundario IgG anti rabbit conjugado a PerCP (Miltenyi Biotec) que permite la detección del anticuerpo primario. Finalmente, se realizó un último lavado con PBS frío (1ml), se centrifugaron las muestras (1500rpm; a 4°C; 5 minutos), se descartó el sobrenadante por inversión y las muestras se resuspendieron en 300 μ l de FACS-Flow (BD Bioscience) para proceder a su análisis. La intensidad de fluorescencia considerada como positiva se definió respecto a sus respectivos controles isotópicos.

La adquisición de datos se realizó empleando un citómetro de flujo FACSCalibur® (Becton Dickinson S.A.) y el programa BD Cellquest™ PRO. Su posterior análisis se llevo a cabo empleando el software FlowJO (Tree star inc.).

3.4.4 Ensayo de actividad transcripcional de PPAR γ

El receptor nuclear PPAR γ se activa por unión de un ligando tras lo cual se acopla a secuencias PPRE actuando como factor de transcripción. Para cuantificar la activación de PPAR γ se utilizó el kit TransAM™ (Active Motif).

Estos ensayos resultan más sencillos y rápidos que un EMSA y permiten utilizar cantidades de muestra mucho menores (basta con 1µg). En un primer paso, las muestras de extractos nucleares, bien de la corteza cerebral o bien de macrófagos de médula ósea, se incuban en una placa de 96 pocillos en la que están anclados oligonucleótidos que contienen secuencias PPRE (5'-AACTAGGAAAGGTCA-3') de tal manera que el PPAR activado se une a estas secuencias PPRE, y el resto de proteínas se eliminan tras un lavado. Las tres isoformas de PPAR se unen a las mismas secuencias PPRE, por lo que se hace necesario un segundo paso consistente en un ELISA indirecto para confirmar la presencia de la isoforma γ . La unión del anticuerpo primario específico anti-PPAR γ se revela con un anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano (HRP; horseradish peroxidase). Al añadir el sustrato de la peroxidasa se genera un producto coloreado cuantificable por espectrofotometría.

3.4.5 Determinación de los niveles de LXA₄

LXA₄ es un metabolito del ácido araquidónico que se sintetiza por lipoxigenación en gran diversidad de tejidos y frente a diversos estímulos. Se aisló por primera vez en leucocitos humanos (Serhan et al., 1986). Actualmente existen kits comerciales que permiten su detección mediante técnicas de ELISA. Nosotros hemos utilizado el EA 35 Lipoxin A4 EIA kit (Oxford Biomedical Research). Las muestras de tejido cerebral necesitan pasar un proceso de extracción previo al ensayo de ELISA para evitar falsos positivos: Tras homogenizar el tejido en etanol, el homogenado se centrifuga para obtener el sobrenadante, que se diluye con agua y se acidifica con HCl 1N hasta un pH de 3,5 para precipitar proteínas. A continuación, se realiza una cromatografía en fase sólida reversa para extraer LXA₄ en minicolumnas C18 octadecyl (AmprepTM Mini-Columns), que se equilibran utilizando etanol absoluto seguido de agua. Para ello se añaden a las columnas las muestras seguidas de hexano, que arrastra las partículas más hidrofóbicas. Finalmente se eluye la LXA₄ con acetato de etilo. Las muestras en acetato de etilo se congelan a -80°C hasta realizar el ELISA. En el caso de los sobrenadantes

celulares, la extracción previa de lipoxinas no es necesaria. Para realizar el ensayo de ELISA las muestras deben estar disueltas en una solución de extracción tamponada, por lo que se evaporó el acetato de etilo en corriente de nitrógeno y el residuo seco se disolvió en el tampón de extracción del kit de ELISA. El kit de ELISA se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante.

3.4.6 Determinación del volumen de infarto

Tinción con TTC (cloruro de 2,3,5-trifenil-tetrazolio)

Para evaluar el efecto neuroprotector de LXA₄ en ratas Wistar, se extrajeron los cerebros a las 24 horas después de la pMCAO y se cortaron en rodajas de 2mm usando una matriz cerebral (Brain Matriz, WPI, UK) tras lo cual se tiñeron en 2% de TTC (Merck) en una solución de tampón fosfato 0,1 mol/L. Cada rodaja fue fotografiada con una cámara digital (Nikon Coolpix 990, Nikon Corporation) y cada imagen se analizó contando el número de píxeles de cada rodaja expresado en milímetros cuadrados, usando el software ImageJ 1,33u (NIH). Se realizaron medidas del hemisferio sano (Hc) y lesionado (Hi) excluyendo la lesión para de esta manera hacer una corrección del edema. Posteriormente, se sumaron todas las medidas para obtener un volumen hemisférico (milímetros cúbicos), y se determinó el volumen de hemisferio infartado en mm³ usando la siguiente fórmula: $VHI = (Hc - Hi) / Hc$.

Resonancia magnética (RM)

Para algunos estudios de neuroprotección se realizó un análisis del volumen del infarto por RM 24h después de la MCAO. Para dicho análisis, nos servimos del equipo Biospec BMT 47/40 con un campo de 4,7 Teslas, que permite la obtención de imágenes de resonancia magnética *in vivo* y que, junto con el software de imagen ParaVision, permiten la adquisición y reconstrucción de imágenes y el procesamiento de los datos obtenidos. Una vez adquiridas las imágenes, nos servimos del software ImageJ 1,33u (NIH), y mediante su

aplicación *MRI analysis calculator* determinamos los volúmenes de hemisferio infartado en los distintos grupos mediante la fórmula:

$$\text{Vol. Infarto (mm}^3\text{)} = ((\text{Hemisferio Contralateral} - \text{Hemisferio Ipsilateral no lesionado}) / \text{Hemisferio Contralateral})$$

Para dichas medidas empleamos 17 cortes separados 450 micras entre sí desde bregma 1.78mm a bregma -3.64mm. La conversión de las medidas obtenidas con el *MRI analysis calculator* a unidades de volumen (mm³) para su introducción en la fórmula de %*Vol. Infarto* se consiguió aplicando las siguientes formulas:

$$\text{Resolución en el Plano} = \text{Vol MRI analysis calculator} \times 0,098 \times 0,098$$

$$\text{Resolución en Volumen} = \text{Resolución Plano} \times 0,391$$

$$\text{Volumen Infarto} = \text{Suma de volúmenes}$$

3.4.7 Inmunofluorescencia

La detección de proteínas por inmunofluorescencia se realizó a partir de secciones de cerebro de 30µm de grosor previamente fijadas en paraformaldehído. Tras la fijación, se procedió a la permeabilización y al bloqueo de uniones inespecíficas mediante la incubación de las secciones (agitación, 2h, temperatura ambiente) en T-KPBS, al que se le añadió un 5% del suero correspondiente (Jackson Immuno Research). El tipo de suero seleccionado dependió en todos los casos del animal empleado para la producción del anticuerpo secundario. Seguidamente, se procedió a la incubación del anticuerpo primario en la misma solución de bloqueo (incubación en agitación, por toda la noche, 4°C). Tras 3 lavados con T-KPBS, las secciones se incubaron con su correspondiente anticuerpo secundario acoplado a fluorescencia (agitación, 2h, temperatura ambiente) o, en el caso de requerir una amplificación de la señal, se utilizó el sistema biotina-avidina. En algunos casos, previo al montaje, se procedió a la tinción de núcleos empleando TOPRO (Invitrogen). En la siguiente tabla se resumen las

combinaciones de anticuerpos empleadas para los estudios de inmunofluorescencia:

INMUNOFLUORESCENCIA EN RATÓN:			
Colocalización	Anticuerpo primario	Anticuerpo Secundario	Anticuerpo Secundario
Ym1	Rabbit anti Ym1 (Stem Cell Tech. Inc.)	Goat anti Rabbit Biotin (Vector Lab.)	Streptoavidina Alexa 488 (Invitrogen)
En combinación con:			
NIMPR14	Rat anti NIMPR14 (ABCAM)	Donkey anti Rat Cy3 (Vector Lab.)	---
GFAP (*)	Mouse anti GFAP (BD Biosc.)	Donkey anti Mouse Cy3 (Vector Lab.)	---
NeuN (*)	Mouse anti NeuN (Chemicon)	Donkey anti Mouse Cy3 (Vector Lab.)	---
CD11b	Rat anti CD11b (Serotec)	Donkey anti Rat Cy3 (Vector Lab.)	---
Iba1 (#)	Rabbit anti Iba1 (Wako)	Goat anti Rabbit Alexa 647 (Invitrogen)	---
CD206	Rabbit anti CD206 (Santa Cruz)	Goat anti Rabbit Biotin (Vector Lab.)	Streptoavidina Alexa 488 (Invitrogen)
En combinación con:			
NIMPR14	Rat anti NIMPR14 (ABCAM)	Donkey anti Rat Cy3 (Vector Lab.)	---
GFAP (*)	Mouse anti GFAP (BD Biosc.)	Donkey anti Mouse Cy3 (Vector Lab.)	---
NeuN (*)	Mouse anti NeuN (Chemicon)	Donkey anti Mouse Cy3 (Vector Lab.)	---
Iba1 (#)	Rabbit anti Iba1 (Wako)	Goat anti Rabbit Alexa 647 (Invitrogen)	---
5-LO	Rabbit anti 5-LO (Calbiochem)	Goat anti Rabbit Biotin (Vector Lab.)	Streptoavidina Alexa 488 (Invitrogen)
En combinación con:			
NeuN (*)	Mouse anti NeuN (Chemicon)	Donkey anti Mouse Cy3 (Vector Lab.)	---
INMUNOFLUORESCENCIA EN RATAS:			
Colocalización	Anticuerpo primario	Anticuerpo Secundario	Anticuerpo Secundario
5-LO	Rabbit anti 5-LO (Calbiochem)	Goat anti Rabbit Biotin (Vector Lab.)	Streptoavidina Alexa 488 (Invitrogen)
En combinación con:			
GFAP	Mouse anti GFAP (BD Biosc.)	Donkey anti Mouse Cy3 (Vector Lab.)	---
NeuN	Mouse anti NeuN (Chemicon)	Donkey anti Mouse Cy3 (Vector Lab.)	---
CD11b (OX42)	Mouse anti OX-42 (Serotec)	Donkey anti Mouse Cy3 (Vector Lab.)	---

Tabla 8 Combinaciones de anticuerpos empleados para Inmunofluorescencia. (*) indica que se empleó el kit *Mouse on Mouse* (M.O.M) (Vector) para impedir interacciones de anticuerpos producidos en ratón con el propio tejido. El empleo del kit M.O.M. se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante. (#) Indica que se realizó una inmunofluorescencia seriada, dado que los dos anticuerpos empleados son de la misma especie. Inicialmente se procedió a la detección del primer antígeno. Posteriormente se procedió a la fijación con formalina (20 minutos a temperatura ambiente) y se continuó con la detección del segundo antígeno. Todas las inmunofluorescencias fueron realizadas junto con sus correspondientes controles negativos que se emplearon para establecer la especificidad del marcaje del anticuerpo primario

Para la inmunofluorescencia en cultivos neuronales, las células adheridas a cubreobjetos de vidrio tratados con polilisina se lavaron con PBS y se fijaron con PFA al 4% disuelto en PBS durante 10 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se procedió a la permeabilización (PBS-Triton 0,2%) y bloqueo de las uniones inespecíficas con PBS-BSA 5% y a la incubación con los anticuerpos primarios NeuN (Chemicon) y 5-LO (Calbiochem). Finalmente, las células se incubaron con los respectivos anticuerpos secundarios tras lo que se procedió a colocar los cubreobjetos de vidrio en portaobjetos embebidos con medio de montaje para inmunofluorescencia.

La visualización y la toma de microfotografías de los muestras para inmunofluorescencia se llevó a cabo empleando el microscopio confocal Zeiss y el software ZEN 2009 (Carl Zeiss Microimaging GmbH).

3.4.8 Cuantificación celular por estereología

Para la cuantificación del número de células $Ym1^{+/-}/NIMPR14^{+}$ o células $Ym1^{+}/NIMPR14^{-}$ infiltradas en el tejido isquémico se usó el método del fraccionador óptico, que permite realizar una estimación del número total de células presentes en una estructura determinada (Gundersen et al., 1988). Para esto, se obtuvieron cortes seriados de $30\mu\text{m}$ de grosor tomando una de cada 10 secciones consecutivas y quedando las secciones separadas $300\mu\text{m}$ entre sí. Se utilizó un microscopio de fluorescencia (Nikon Eclipse 80i Nikon Corporation) y el software StereoInvestigator 6 (MicroBrightfield Inc.). La delimitación del área se realizó sobre la zona infartada. Como criterios de medición, se tomaron 7 cortes por cada cerebro y se estableció un área de disector óptico de $100\mu\text{m}^3$ y un coeficiente de error medio de la estimación de 0.1. Para establecer la densidad de células $Ym1^{+/-}/NIMPR14^{+}$ o $Ym1^{+}/NIMPR14^{-}$ infiltradas, el número total de células cuantificadas se dividió por el volumen del área muestreada obtenido por Cavalieri y los resultados se representaron como número de células positivas por mm^3 .

3.4.9 Ensayo TR-FRET

Para determinar la habilidad de RSG para actuar como ligando de PPAR γ , llevamos a cabo un ensayo *in vitro* de TR-FRET (Time-Resolved Fluorescence Resonance Energy Transfer) empleando el kit LanthaScreen™ TR-FRET Peroxisome Proliferator Activated Receptor gamma Coactivator Assay (Invitrogen). El procedimiento se llevó a cabo como indica el protocolo del fabricante. Las medidas se realizaron en un espectrofotómetro VICTOR3V Multilabel Counter (WALLAC 1420; PerkinElmer Life and Analytical Sciences) empleando la calibración descrita en las instrucciones del fabricante.

Así, en este ensayo *in vitro* nos servimos del dominio de unión a PPAR γ conjugado a terbio y de un péptido coactivador de PPAR γ unido a fluoresceína. Este procedimiento se basa en que al excitar el terbio a 340nm éste emite fluorescencia a una longitud de onda capaz de excitar a la fluoresceína, que a su vez emitirá fluorescencia medible a una longitud de onda de 520nm. En esta situación, la transferencia de energía del terbio a la fluoresceína sólo es posible si existe en el medio un agonista de PPAR γ capaz de inducir un cambio conformacional en su dominio de unión que permita el acoplamiento del péptido coactivador. Así, la adición de un agonista PPAR γ incrementará la emisión a 520nm de la fluoresceína de manera concentración-dependiente. La representación del cociente de emisión de la fluoresceína (520nm) sobre el terbio (490nm) respecto al logaritmo de la concentración del agonista permitirá representar estos valores ajustados a una curva sigmoideal concentración-respuesta.

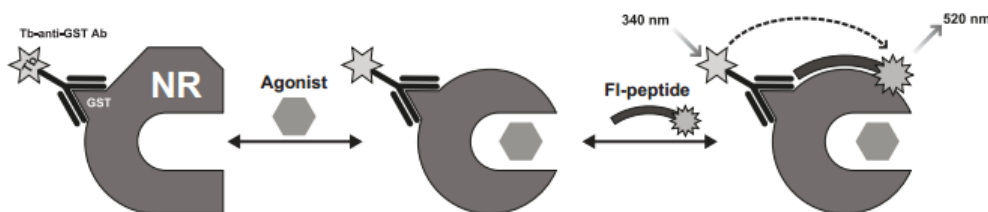


Figura 2.4 Esquema de la transferencia de energía tras activación de PPAR γ en el ensayo TR-FRET

3.4.10 Determinación de citoquinas por citometría

Para determinar el nivel de expresión proteica de las citoquinas/quimioquinas pro-inflamatorias TNF- α y MCP-1 se utilizó un kit de citometría [BD™ Cytometric Bead Array (CBA)]. Este ensayo permite la discriminación de diferentes proteínas en función del tamaño y la fluorescencia emitida. Los anticuerpos correspondientes a cada proteína se acoplaron a microesferas (*beads*) según las instrucciones de la casa comercial (BD Bioscience). Cada muestra o estándar se añadió a tubos de citómetro que contenían 50 μ l de la mezcla de microesferas y se dejó en incubación por 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente, se añadió a cada muestra (homogenados cerebrales de ratón o estándar) 50 μ l de la mezcla del reactivo de detección de ficoeritrina (PE), seguido de una hora de incubación a temperatura ambiente. Después de la incubación, las muestras y la curva estándar se lavaron con solución de lavado y centrifugaron por 5 minutos a 200g. Finalmente, se descartó el sobrenadante y se añadieron otros 300 μ l de solución de lavado a cada tubo. Por medio de un citómetro de flujo Facscalibur (BD Biosciences), se realizó un análisis de dos colores. Los datos se adquirieron con el programa BD Cellquest™ PRO y se analizaron utilizando el programa FCAP Array™. Para excluir las partículas diferentes a las microesferas de poliestireno de 7,5 μ m se definió una ventana de adquisición de FSC vs. SSC. La concentración de cada citoquina/quimioquina se determinó de acuerdo a su curva estándar y se procedió a su normalización en función de los miligramos de proteína (método Bradford) existentes en cada muestra. Cuando una muestra tenía un valor menor al valor límite del ensayo se le asignó una concentración de 0pg/ml.

3.4.11 Análisis de la fagocitosis de neutrófilos

Para el análisis de la fagocitosis de neutrófilos en secciones de cerebro de ratón se procedió a la cuantificación del porcentaje de co-localización entre el marcador microglial Iba1 y el marcador de neutrófilos NIMPR14 en distintos cortes histológicos. Así, tras realizar la inmunofluorescencia de estos

marcadores, se realizaron dos micrografías del *core* isquémico de 7 secciones coronales de cada animal empleando el objetivo de magnificación 20x de un microscopio confocal (Zeiss LSM710). La cuantificación del porcentaje de colocalización Iba1/NIMPR14 se llevó a cabo sobre las proyecciones ortogonales de los stacks en z' de las micrografías obtenidas mediante el software Zenlite 2011 (Zeiss). Es importante decir que, para este análisis, la morfología de las células Iba1⁺ se examinó cuidadosamente con el fin de excluir falsos positivos resultado de la fagocitosis de la microglía necrótica por los neutrófilos. Así, para establecer este porcentaje de co-localización, sólo tuvimos en cuenta a las células Iba1⁺ con una morfología no dañada.

3.4.12 Análisis de la función fagocítica de macrófagos en cultivo

El estudio de la fagocitosis *in vitro* se realizó en cultivos de macrófagos de médula ósea diferenciados con M-CSF en placas falcon de 6 pocillos de 9,6cm² de área. El medio de los cultivos fue reemplazado por un medio fresco RFLC sin M-CSF al que se le añadió LXA₄ o vehiculo (EtOH). Tres horas tras la incubación con el nuevo medio, se añadió a los pocillos 3µl de una solución de bolas de látex conjugadas a fluoresceína (Sigma) y se incubó el cultivo durante 15 minutos a 37°C en agitación para permitir la fagocitosis del látex. La reacción se detuvo añadiendo PBS frío. Los macrófagos se despegaron de las placas de cultivo empleando puntas de pipeta, se centrifugaron, se resuspendieron y se incubaron durante 1 hora a 4°C con una solución de PBS que contenía 2mg/ml de yoduro de propidio (Santa Cruz) para determinar las células muertas. Finalmente, las células se lavaron y se resuspendieron en FacsFlow (BD Pharmigen) para proceder a la detección de las células que fagocitaron látex o fluoresceína⁺ por citometría de flujo. La adquisición se realizó mediante un citómetro Facscalibur (BD Biosciences) y los resultados se analizaron empleando el software FlowJo (Tree star inc.). Los datos se expresaron como índice de fagocitosis, que se obtiene de multiplicar el número de células positivas para la fluoresceína (FL1⁺) por la intensidad de fluorescencia para esta longitud de onda.

3.4.13 Análisis estadístico

Los datos se analizaron utilizando el programa PRISM 4.0 (GraphPad Software Inc.). Se realizó una t de Student para comparar dos grupos y un ANOVA de una sola vía seguido de una prueba post-hoc de Neuman-Keuls para comparar más de dos grupos. Para los estudios de correlación se empleó un análisis de regresión lineal. Los datos se expresaron como media \pm error estándar de la media (ESM) y una $p < 0.05$ se asumió como estadísticamente significativa.

IV Resultados

4.1 Estudio de la implicación de 5-LO en los efectos anti-inflamatorios de PPAR γ en la isquemia cerebral: inhibición de la activación clásica o M1.

4.1.1 Caracterización de RSG como agonista PPAR γ

La unión de un agonista al dominio de unión a ligando (LBD) del receptor PPAR γ produce un cambio conformacional en la proteína que le permite el reclutamiento de moléculas co-activadoras necesarias para la activación de sus genes diana. Al mismo tiempo, este PPAR γ activado se situará en sus elementos de respuesta situados en regiones promotoras del ADN (Kodera et al., 2000). En el contexto de la inflamación, el receptor PPAR γ es capaz de inhibir la producción de moléculas pro-inflamatorias mediante un mecanismo de transrepresión transcripcional (Jiang et al., 1998). Con este marco teórico, decidimos validar si en nuestras condiciones, el compuesto *maleato de rosiglitazona* (RSG) mostraba las acciones descritas de unión al receptor, activación transcripcional y funciones transrepresoras esperables de un agonista *bona fide* de PPAR γ y podía ser, por tanto, empleado como tal.

El estudio TR-FRET, cuyo procedimiento se describe en la sección correspondiente, mostró que RSG induce un cambio conformacional en el dominio de unión de ligando (LBD) de PPAR γ de manera concentración dependiente, lo que indica su capacidad de unirse al LBD del receptor PPAR γ como agonista. La cinética de la transferencia de energía detectada entre el péptido coactivador y el LBD se ajustaba a una curva sigmoideal concentración-respuesta que indicaba que la concentración media (EC₅₀) de RSG sobre el LBD de PPAR γ era de 18nM (Figura 4.1 A). Además, estudiamos la acción de RSG en cultivos de macrófagos de médula ósea de ratón diferenciados con M-CSF. En estos cultivos pudimos establecer que un pretratamiento con RSG

durante 12 horas era capaz de incrementar la actividad transcripcional de PPAR γ alrededor de un 25% sobre los macrófagos tratados con DMSO (Figura 4.1 B).

El efecto transrepressor de PPAR γ se estudió en estos macrófagos. En este caso, el pretratamiento con RSG fue precedido de un tratamiento con lipopolisacárido (LPS) a una concentración de 0,1 μ g/ml durante 6 horas. El efecto del LPS sobre el cultivo de macrófagos causó un incremento de más de 100 veces en la producción de ARNm de TNF α respecto a los macrófagos control (datos no mostrados). En estas condiciones prototípicas de una activación clásica o M1, el pretratamiento con RSG disminuyó la producción de TNF α de forma significativa. Dicho efecto resultó ser específico de PPAR γ , puesto que el antagonista de PPAR γ , T0070907, revertió la inhibición por RSG de la producción de TNF α inducida por LPS (Figura 4.1 C).

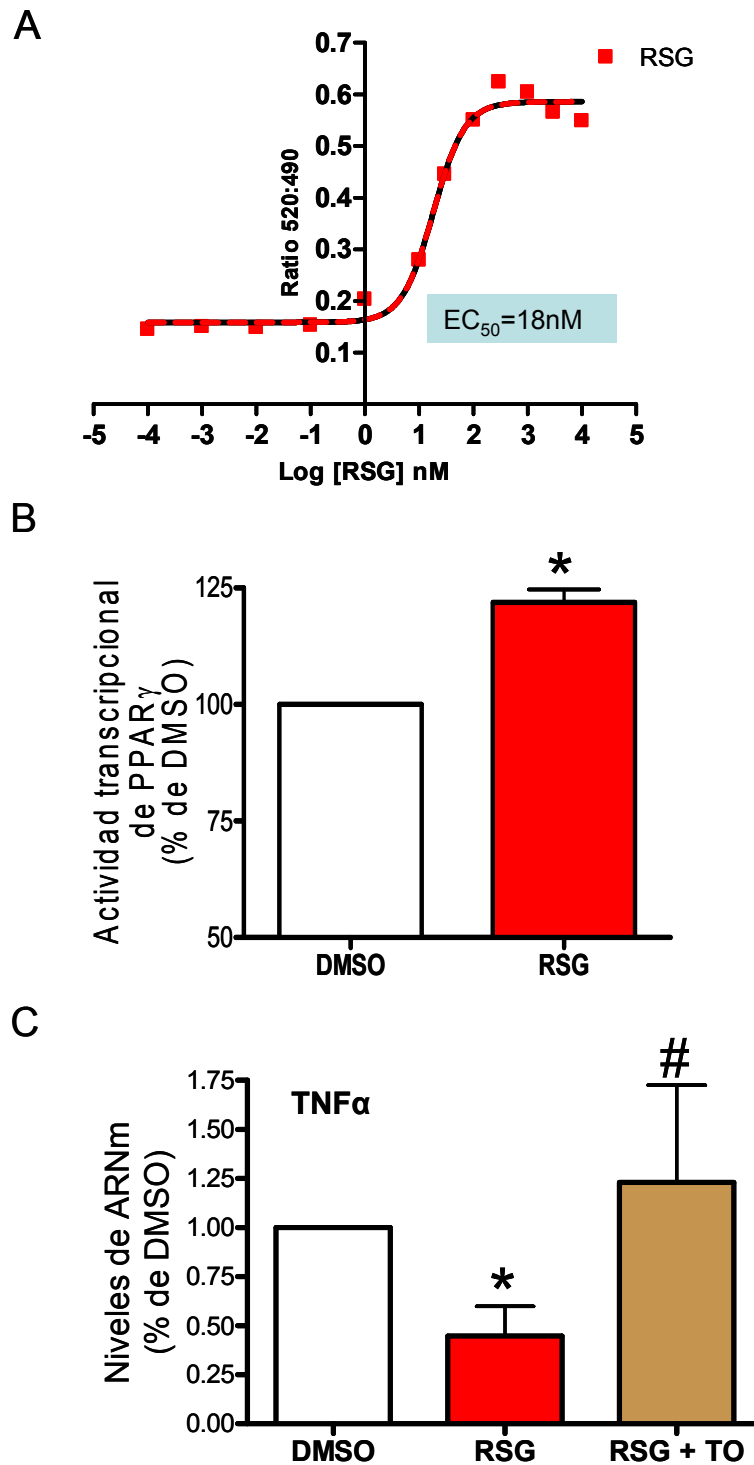


Figura 4.1 Estudio de la activación de PPAR γ por rosiglitazona. **A.** Ensayo TR-FRET de unión a ligando en el que se emplearon concentraciones crecientes de RSG ($1 \cdot 10^{-4}$ - $1 \cdot 10^6$ nM) ajustándose el ratio de emisión 520:490 a una curva concentración-respuesta sigmoideal con una EC_{50} de 18nM. **B.** Ensayo de actividad transcripcional de PPAR γ con macrófagos de médula ósea diferenciados con M-CSF y tratados con RSG (1 μ M) o vehículo (DMSO 0,001%). La inducción de la actividad transcripcional se representa como el porcentaje de activación respecto al grupo control DMSO (n=4; *p<0,05 vs DMSO). **C.** Niveles de ARNm de TNF α determinados por RT-PCR en macrófagos de médula ósea diferenciados con M-CSF tras el tratamiento con LPS. Las células se sometieron a un pretratamiento previo con vehículo (DMSO 0,001%), RSG (1 μ M) o RSG + T0070907 (2 μ M). La inducción de ARNm se representa sobre el grupo control DMSO (n=3; *p<0,05 vs DMSO; # p<0,05 vs RSG).

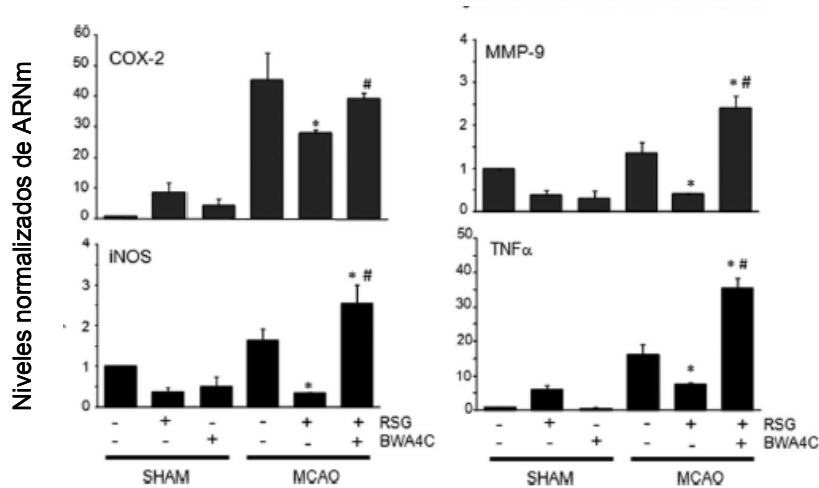
4.1.2 Estudio del papel de 5-LO en la inhibición de la activación M1 inducida por RSG en isquemia cerebral en rata

Las acciones neuroprotectoras inducidas por PPAR γ en la isquemia cerebral se atribuyen a su efecto transrepressor sobre diferentes factores de transcripción implicados en la inflamación (ver Tabla 1.4). Puesto que antecedentes previos de nuestro grupo han demostrado que la actividad 5-LO es necesaria para la neuroprotección inducida por RSG, decidimos estudiar si la actividad 5-LO estaba implicada en el efecto anti-inflamatorio mediado por PPAR γ en isquemia. Para este propósito, se evaluó la expresión de ARNm y proteína de las moléculas pro-inflamatorias TNF α , iNOS, COX-2 y MMP9 en tejido isquémico de ratas tratadas con salino, RSG o con una combinación de RSG junto con el inhibidor específico de la actividad 5-LO, BWA4C. Además, para estudiar la expresión de dichos mediadores en ausencia de isquemia, se emplearon animales sham. Los resultados obtenidos indican que, 5 horas tras el inicio del proceso isquémico, se produce un incremento en la transcripción de ARNm de TNF α , iNOS, COX-2 y MMP9 en los animales isquémicos cuando se compararon con el grupo sham (Figura 4.2A). De acuerdo con datos previos en la literatura (Pereira et al., 2006; Zhao et al., 2006), el tratamiento con RSG produjo una reducción significativa de los niveles de TNF α , iNOS, COX-2 y MMP9, en comparación con el grupo MCAO+VEH. El tratamiento combinado de RSG junto con el inhibidor específico de 5-LO abolió el efecto de RSG e incluso incrementó la transcripción de TNF α , iNOS y MMP9 a niveles superiores a los encontrados en el grupo MCAO+VEH. En el caso de COX-2, se produjo un incremento significativo de ARNm en el grupo isquémico con RSG+BWA4C al compararse con los animales isquémicos que sólo recibieron RSG.

En cuanto a los niveles proteicos de estos mediadores 24 horas tras la isquemia, el efecto observado fue similar al encontrado en el ARNm (Figura 4.2B). Así, la isquemia indujo la expresión de TNF α , iNOS, MMP9 y COX-2 y ésta se redujo tras el tratamiento con RSG. En el caso concreto del TNF α , su forma activa fue la única que disminuyó tras el tratamiento con RSG. El inhibidor específico de 5-LO BWA4C inhibió el efecto transrepressor de RSG

sobre iNOS, COX-2 y la forma activa de TNF α . En el caso de la expresión proteica de MMP9, el inhibidor de 5-LO no produjo variaciones significativas ni de su forma activa ni de su pro-forma cuando se comparó con el grupo MCAO+RSG.

A



B

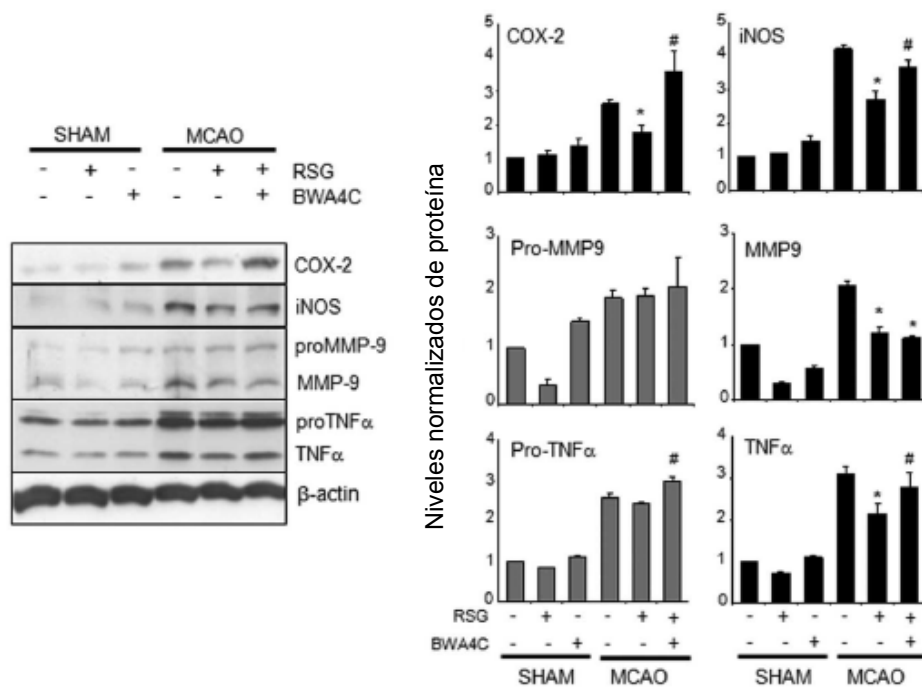


Figura 4.2 Implicación de 5-LO en las acciones anti-inflamatorias de RSG en isquemia cerebral experimental en cerebro de rata. A Niveles normalizados de ARNm de los mediadores pro-inflamatorios COX-2, iNOS, MMP-9 y TNF α por RT-PCR 5 horas tras el procedimiento quirúrgico. (n=3; *p<0,05 vs. MCAO; #p<0,05 vs. MCAO + RSG). **B.** Niveles proteicos normalizados de COX-2, iNOS, y de las formas activas y pro-formas de MMP-9 y TNF α en cerebros de ratas Wistar 24h tras el procedimiento quirúrgico (n=3; *p<0,05 vs. MCAO; #p<0,05 vs. MCAO + RSG).

4.1.3 Estudio del efecto del agonista de PPAR γ RSG sobre la expresión de 5-LO tras isquemia cerebral en rata

Puesto que la actividad 5-LO está implicada en los efectos anti-inflamatorios y neuroprotectores de PPAR γ en isquemia, quisimos determinar el efecto de la activación de PPAR γ en la expresión de 5-LO. Así, llevamos a cabo tres series de experimentos en cerebros de ratas *Wistar*. La primera aproximación se realizó mediante RT-PCR, donde se analizaron los niveles de ARNm de las tres isoformas de lipoxigenasa más importantes en mamíferos (Figura 4.3 A). El ARNm se estudió 5 horas tras el procedimiento quirúrgico en cortezas cerebrales de ratas sham e isquémicas tratadas con RSG o vehículo 10 minutos tras la operación. Los resultados muestran que los niveles de expresión de 12 y 15 lipoxigenasa no sufren ningún cambio ni por el efecto de la isquemia ni por la acción de RSG. Sin embargo, los niveles de 5-LO se incrementaron significativamente tras el tratamiento con RSG en los animales isquémicos.

A nivel de proteína, estudiamos la expresión de 5-LO mediante western blot en homogenados de corteza cerebral 24 horas tras MCAO (Figura 4.3 B). Para comprobar si la inducción de 5-LO dependía de la actividad PPAR γ , realizamos un tratamiento combinado de RSG junto con el antagonista específico de PPAR γ , T0070907. Los resultados indican que el infarto no produce variaciones en la expresión de 5-LO cerebral al comparar la expresión de la enzima entre animales sham e isquémicos. Sin embargo, los animales isquémicos que fueron tratados con RSG presentaron un incremento de los niveles de 5-LO en la corteza cerebral si los comparábamos con los animales sham o isquémicos no tratados. Dicha inducción desaparecía tras el tratamiento conjunto de RSG con T0070907, demostrando que el incremento en los niveles proteicos de 5-LO que se observaba tras el tratamiento con RSG depende específicamente de la actividad PPAR γ .

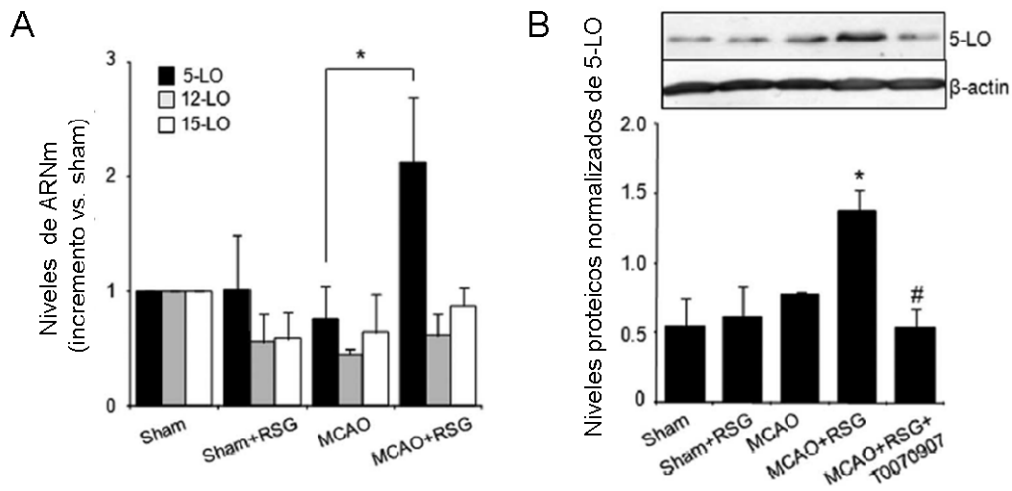


Figura 4.3 Efecto de RSG sobre la expresión de 5-LO en isquemia cerebral experimental. **A.** Niveles de ARNm por RT-PCR de 15, 12 y 5 lipoxigenasa en cerebro de ratas Wistar 5 horas tras isquemia. Los datos se representan a partir de los niveles normalizados de ARNm por la actina sobre el grupo sham ($n=3$; $*p<0,05$ vs MCAO). **B.** Western blot de 5-LO en homogenados de cerebros de ratas Wistar 24 horas tras isquemia. Los niveles de la proteína están normalizados respecto a la actina ($n=3$; $*p<0,05$ vs. MCAO; $\#p<0,05$ vs. MCAO + RSG)

Por último, y con el objeto de localizar en qué tipo de células se expresa 5-LO, llevamos a cabo estudios de inmunofluorescencia de doble marcaje de 5-LO junto con marcadores de fenotipo celular en el tejido cerebral 24 horas tras MCAO (Figura 4.4). Así, los anticuerpos frente a NeuN (neuronas), GFAP (astrocitos) y CD11b (clon OX-42, células mieloides) se detectaron con sus anticuerpos secundarios correspondientes conjugados a Cy3 (rojo). 5-LO se detectó con un anticuerpo secundario conjugado a Alexa 488 (verde) en animales sham e isquémicos tratados con RSG o vehículo 10 minutos tras la operación. A su vez, empleamos el marcador TOPRO (azul) para detectar los núcleos celulares. El análisis de las imágenes de microscopía confocal obtenidas tras la inmunofluorescencia muestra que la localización de 5-LO en las regiones corticales, definidas como áreas peri-infarto en animales isquémicos, se producía fundamentalmente en el citoplasma de las neuronas. Además, en concordancia con los resultados obtenidos por western blot, la intensidad de fluorescencia para la 5-LO neuronal se incrementaba en los animales isquémicos tratados con RSG. Por otro lado, no se detectó expresión de 5-LO en astrocitos ni en células mieloides en las distintas condiciones experimentales estudiadas.

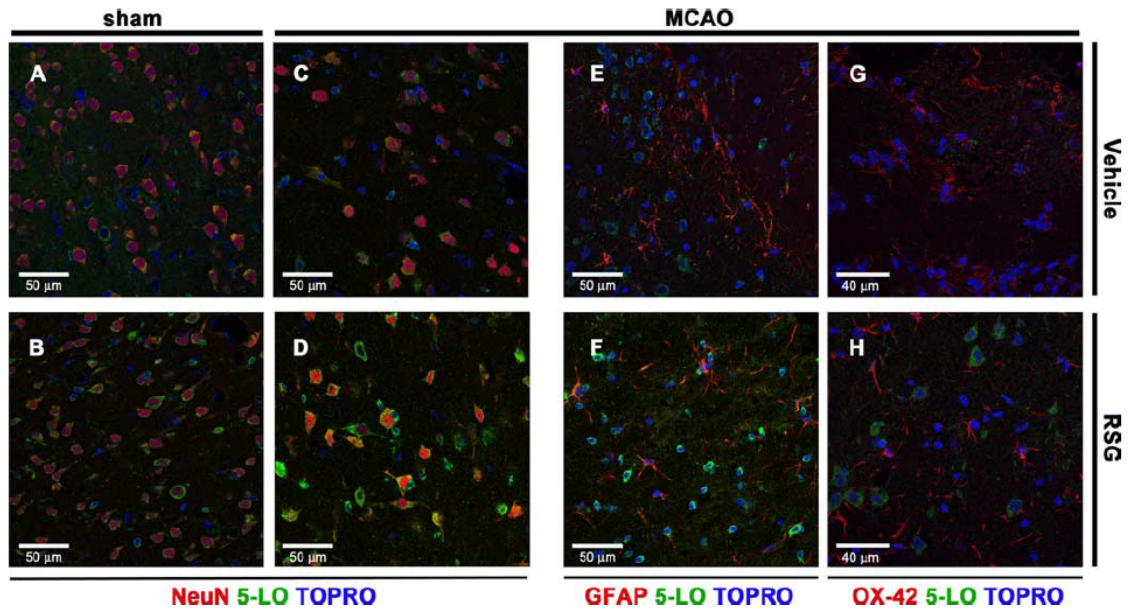


Figura 4.4 Caracterización de la expresión celular de 5-LO por inmunofluorescencia; Expresión de 5-LO en neuronas (NeuN) de animales sham (**A,B**) o isquémicos (**C,D**) 24 horas tras el procedimiento quirúrgico tratados con vehículo o RSG en las áreas peri-infarto de cerebros de ratas Wistar. Localización de 5-LO con el marcador de astrocitos GFAP en cerebros isquémicos tratados con vehículo (**E**) o RSG (**F**). Localización de 5-LO con el marcador de células mieloides OX-42 en animales isquémicos tratados con vehículo (**G**) o RSG (**H**). Las inmunofluorescencias se combinaron con el marcador nuclear TOPRO (azul).

4.2 Estudio de la activación alternativa o M2 en la isquemia cerebral experimental y del papel de la vía PPAR γ -5-LO en este proceso

4.2.1 Estudio del papel de 5-LO en la neuroprotección inducida por RSG en la isquemia cerebral experimental en ratón

Con el objeto de demostrar la implicación de 5-LO en la neuroprotección ejercida por la activación de PPAR γ en ratón, analizamos el volumen de infarto en ratones silvestres y deficientes para 5-LO tratados con RSG. Los resultados indican que el tratamiento con RSG produce una disminución del área infartada del 45% en animales salvajes (wild type, WT) 24 horas tras isquemia (Figura 4.5), efecto que no se observó en los ratones deficientes para la enzima 5-LO. Este efecto confirma que 5-LO está implicada en la neuroprotección inducida por RSG. Además, los animales 5-LO $^{-/-}$ presentaron un volumen de infarto menor que los animales WT no tratados con RSG.

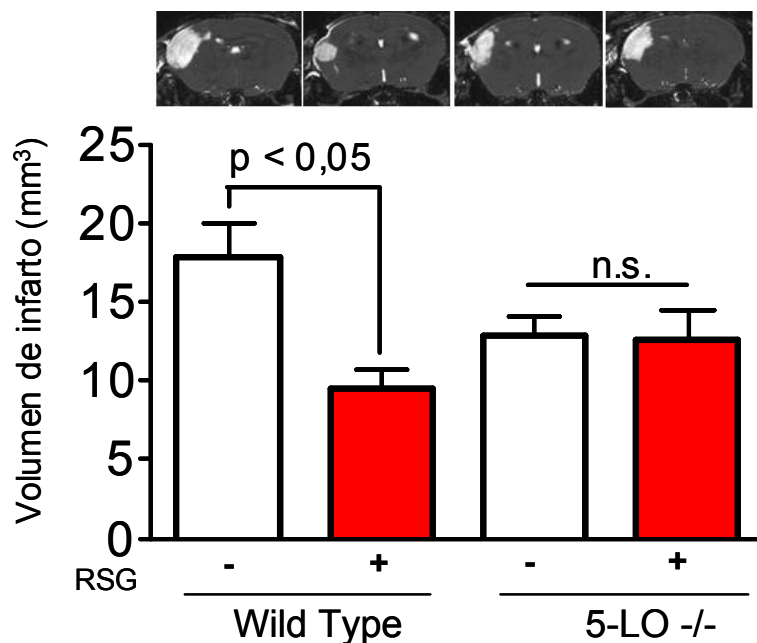


Figura 4.5 Efecto de la delección génica de 5-LO en la neuroprotección inducida por RSG. Volumen del infarto por resonancia magnética potenciada en T2 24 horas tras la operación en animales silvestres (Wild type; WT) o deficientes para 5-LO (5-LO $^{-/-}$) tratados con RSG o vehículo (DMSO) (n=6; p<0,05 en WT+VEH vs. WT+RSG determinado por ANOVA de 1 vía seguido por análisis post-hoc Newman Keuls).

4.2.2 Análisis de la expresión celular de 5-LO en isquemia cerebral experimental en ratón. Efecto de PPAR γ

Como estudio paralelo al realizado en rata, exploramos la localización celular de la expresión de 5-LO inducida por RSG. Así, llevamos a cabo un análisis de la co-localización de la enzima (verde) con el marcador neuronal NeuN (rojo) en cerebros de ratones WT con el mismo fondo genético que los ratones deficientes para 5-LO. Las micrografías obtenidas de la inmunodetección de 5-LO indican que, de manera semejante a lo observado en cerebros de rata, la enzima incrementa su expresión en el cerebro de los ratones isquémicos tratados con RSG al compararlos con los del vehículo (Figura 4.6). Además, los datos muestran que existe una co-localización de 5-LO con el marcador neuronal NeuN. La especificidad del marcaje se evaluó en animales deficientes para la enzima, en los que la ausencia de marcaje para 5-LO validó la especificidad de la técnica empleada.

4.2.3 Estudio del papel de 5-LO en la expresión y señalización de PPAR γ en isquemia cerebral experimental en ratón

El establecimiento de nuestra hipótesis experimental, en la que apuntamos a la implicación de 5-LO en las acciones mediada por PPAR γ , requería establecer cuáles eran las diferencias en la señalización de PPAR γ en animales deficientes y salvajes para esta enzima. Con este fin, caracterizamos la expresión de PPAR γ en este sistema y analizamos su actividad transcripcional.

Los resultados muestran un incremento en la expresión de PPAR γ inducido por la isquemia que no variaba significativamente tras el tratamiento con RSG. Los niveles de expresión de PPAR γ encontrados en los animales sham en las distintas condiciones experimentales estudiadas no mostraron diferencias. Curiosamente, los ratones isquémicos 5-LO $^{-/-}$ presentaron niveles proteicos de PPAR γ superiores a los de los animales WT (Figura 4.7A).

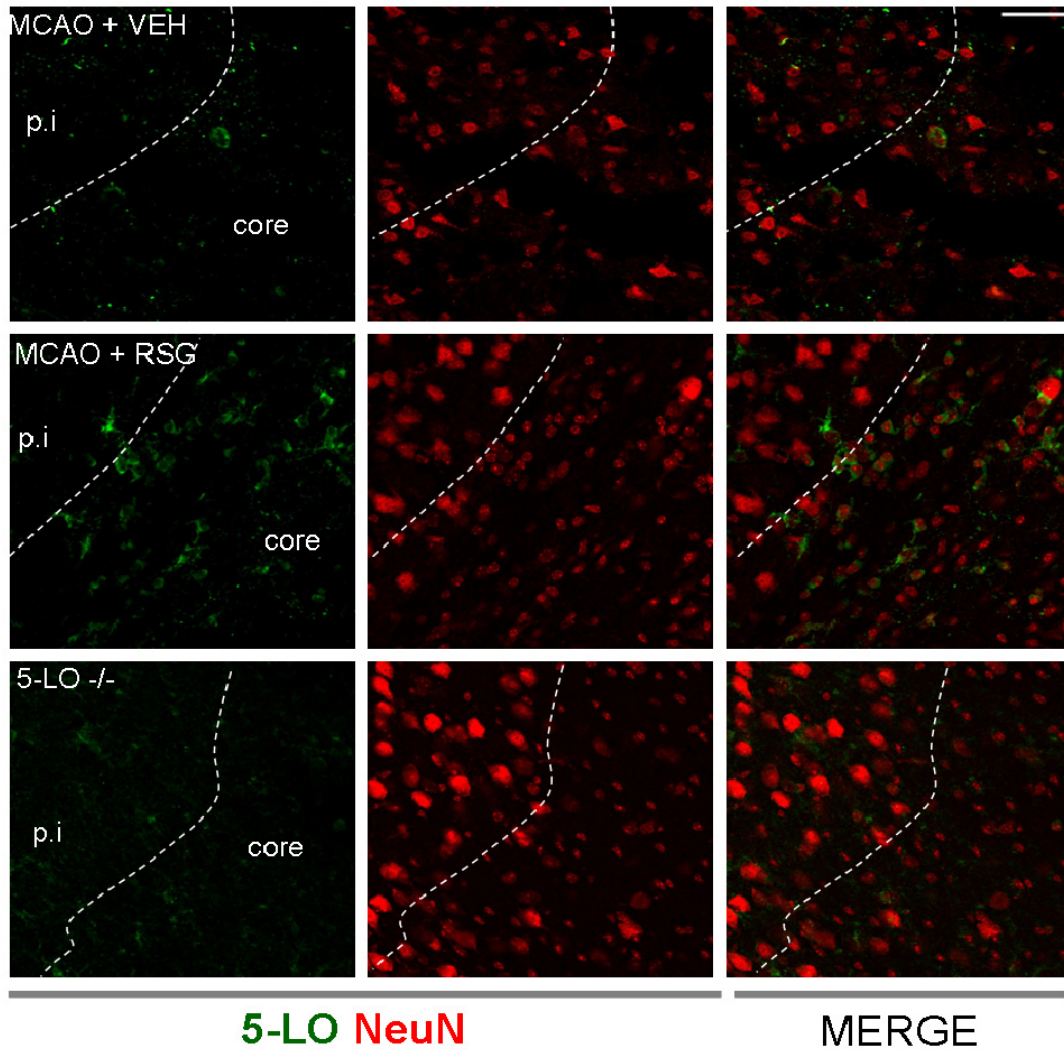


Figura 4.6 Expresión de 5-LO en cerebro isquémico de ratón. Micrografías representativas de la co-localización de 5-LO (verde) con la proteína neuronal NeuN (rojo) en las áreas peri-infarto (p.i) y core del hemisferio ipsilateral del cerebro de ratones tratados con vehículo (MCAO+VEH), rosiglitazona (MCAO+RSG) o en ratones deficientes para 5-LO (5-LO^{-/-}). Las muestras se tomaron 24 horas tras isquemia. Barra de escala 25 μ M

Por otra parte, los resultados de actividad transcripcional indican que RSG incrementa la actividad transcripcional de PPAR γ en animales WT isquémicos como era de esperar. Sin embargo esto no sucede en animales 5-LO^{-/-} (Figura 4.7B) a pesar de la mayor expresión encontrada.

Por último, el gen diana de PPAR γ , CD36, aumenta su expresión tras isquemia, aumento que fue mucho más notable tras el tratamiento con RSG en los animales WT (Figura 4.7C). Sin embargo, este incremento no se produjo en los animales 5-LO^{-/-}. Respecto a las acciones transrepresoras de PPAR γ , la isquemia indujo la expresión de marcadores M1 (TNF α y MCP-1) en el cerebro,

de acuerdo con datos previos (del Zoppo, 2010), efecto que disminuía tras el tratamiento con RSG en los animales WT (Figura 4.7 D y E). Por el contrario, RSG no afectó los niveles de estos mediadores en los animales 5-LO^{-/-}.

Todos estos datos apuntan a que 5-LO es un mediador fundamental de las acciones de PPAR γ .

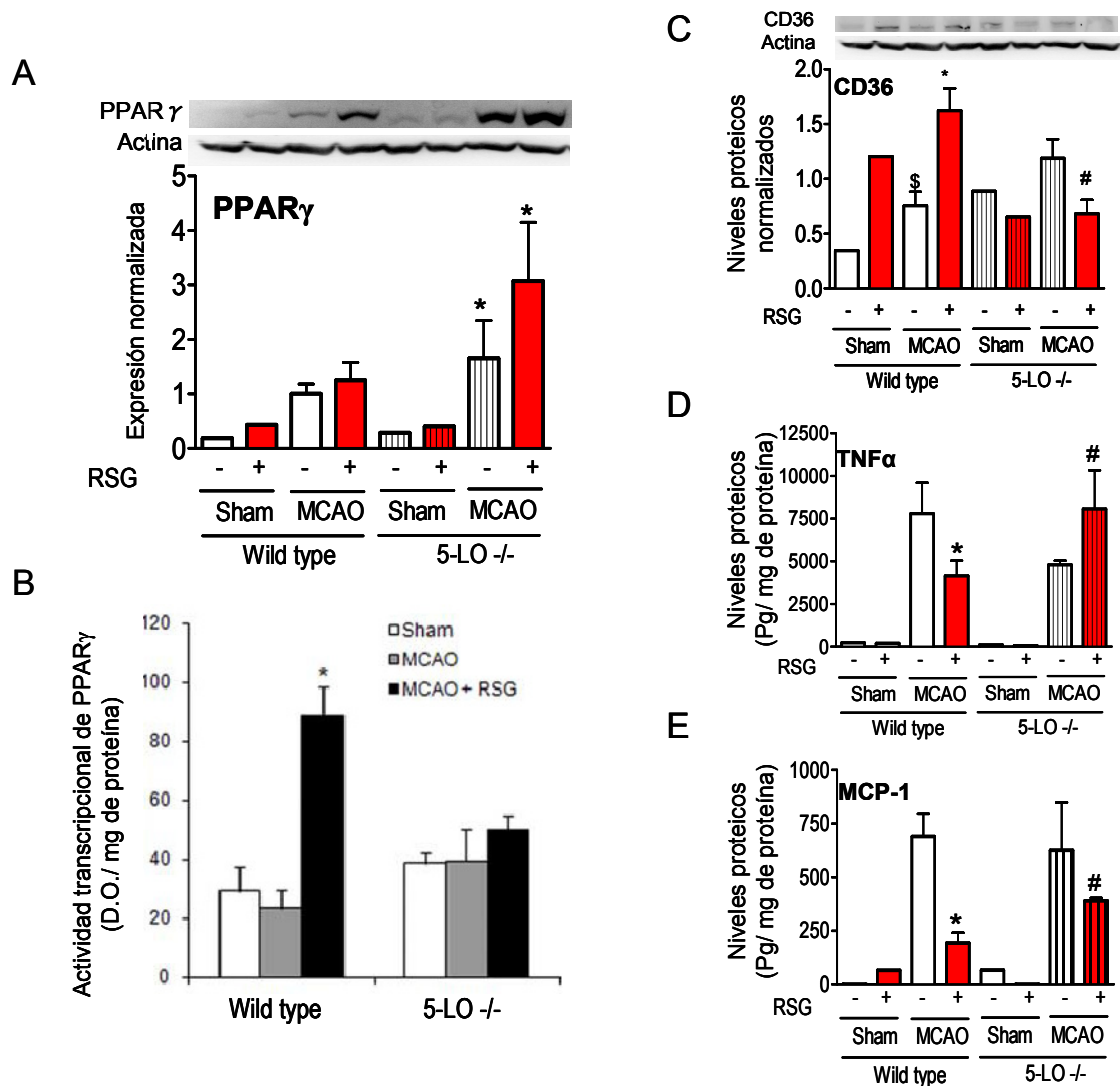


Figura 4.7 Expresión y actividad de PPAR γ en ratones salvajes y 5-LO deficientes. **A.** Expresión proteica de PPAR γ medida por western blot (n=4; *p<0,05 vs. MCAO WT); **B.** Actividad transcripcional del PPAR γ en ratones salvajes y deficientes para 5-LO 24 horas tras isquemia. Los datos de los distintos grupos se representan normalizados respecto a la densidad óptica media (D.O.) obtenida en el kit ELISA del grupo sham wild type (n=6; *p<0,05 vs. MCAO WT); **C.** Expresión proteica del gen diana de PPAR γ CD36 en ratones salvajes y deficientes para 5-LO (n=4; \$p<0,05 vs. sham WT; *p<0,05 vs. MCAO WT; #p<0,05 vs. MCAO+RSG WT). **D** y **E** Niveles de las citoquinas TNF α (D) y MCP-1 (E) normalizados por mg de proteína medidas por CBA (n=4; *p<0,05 vs. MCAO WT; #p<0,05 vs. MCAO+RSG WT).

4.2.4 Estudio de los niveles del producto de 5-LO LXA₄ en isquemia cerebral experimental en ratón. Efecto de PPAR_γ

Puesto que las acciones de 5-LO en nuestro modelo podrían deberse a un incremento en la producción de LXA₄, decidimos evaluar los niveles corticales de esta lipoxina en ratones silvestres y 5-LO deficientes tras isquemia. Los resultados muestran que RSG induce la expresión de LXA₄ en el cerebro isquémico de ratones WT pero no en 5-LO^{-/-} (Figura 4.8). Este estudio corrobora los resultados previos obtenidos por mi grupo de investigación en rata (Sobrado et al., 2009) e indican que el incremento en LXA₄ derivado del tratamiento con RSG depende fundamentalmente de la actividad 5-LO.

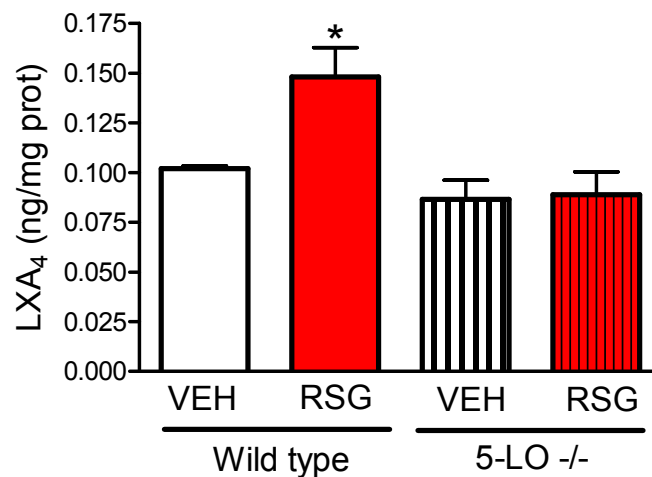


Figura 4.8 Niveles de LXA₄ en corteza cerebral de animales sometidos a MCAO. Niveles de LXA₄ en homogenados cerebrales de la corteza isquémica de animales salvajes y deficientes para 5-LO. Los valores están normalizados por mg de proteína (n=3; *p<0,05 vs. MCAO WT)

4.2.5 Estudio de la activación alternativa o M2 en el cerebro de ratón: efecto de la isquemia y de la vía PPAR_γ-5-LO

Con el fin de caracterizar la implicación de PPAR_γ y de la enzima 5-LO en la polarización alternativa tras isquemia cerebral, procedimos en primer lugar al estudio de los niveles de expresión de los marcadores M2 en el cerebro

isquémico. Así, empleamos la técnica de western blot para evaluar los niveles de expresión proteica de los marcadores M2 arginasa I, CD206 e Ym1. Los resultados muestran que el proceso isquémico es capaz, por sí mismo, de inducir el incremento de expresión de estos marcadores M2 en el cerebro 24 horas tras la isquemia cuando se comparan con los niveles de expresión de los animales sham. Además, el tratamiento con el agonista PPAR γ , RSG, incrementó la expresión de arginasa I en el cerebro isquémico en los animales WT. Este efecto de RSG no se observó en los animales deficientes para 5-LO. En el caso de CD206 e Ym1 no se observaron cambios significativos entre las distintas condiciones experimentales estudiadas dentro de los grupos sham y MCAO (Figura 4.9 A).

Puesto que la isquemia *per se* modifica la expresión de marcadores alternativos, realizamos un análisis de sus niveles, incluyendo a CD36, en el tejido isquémico teniendo en cuenta el volumen del infarto obtenido en los diferentes grupos. Así, podríamos evaluar la contribución del fármaco en la polarización M2 eliminando el sesgo que inducía el tamaño de la lesión. Los datos muestran (Figura 4.9 B) que la expresión de algunos marcadores como Ym1 aumentan al aumentar el volumen del infarto, mientras que otros se comportan al contrario (CD36 y ArgI). Por ello, decidimos normalizar la expresión por el volumen de la lesión. Normalizando en cada uno la expresión por el volumen del infarto encontramos que la inducción en la expresión del marcador CD206 aumentaba en la isquemia por la acción de RSG sólo en animales WT y no en animales 5-LO $^{-/-}$. La normalización por el volumen del infarto, como era de esperar, no varió el comportamiento en expresión de arginasa I y CD36, dado que su inducción por RSG en las mediciones no normalizadas indicaban ya una inducción por RSG dependiente de 5-LO. Cuando se normalizó la expresión de Ym1 por volumen de infarto, los resultados indicaron que este marcador se induce en el cerebro isquémico por acción de RSG tanto en animales WT como deficientes para 5-LO.

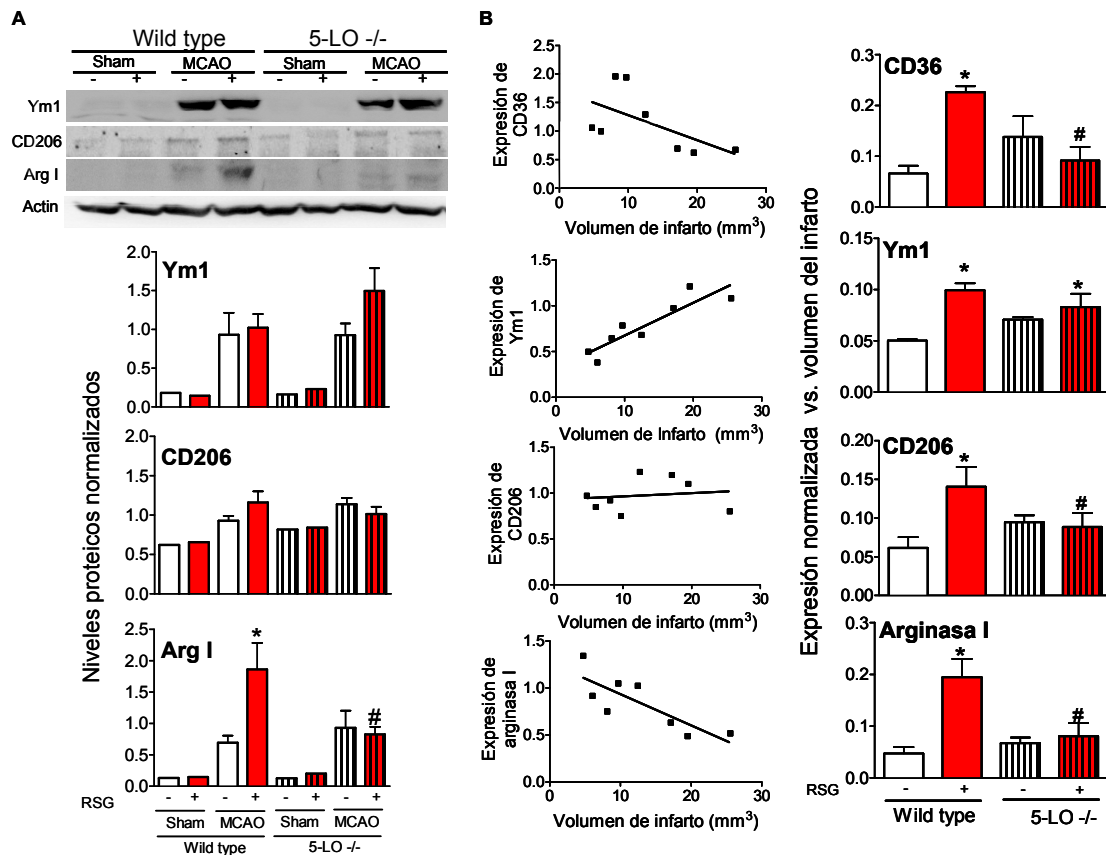


Figura 4.9 Expresión cortical de marcadores M2. **A.** Western blots de los marcadores M2 Ym1, CD206 y arginasa I 24 horas tras isquemia (n=5; *p<0,05 vs. MCAO WT; #p<0,05 vs. MCAO WT + RSG). **B.** Normalización de la expresión proteica respecto al volumen del infarto. Regresiones lineales de los marcadores estudiados, incluyendo a CD36, y representación del valor normalizado por el tamaño de la lesión. (n=3; *p<0,05 vs. MCAO WT; #p <0,05 vs. MCAO WT + RSG)

4.2.6 Análisis de la localización celular de marcadores M2 en el cerebro isquémico en ratón

Para determinar el tipo celular responsable de la expresión de los marcadores M2 en la isquemia, nos servimos en primer lugar de la técnica de citometría de flujo para el estudio de células que expresan CD36 y arginasa I. De esta forma, mediante disociación mecánica del tejido isquémico, obtuvimos una suspensión celular que se incubó junto con los marcadores de linaje CD45 (leucocitos) y CD11b (células mieloides). Esta técnica experimental, descrita en el apartado correspondiente, es un método optimizado para el aislamiento y caracterización de leucocitos en el cerebro, incluida la microglía (Campanella et

al., 2002). Dado que la citometría de flujo permite una cuantificación rápida del número de células positivas para estos marcadores, decidimos incluir tres grupos experimentales en el estudio con el fin de corroborar los resultados obtenidos por la técnica de western blot. De tal modo, los animales empleados fueron tratados con vehículo, RSG o RSG + el inhibidor específico de 5-LO, BWA4C, todos ellos administrados, como siempre, 10 minutos tras la isquemia. Los resultados obtenidos fueron los siguientes:

-Poblaciones celulares obtenidas tras la disgregación de cerebros sham e isquémicos: En primer lugar observamos que el número de células que se obtiene en los animales isquémicos es muy superior al de los animales sham (Figura 4.10 A). Este hecho, que discutiré posteriormente, no permitió determinar diferencias en los tipos celulares obtenidos entre los animales sham e isquémicos por el bajo rendimiento en la obtención de células en el grupo sham. Sin embargo, en el caso de los animales isquémicos, encontramos dos fenotipos claros de células que expresan el marcador mielóide CD11b. La primera subpoblación y más numerosa eran células CD45^{low}, que han sido caracterizadas como microglía activada de la región isquémica (Campanella et al., 2002). La segunda subpoblación mielóide encontrada expresaba mayores niveles de CD45, lo que se ha definido como células de infiltración, principalmente monocitos y neutrófilos (Campanella et al., 2002). La positividad de marcaje para estos antígenos se determinó en base a la intensidad de fluorescencia de los controles isotópicos que empleamos en el experimento.

- Localización de la expresión de CD36: Estudios de co-localización utilizando un anticuerpo que reconocía CD36 junto con los marcadores de linaje CD45 y CD11b en la suspensión celular obtenida del tejido isquémico mostraron que la expresión de CD36 tras isquemia se detectaba en células mieloides CD45^{low} CD11b⁺, característico de la microglía (Campanella et al., 2002) (Figura 4.10 B). La cuantificación de estas células CD36⁺ en los diferentes grupos experimentales mostró que RSG incrementaba el porcentaje y el número de células microglía residente que expresan CD36 en comparación con el grupo isquémico tratado con vehículo. El tratamiento combinado de RSG junto con el inhibidor específico de 5-LO, BWA4C, disminuyó significativamente

el porcentaje y número de células que expresaban este marcador cuando se comparó con los animales isquémicos tratados con RSG. Estos resultados están de acuerdo con los obtenidos por western blot, confirmando que la inducción de CD36 tras el tratamiento con RSG depende de 5-LO.

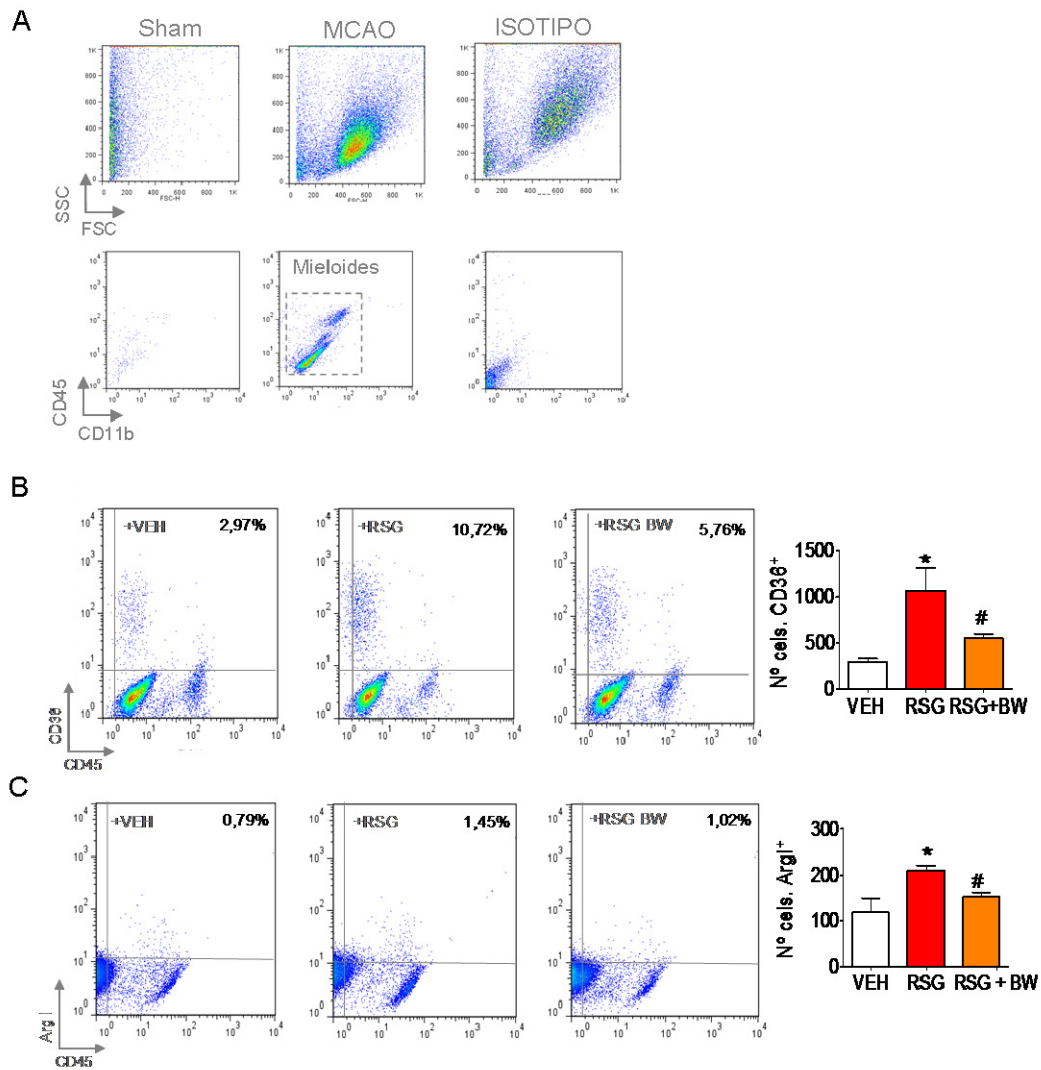


Figura 4.10 Localización de los marcadores M2 CD36 y arginasa I por citometría de flujo. **A** Diagramas de puntos representativos de la disgregación celular en animales sham e isquémicos, junto con su control isotípico. Los diagramas superiores muestran la disposición de las células en función de su tamaño y complejidad. Los diagramas inferiores representan a las células en función de la expresión de los antígenos CD45 y CD11b, donde se observa que los animales isquémicos presentan dos subpoblaciones CD11b⁺ que expresan distintos niveles de CD45. **B** Diagramas de puntos representativos de la expresión de CD36 de la subpoblación mieloide en base a la expresión de CD45 en los distintos grupos experimentales. La positividad para CD36 se estableció en base a su control isotípico. En la parte superior de los diagramas se muestra el porcentaje medio de células que expresan CD36 en cada tratamiento. La gráfica indica, en número normalizado por el total de eventos celulares obtenidos, el total de células CD36⁺ (n=3; *p<0,05 vs. MCAO VEH; #p<0,05 vs. MCAO RSG). **C** Representación de la expresión de arginasa I. Las representaciones se realizaron de igual manera que para CD36 (n=3; *p<0,05 vs. MCAO VEH; #p<0,05 vs. MCAO RSG).

-Localización de la expresión de arginasa I: Su expresión resultó ser más heterogénea y la positividad para el marcaje menos intensa que la encontrada para CD36 (Figura 4.10 C). Aun así, en base al control isotópico, conseguimos determinar la población celular positiva para arginasa I. Esta población, al igual que con CD36, era mayoritariamente microglía, caracterizada como CD45^{low} CD11b⁺, aunque también existían células que expresaban la proteína que presentaban un fenotipo CD45^{high} CD11b⁺, que corresponde a las células mieloides infiltradas (Campanella et al., 2002). El tratamiento con RSG incrementó el porcentaje de células que expresaban el marcador arginasa I. Además, el inhibidor específico de 5-LO, BWA4C, disminuyó el porcentaje de células que expresaban arginasa I cuando se comparó con el grupo de animales isquémicos tratados con RSG. Estos resultados, aunque con diferencias cuantitativas menores, están de acuerdo con los obtenidos por western blot, confirmando también que la inducción de arginasa I tras el tratamiento con RSG depende de 5-LO.

Adicionalmente, utilizamos la técnica de inmunofluorescencia para localizar el tipo celular responsable de la expresión de CD206 e Ym1. Con este fin, se evaluó la co-localización de estos marcadores (verde) con los marcadores celulares (rojo) NeuN (neuronas), GFAP (astrocitos), Iba1 (microglía) y NIMPR14 (neutrófilos). Los resultados muestran que las células CD206⁺ co-localizan principalmente con el marcador para neutrófilos NIMPR14 (Figura 4.15 A y D). Su expresión no se detectó ni en neuronas, ni en astrocitos, ni en la microglía cerebral (Figura 4.11 D). Este hecho indica que, al contrario de los resultados obtenidos para CD36 y arginasa I, el componente celular mayoritario que expresa CD206 tras la isquemia son los neutrófilos infiltrados en el área lesionada. La expresión de Ym1 por inmunofluorescencia mostró que, al igual que CD206, las células NIMPR14⁺ expresaban Ym1 tras la isquemia (Figura 4.11 A y D). Tampoco se detectó expresión de Ym1 ni en neuronas, ni en astrocitos, ni en microglia (Figura 4.11 C). Estos datos están de acuerdo con los obtenidos por western blot que muestran su dependencia del tamaño del infarto, zona en la que se localizan principalmente los neutrófilos.

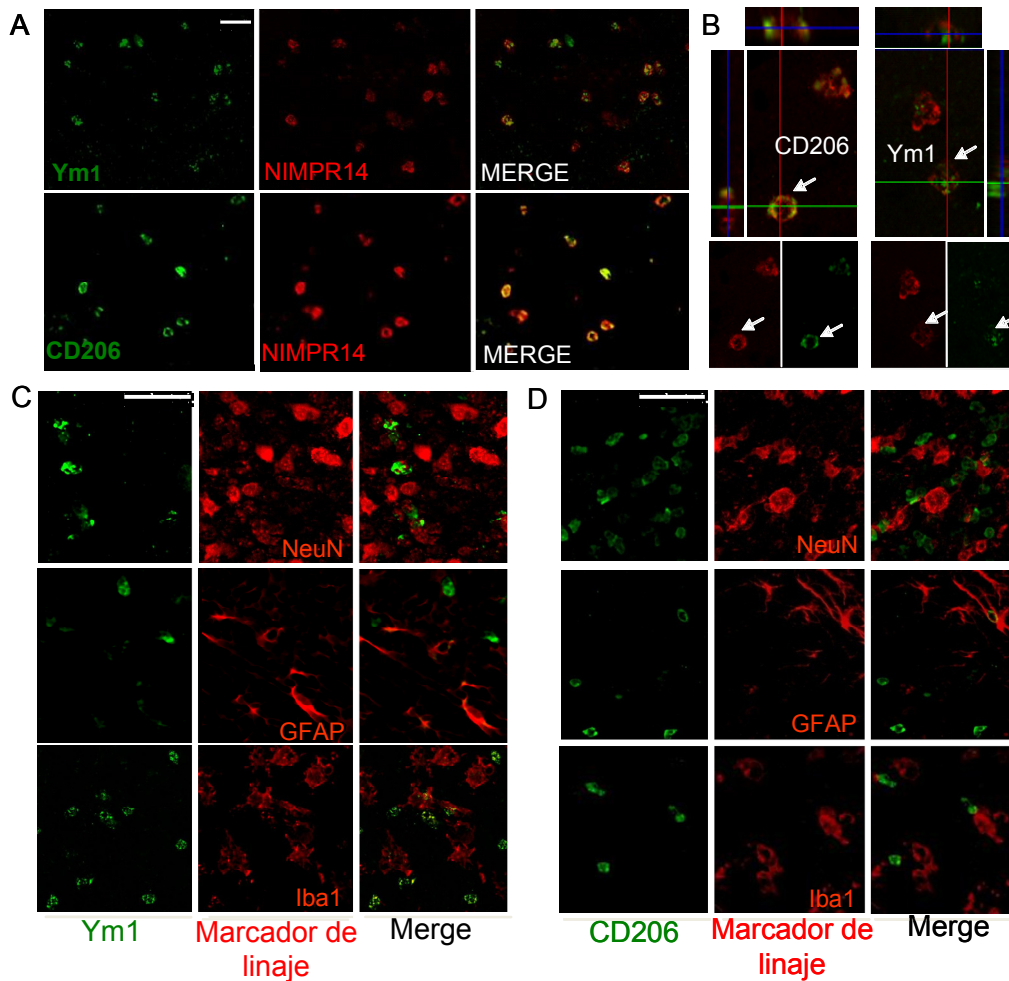


Figura 4.11 Localización de los marcadores M2 Ym1 y CD206 por inmunofluorescencia en el cerebro isquémico. **A.** Micrografías representativas de la co-localización de Ym1 y CD206 (verde) con el marcador de neutrófilos NIMPR14 (rojo). La barra de escala indica 25 μ m; **B.** Proyección ortogonal de la co-localización de CD206 e Ym1 (verde) con NIMPR14 (rojo). La flecha blanca indica la célula seleccionada para el análisis de co-localización, donde se observa una expresión en membrana de CD206 (panel izquierdo) y una expresión citoplasmática para Ym1 (panel derecho); **C y D.** Co-localización de Ym1 (**C**) y CD206 (**D**) con los marcadores de linaje celular (rojo) NeuN (neuronas), GFAP (astrocitos) e Iba1 (microglía); la barra de escala indica 25 μ m. Todas las micrografías representadas han sido obtenidas de animales isquémicos tratados con RSG y sacrificados 48h tras la isquemia, en el core de la lesión isquémica. Las co-localizaciones no mostraron diferencias en la expresión de estos marcadores entre los distintos grupos experimentales estudiados (WT, 5-LO^{-/-}). Así, el grupo MCAO WT+RSG seleccionado en las imágenes es representativo de la co-localización de estos marcadores para el resto de los grupos experimentales estudiados

Además de la co-localización de Ym1 con NIMPR14, encontramos un número importante de células que expresaban Ym1 pero que eran negativas para todos los marcadores de linaje empleados, incluido NIMPR14 (Figura 4.12). Al estudiar la co-localización de Ym1 con el marcador de células mieloides CD11b, encontramos que todas las células Ym1 eran CD11b⁺. A la

vista de estos resultados, definimos una subpoblación de células Ym1 como $CD11b^+ Iba1^- NIMPR14^-$, definida en la bibliografía como monocitos (Ajami et al., 2011). Puesto que nuestro objetivo es el estudio de los marcadores M2, nos centramos en esta población, en la que exploramos la dependencia de 5-LO tras el tratamiento con RSG. Con este propósito, llevamos a cabo un estudio estereológico, mediante el método del fraccionador óptico, de las células $Ym1^+ NIMPR14^-$ en animales WT y 5-LO^{-/-} tratados con RSG o vehículo y sacrificados 24 y 48 horas tras la isquemia. Los resultados muestran que la subpoblación infiltrada de monocitos $Ym1^+$ incrementaba en el cerebro 48 horas tras la isquemia por acción de RSG y que este efecto era dependiente de 5-LO, ya que en los animales 5-LO^{-/-} tratados con RSG el número de células $Ym1^+ NIMPR14^-$ fue menor (Figura 4.12). Las cuantificaciones obtenidas a 24 horas tras isquemia no mostraron diferencias significativas entre los distintos grupos analizados.

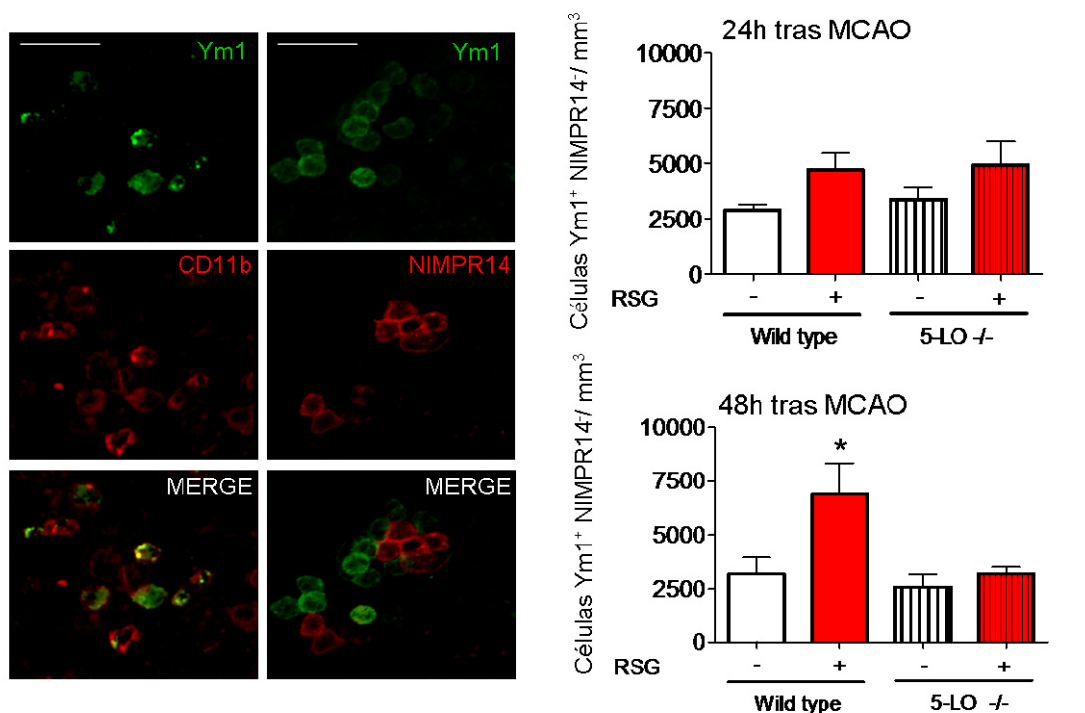


Figura 4.12 Análisis por estereología de la subpoblación $CD11b^+Ym1^+NIMPR14^-$. Micrografías de la subpoblación celular definida como monocitos $Ym1^+$. Gráficas de la densidad de monocitos encontrada en el área infartada 24 y 48h tras la isquemia. Los datos se representan como el número de células cuantificadas por el método del disector óptico y normalizadas por el volumen de tejido muestreado cuantificado por Cavalieri. En todos los casos, el área de muestreo se limitó al tejido isquémico dañado, único lugar donde se localizaban estas células. (n=4; *p<0,05 vs. MCAO WT). Las barras de escala indican 25 μ m.

En relación a la población de neutrófilos NIMPR14⁺, los resultados obtenidos por el método del fraccionador óptico indican que, tanto a 24 como a 48 horas tras la isquemia, la población de neutrófilos Ym1⁻ es la mayoritaria en los animales WT tratados con vehículo. En cambio, el tratamiento con RSG en estos animales indujo un aumento del número de neutrófilos Ym1⁺ presentes en la lesión isquémica. Este número superó al de los neutrófilos Ym1⁻ 48 horas tras la isquemia (Figura 4.13).

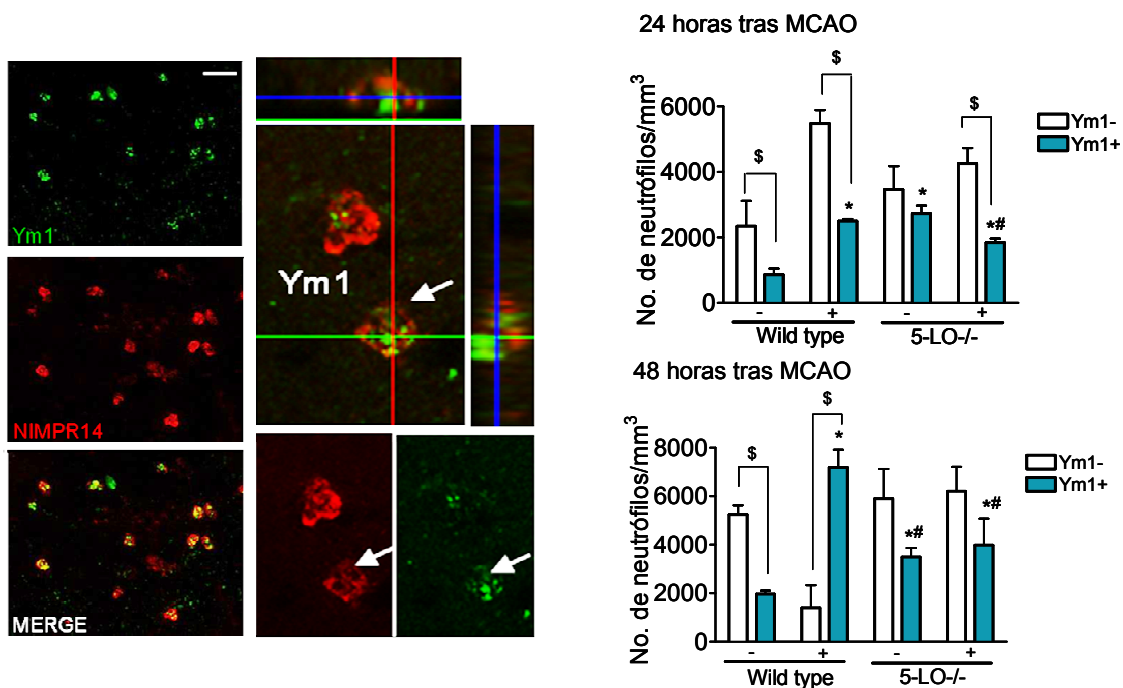


Figura 4.13 Análisis por estereología de la subpoblación de neutrófilos encontrados en la lesión isquémica. Micrografías de la subpoblación celular definida como neutrófilos Ym1⁺. Gráficas de la cuantificación de la densidad de neutrófilos Ym1⁺/Ym1⁻ encontrada en el área infartada 24h y 48h tras la isquemia. Los datos se representan como el número de células cuantificadas por el método del disector óptico normalizadas por el volumen de tejido muestreado cuantificado por Cavalieri. En todos los casos, el área de muestreo se limitó al tejido isquémico dañado, único lugar donde se localizaban estas células. (n=4; *p<0,05 vs. MCAO WT; #p<0,05 vs. MCAO + RSG WT; \$p<0,05 vs. Indicado (t-test)). Las barras de escala indican 25µm.

En el caso de los animales 5-LO^{-/-}, nuestros resultados indican la presencia de un mayor número de neutrófilos Ym1⁺ en la lesión isquémica, tanto a 24h como a 48h tras la isquemia, al compararse con los animales WT tratados con vehículo. El tratamiento con RSG en estos animales no indujo un aumento en el número de neutrófilos Ym1⁺, indicando que la actividad 5-LO es importante para la expresión de Ym1 por los neutrófilos (Figura 4.13).

4.2.7 Caracterización de la fagocitosis de neutrófilos por microglía/macrófagos en isquemia cerebral en ratón. Efecto de la vía PPAR γ -5-LO

Como uno de los mecanismos implicados en la resolución de la inflamación es la fagocitosis de los neutrófilos infiltrados por los macrófagos/microglía activados del área lesionada, decidimos estudiar este proceso 48 horas tras la isquemia. Para ello, evaluamos el número de eventos de co-localización entre el marcador microglial Iba1 (verde) y el marcador de neutrófilos NIMPR14 (rojo) en distintas secciones representativas del eje rostro-caudal de la lesión isquémica en animales salvajes y deficientes para 5-LO tratados con RSG o vehículo.

Las micrografías obtenidas muestran la existencia de co-localización entre neutrófilos y microglía, tanto en las zonas perinfarto como en el core, indicando la existencia de un proceso de fagocitosis de los neutrófilos infiltrados (Figura 4.14). En estas regiones cuantificamos el porcentaje de co-localización Iba1/NIMPR14. Nuestros resultados indican que, a 48 horas tras la isquemia, un $12,9\pm 4,8\%$ de microglía activada del área lesionada co-localiza con el marcador de neutrófilos. En el caso de los animales tratados con RSG, este porcentaje se incrementa hasta alcanzar el $27,7\pm 10,2\%$ (Figura 4.14). Por el contrario, RSG no afectó el porcentaje de co-localización en los animales 5-LO-/-.

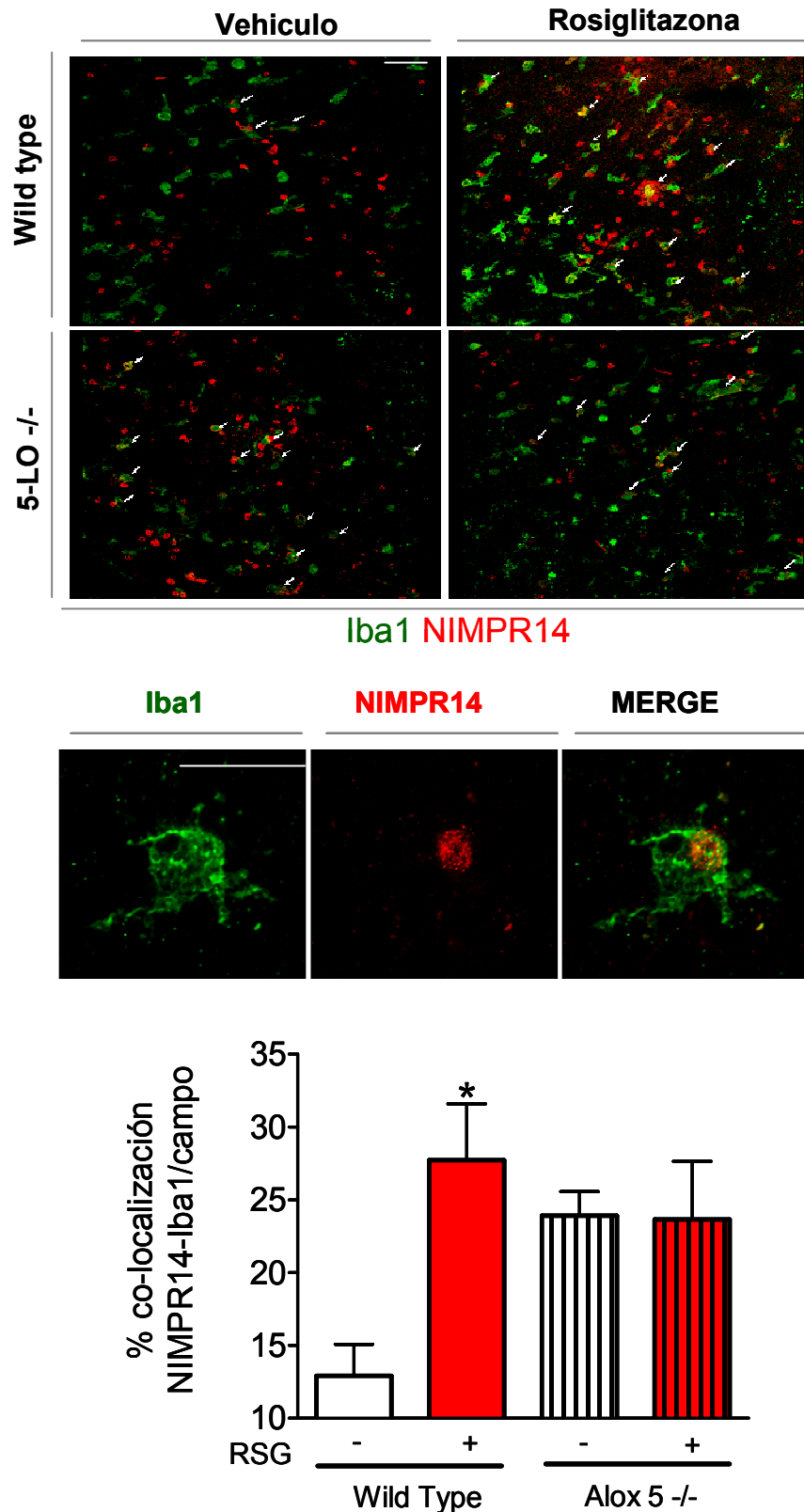


Figura 4.14 Fagocitosis de neutrófilos por la microglía cerebral 48 horas tras MCAO en ratones WT y 5-LO^{-/-}. **Efecto de RSG.** El panel izquierdo muestra los campos representativos, tomados con el objetivo de magnificación 20x, de la co-localización de NIMPR14 (rojo) con Iba1 (verde) en animales WT y 5-LO^{-/-}. Las flechas indican los eventos cuantificados. La barra de escala indica 50µm. En la gráfica se representa el porcentaje de células que co-localizan por campo en relación a la microglía total (células Iba1⁺) existente en dicho campo (n=4; *p<0,05 vs. MCAO WT). El panel superior derecho muestra una micrografía ampliada de un evento de fagocitosis, en el que se observa la co-localización entre un neutrófilo (rojo) con la microglía (verde). La barra de escala indica 10µm.

4.3 Efecto del producto de 5-LO LXA₄ en neuroprotección y activación M2

4.3.1 Estudio del efecto neuroprotector de LXA₄ en isquemia cerebral experimental en rata

Como hemos mostrado anteriormente, los niveles de LXA₄ derivado de la actividad 5-LO, aumentan en el cerebro isquémico de los animales WT tratados con RSG, lo que sugiere que este producto puede mediar los efectos de 5-LO. Para estudiar sus acciones, decidimos evaluar si la administración de esta lipoxina tras el proceso isquémico era capaz de inducir neuroprotección. Los resultados obtenidos muestran que la inyección intracerebroventricular (i.c.v) de 1 nmol de LXA₄ tras MCAO disminuye significativamente el volumen del infarto en ratas *Wistar* si lo comparamos con los volúmenes de infarto obtenidos en el grupo control (Figura 4.14). Puesto que nuestros experimentos sobre la señalización PPAR_γ mostraban que la actividad transcripcional de este receptor estaba ausente en animales 5-LO^{-/-} (Figura 4.7 B), utilizamos un antagonista PPAR_γ para estudiar si las acciones de LXA₄ eran dependientes de este receptor. En efecto, T0070907 revirtió el efecto neuroprotector de LXA₄, sugiriendo que la neuroprotección que producía este metabolito de 5-LO se debe, al menos en parte, a la activación del receptor PPAR_γ. El tratamiento con T0070907 no afectó el volumen del infarto.

4.3.2 Caracterización de la producción de LXA₄ *in vitro*

Puesto que 5-LO es la principal enzima responsable de la producción de LXA₄ y su expresión se localiza en el citoplasma de las neuronas tratadas con RSG, decidimos analizar la producción endógena de LXA₄ por neuronas *in vitro*. En primer lugar, se trataron cultivos de neuronas corticales de rata con RSG en ausencia o presencia de T0070907 para estudiar si existía una inducción de 5-LO dependiente de PPAR_γ, tal y como habíamos observado en los estudios *in vivo*. 18h tras el tratamiento, se procedió al estudio por

inmunofluorescencia de la co-localización del marcador neuronal NeuN (rojo) y 5-LO (verde) (Figura 4.15). Los resultados obtenidos muestran que, en el caso de las neuronas tratadas con RSG, existe un incremento en la inmunorreactividad para 5-LO respecto a las neuronas control y que dicha intensidad se reducía tras el tratamiento conjunto de RSG y T0070907. Estos resultados indican que RSG induce 5-LO en cultivos neuronales y que este efecto es dependiente de PPAR γ . La inducción de 5-LO por RSG en neuronas se demostró también a nivel de ARNm por RT-PCR 8 horas tras el tratamiento (Figura 4.16A). Este experimento se llevó a cabo en paralelo en cultivos de astrocitos de rata, tipo celular en el que no conseguimos detectar una inducción de 5-LO tras el tratamiento con RSG, aunque sí detectamos niveles basales de ARNm de 5-LO

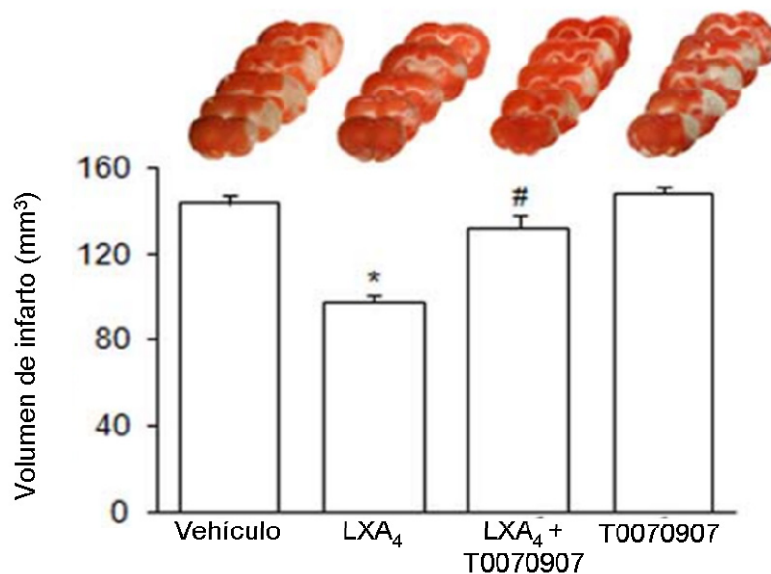


Figura 4.14 Estudio del efecto neuroprotector de LXA₄ en isquemia cerebral experimental en rata. Volúmenes de infarto determinados por TTC en los distintos grupos experimentales 48 horas después de isquemia. (n=6; *p<0,05 vs. MCAO+vehículo; #p<0,05 vs. MCAO+LXA₄).

Con la intención de correlacionar los niveles de 5-LO celulares con los niveles de LXA₄, determinamos la cantidad de LXA₄ presente en los sobrenadantes de cultivos de neuronas y astrocitos tratados con RSG. Los resultados obtenidos indican que RSG induce la producción de LXA₄ en

neuronas (Figura 4.16B). Al contrario de los resultados obtenidos en las neuronas, no conseguimos detectar LXA₄ en los sobrenadantes de los cultivos de astrocitos.

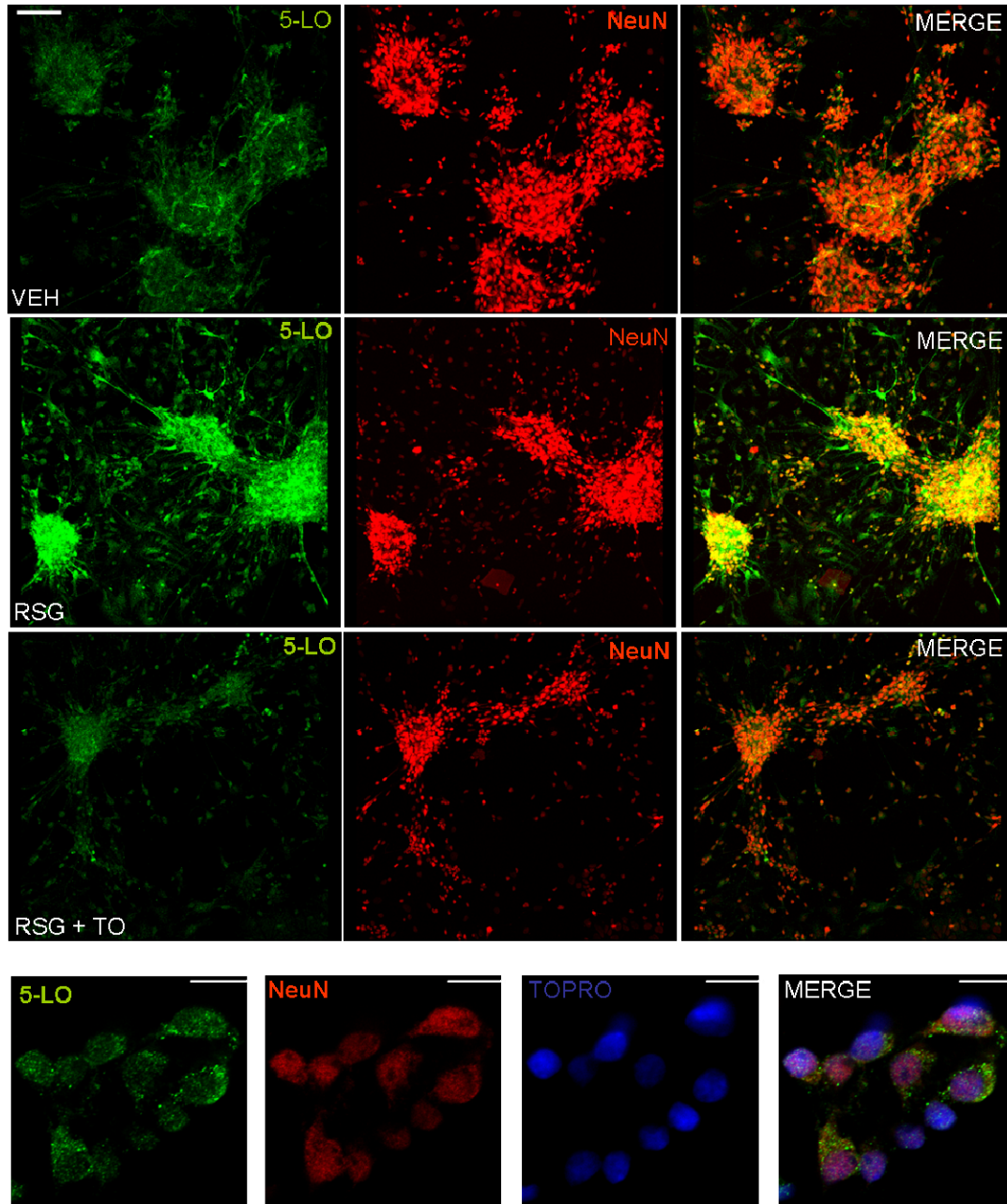


Figura 4.15 Inducción de 5-LO en cultivos neuronales. Micrografías representativas de la expresión de 5-LO (verde) en neuronas (rojo) de corticales de ratas *Wistar* tratadas durante 18 horas con vehículo (VEH), 1 μ M de rosiglitazona (RSG) o con una combinación de 1 μ M de RSG con 2 μ M de T0070907 (RSG +TO). La barra de escala representa 100 μ m. El panel inferior muestra una ampliación de la expresión de 5-LO en las neuronas tratadas con RSG. La micrografía muestra también la co-localización con el marcador nuclear TOPRO (azul). Barra de escala 15 μ m.

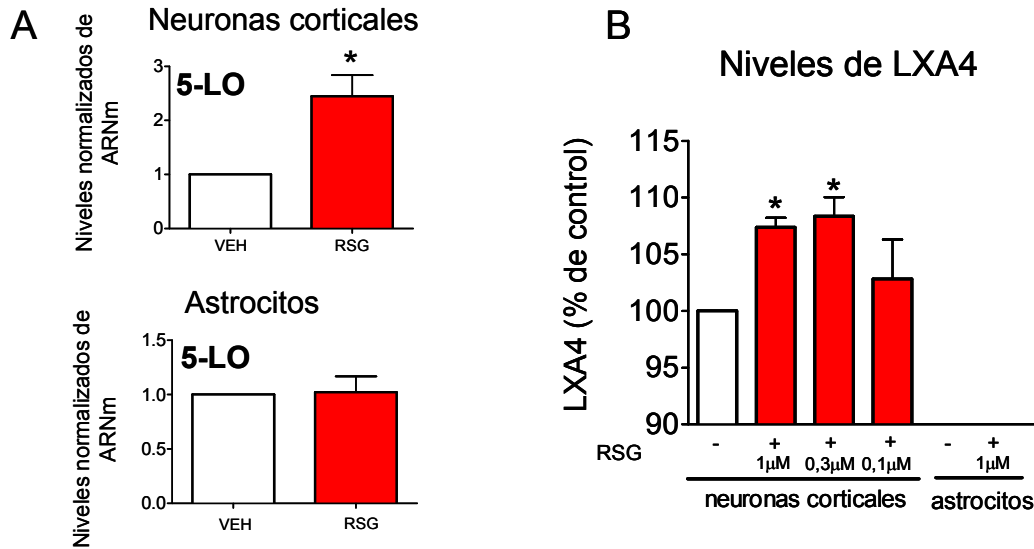


Figura 4.16 Efecto de RSG en la expresión de 5-LO y en la producción de LXA₄ *in vitro*. **A** Niveles de ARNm de 5-LO medidos por RT-PCR y normalizados por actina en neuronas y astrocytes tratados con vehículo (VEH) o rosiglitazona 1 μ M (RSG) (n=3; *p<0,05 vs. vehículo). **B.** Niveles de LXA₄ de sobrenadantes de cultivos de neuronas o astrocytes. Los datos se representan como el porcentaje de inducción respecto al vehículo (100%) (n=3; *p<0,05 vs. vehículo).

4.3.3 Estudio *in vitro* del efecto de LXA₄ en la activación M2 y en la función fagocítica de macrófagos

Finalmente, decidimos explorar el efecto directo de LXA₄ sobre cultivos de macrófagos. En concreto, quisimos determinar si LXA₄ inducía la expresión de marcadores M2 en cultivos de macrófagos murinos de la línea celular RAW 264.7. Los resultados indican un aumento de la transcripción de ARNm de los marcadores M2 CD36, CD206, Ym1 y arginasa I 5 horas tras la incubación con LXA₄ respecto a los macrófagos control (Figura 4.17), lo que indica que este compuesto es capaz de producir la polarización del macrófago hacia un fenotipo M2.

Además de la polarización M2 que inducía LXA₄, quisimos estudiar si este producto de 5-LO era capaz de inducir cambios en la función fagocítica de los macrófagos. Para este propósito, llevamos a cabo un ensayo de fagocitosis *in vitro* utilizando macrófagos de la médula ósea diferenciados con M-CSF y

bolas de látex conjugadas a fluoresceína. El análisis de la intensidad de fluoresceína (FL1) presente en las suspensiones celulares de macrófagos indica que un pretratamiento previo de 3 horas con LXA₄ incrementa el índice de fagocitosis de los macrófagos M-CSF cuando se compara con macrófagos control (Figura 4.18). La incubación de las células con yoduro de propidio (PI) muestra que LXA₄ no produce cambios a nivel de muerte celular al compararse con los macrófagos control a los tiempos estudiados. Así, de manera concomitante con una polarización M2, LXA₄ aumenta la función fagocítica en el macrófago.

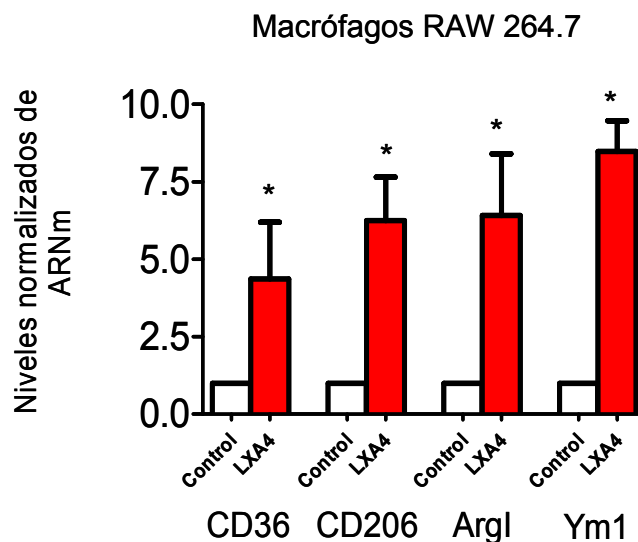


Figura 4.17 Efecto de LXA₄ en la expresión de marcadores M2 en macrófagos. Niveles de ARNm de los marcadores M2 CD36, CD206, arginasa I e Ym1 medidos por RT-PCR y normalizados por actina en cultivos de macrófagos RAW 264.7 tratados con 300nM de LXA₄ o vehículo. Los datos se representan como inducción respecto a control (n=3; *p<0,05 vs. vehículo)

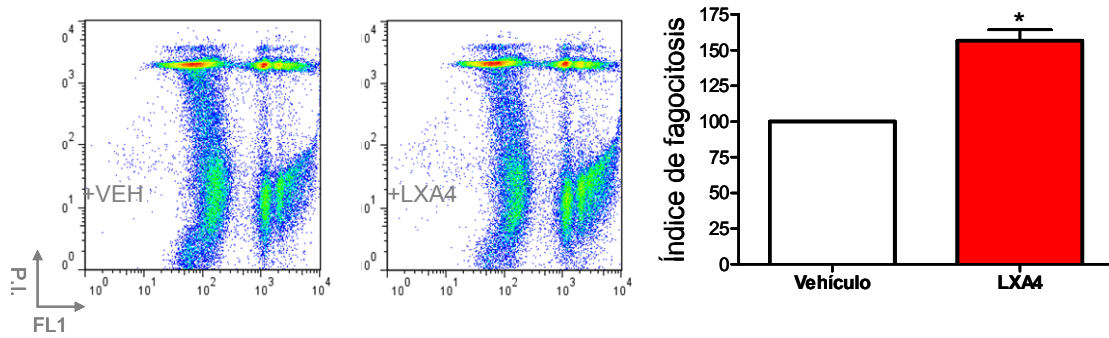


Figura 4.18 Efecto de LXA₄ en la función fagocítica de macrófagos de médula ósea. Diagramas de puntos representativos del ensayo de fagocitosis *in vitro* donde se muestra la intensidad de fluorescencia para el yoduro de propidio (P.I.) y para la fluoresceína (FL1). Los resultados se expresan como el incremento del índice de fagocitosis (intensidad de fluorescencia para FL1 x número de células FL1+) respecto al vehículo (100x); (n=4; *p<0,05 vs. vehículo)

V Discusión

5.1 PPAR γ y neuroprotección: Papel de 5-LO

De acuerdo con resultados previos obtenidos en rata en mi laboratorio, nuestros datos confirman que la administración aguda de RSG es neuroprotectora en un modelo de isquemia experimental en ratón. Esto se demuestra por una disminución del área infartada del 45% respecto a los animales tratados con vehículo. Dicho resultado está de acuerdo con varios trabajos en la literatura que demuestran que la administración de agonistas PPAR γ durante la fase aguda disminuye el volumen del infarto en diferentes modelos animales de isquemia (ver tabla 1.5). Estos efectos se han asociado con las propiedades anti-inflamatorias derivadas de la activación de PPAR γ (Nakamura et al., 2007; Pereira et al., 2006; Sundararajan et al., 2005), así como con efectos anti-oxidantes (Pereira et al., 2005; Shimazu et al., 2005; Tureyen et al., 2007).

Nuestros estudios de neuroprotección por RSG llevados a cabo en ratones 5-LO $^{-/-}$ muestran que RSG sólo inducía neuroprotección en los animales salvajes. Estos datos apoyan la teoría de que los metabolitos derivados de la actividad 5-LO juegan un papel clave en la neuroprotección mediada por la activación de PPAR γ y corroboran estudios previos realizados en rata que muestran un aumento muy temprano en el ARNm de 5-LO en el cerebro isquémico de ratas tratadas con rosiglitazona (Pereira et al., 2006) y que implican a la actividad 5-LO en la neuroprotección mediada por RSG (Sobrado et al., 2009). Un fenómeno interesante que se observa en este estudio es la disminución del tamaño del infarto de los animales 5-LO $^{-/-}$ respecto a sus controles salvajes. El hecho de que la ausencia de 5-LO pueda conferir neuroprotección en isquemia no es sorprendente, dado que 5-LO es una enzima clave para la producción de leucotrienos, los cuales presentan propiedades pro-inflamatorias tales como la capacidad de activar al endotelio, inducir la producción de EROs, incrementar la infiltración de neutrófilos o activar al factor nuclear NF- κ B (Henderson, 1994). De hecho, la inhibición farmacológica de la actividad 5-LO es neuroprotectora en modelos isquémicos animales (Jatana et al., 2006; Tu et al., 2009). Estos datos sugieren por tanto

que 5-LO cataliza la producción de metabolitos distintos de los leucotrienos en animales tratados con RSG y que serían los responsables del paradójico efecto neuroprotector, como veremos más adelante.

5.2 PPAR γ y activación M1: Papel de 5-LO

Nuestros resultados muestran un incremento en los niveles de las moléculas pro-inflamatorias TNF α , iNOS, COX-2, MMP9 o MCP-1 en el cerebro de ratas y ratones como resultado de la isquemia. Estos hechos son congruentes con los fenómenos descritos en la bibliografía, donde moléculas relacionadas con la fase aguda de la inflamación tales como TNF α , IL-1 β , moléculas de adhesión o enzimas inducibles como la COX-2 o la iNOS sufren una inducción como respuesta a la cascada de acontecimientos que se producen tras la isquemia cerebral (Iadecola and Anrather, 2011). Estas moléculas se encuadran dentro del contexto de activación M1 del macrófago, dado que su producción por parte de los macrófagos, o la activación que inducen las citoquinas descritas sobre ellos, indican que han experimentado una polarización hacia un fenotipo pro-inflamatorio (Colton, 2009; Mantovani et al., 2005; Mosser and Edwards, 2008).

Un gran número de evidencias experimentales han mostrado que el proceso inflamatorio agudo presenta un papel deletéreo en isquemia (del Zoppo et al., 2000; Iadecola and Anrather, 2011; Lucas et al., 2006; Wang et al., 2007). Estas evidencias se han demostrado también a nivel clínico, donde cantidades elevadas de interleuquinas pro-inflamatorias tales como IL-1 β , TNF α , IL-6 o de moléculas de adhesión como ICAM-1 en sangre y líquido cefalorraquídeo de pacientes con ictus se han correlacionado positivamente con el tamaño del infarto, el deterioro neurológico y el mal pronóstico (Castellanos et al., 2002; Tarkowski et al., 1995; Vila et al., 2000).

En este contexto, nuestros resultados indican que el tratamiento con RSG disminuye los niveles de las moléculas pro-inflamatorias TNF α , iNOS, COX-2, MMP9 y MCP-1 inducidas por la isquemia experimental en el cerebro

de ratas y ratones. Estos efectos, ampliamente descritos en la bibliografía (Collino et al., 2006; Nakamura et al., 2007; Pereira et al., 2005; Pereira et al., 2006; Sundararajan et al., 2005; Tureyen et al., 2007), se han asociado con las propiedades anti-inflamatorias derivadas de la activación de PPAR γ .

En relación con estos resultados, se ha demostrado que los efectos transrepresores derivados de la activación PPAR γ son responsables de la supresión de la actividad de factores de transcripción relacionados con la inflamación (Daynes and Jones, 2002). En los últimos años se ha realizado una caracterización molecular de muchos de los fenómenos asociados a estos efectos. Se han encontrado interacciones directas de PPAR γ con NF- κ B, AP-1, C/EBP, STAT y NF-AT, que previenen su unión a sus elementos de respuesta del ADN, interacción con co-reguladores de la actividad de NF- κ B y AP-1, o procesos de sumoilación (Ricote and Glass, 2007). Estos últimos han sido propuestos como un mecanismo general de transrepresión que comparten otros receptores nucleares como LXR. En este modelo, la activación de PPAR γ por su ligando implica la sumoilación del receptor y su asociación a complejos co-represores de promotores de genes pro-inflamatorios impidiendo su degradación e inhibiendo su transcripción (Pascual et al., 2005).

Dentro del contexto de neuroprotección mediado por la activación de PPAR γ , nuestro estudio ha sido el primero en demostrar que la inhibición de la actividad 5-LO inhibe la acción transrepresora de RSG sobre TNF α , iNOS y COX-2, y a nivel de ARNm, inhibe la transrepresión de MMP-9 en las primeras horas de la isquemia. Los resultados obtenidos sobre los niveles de TNF α y MCP-1 en el cerebro isquémico de ratones 5-LO deficientes confirman estos datos previos observados en rata e implican directamente a la 5-LO en la modulación de la transrepresión mediada por RSG. Este es un hallazgo de gran importancia y pone de manifiesto cuán necesaria es 5-LO en la señalización transrepresora de PPAR γ .

5.3 PPAR γ y activación M2: Papel de 5-LO

Al contrario de lo que podríamos pensar, evidencias presentadas por mi grupo de investigación indican que la fase aguda de la isquemia cerebral es capaz de incrementar no sólo los marcadores M1 sino también los marcadores M2 en el cerebro (Zarruk et al., 2012). Así, los resultados que se presentan en esta Tesis Doctoral confirman y amplían este hallazgo, al demostrar un incremento en la expresión de marcadores M2 tales como arginasa I, CD206, Ym1 y CD36, tras MCAO. Este hecho posiblemente esté relacionado con una respuesta fisiológica a la isquemia encaminada a la resolución de la inflamación y a la neuroreparación.

De forma paralela a una regulación a la baja de los marcadores M1, el tratamiento con RSG incrementó la expresión de los marcadores M2 CD36 y arginasa I en el cerebro isquémico en nuestro estudio. Esta inducción es congruente con la polarización M2 mediada por la activación de PPAR γ que se ha descrito en macrófagos (Bouhleb et al., 2007; Chawla, 2010; Huang et al., 1999; Odegaard et al., 2007). De hecho, se ha visto que la polarización M2 en macrófagos que presentan una delección de PPAR γ está fuertemente comprometida (Odegaard et al., 2007). De nuevo, nuestro estudio pone de manifiesto la enorme relevancia de 5-LO en las acciones de PPAR γ , ya que demuestran por primera vez que la inducción de estos marcadores M2 tras la activación de PPAR γ no se produce en ausencia de 5-LO.

El estudio de los marcadores M2 Ym1 y CD206 no mostró diferencias entre el grupo vehículo y el tratado con RSG. Puesto que la isquemia induce la expresión de marcadores M2, el tamaño de la lesión se convierte en un sesgo para determinar el efecto polarizador de RSG. De hecho, hemos encontrado una correlación clara entre el tamaño de la lesión y la cantidad de Ym1 cerebral. Este hecho nos llevó a normalizar los valores de expresión de los marcadores M2 por el tamaño de la lesión con el fin de eliminar esta correlación. Una vez normalizados, vimos que tanto la expresión de Ym1 como de CD206 también se incrementaban por efecto de RSG. Y, de nuevo, la

normalización de la expresión de CD206 por el volumen del infarto indicó que la inducción de este marcador M2 por RSG es también dependiente de 5-LO.

A continuación procedimos al estudio de la localización celular de estos marcadores M2 en el cerebro isquémico. El uso de la técnica de inmunofluorescencia para la localización de arginasa I y CD36 no dio buenos resultados, los marcajes obtenidos en los cortes coronales de cerebro de ratones isquémico eran difusos y con un fondo de marcaje elevado que dificultaba la caracterización de la señal específica respecto a sus controles negativos (datos no mostrados). Por el contrario, los marcajes de CD206 e Ym1 eran intensos y específicos al compararlos con sus controles negativos. Esta situación nos llevó a usar la citometría de flujo para la detección en cerebro de CD36 y arginasa I, mientras que la técnica de inmunofluorescencia se empleó para detectar CD206 e Ym1.

Antes de nada, hemos de tener en cuenta las consideraciones técnicas de la disgregación celular del tejido isquémico y su caracterización por citometría de flujo. Por un lado, nuestros resultados han conseguido reproducir los fenotipos encontrados en otros estudios (Campanella et al., 2002). De esta manera, pudimos observar que el hemisferio isquémico presentaba dos subpoblaciones celulares que se diferencian en la expresión de CD45 (Figura 5.1). Las células con baja expresión de CD45 se consideran residentes del SNC, es decir, microglía, mientras que las células con alta expresión de CD45 se consideran infiltradas sanguíneas (Carson et al., 1998). Además, en el aislamiento celular, la población predominante que obtuvimos fue la CD45^{low}. Este hecho está de acuerdo con el modelo de isquemia experimental empleado, un modelo permanente donde la infiltración de células procedentes de la sangre (CD45^{high}) es menor que la que se podría encontrar en un modelo de isquemia transitorio (Gelderblom et al., 2009; Perego et al., 2011). De acuerdo con estos datos, encontramos que la mayor parte de estas células expresaban el marcador mielóide CD11b, a excepción de una pequeña población CD45^{high} que se correspondería con los linfocitos (Campanella et al., 2002).

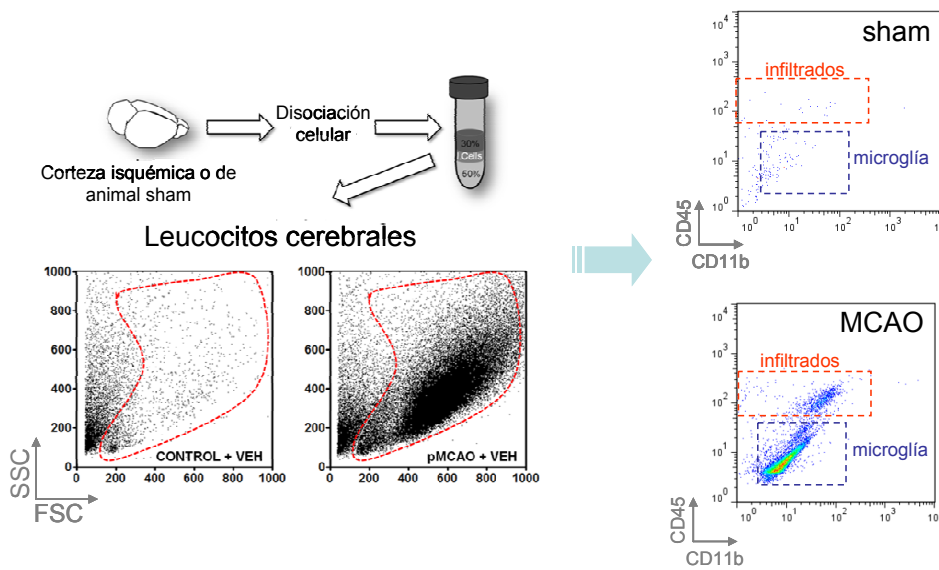


Figura 5.1 Aislamiento celular de leucocitos en cerebro sham y MCAO para análisis por citometría de flujo. La disgregación celular de la corteza sana o isquémica del ratón fue precedida de un filtrado y una separación en gradiente de Percoll. El número de eventos celulares obtenido en los animales sham fue escaso. La representación de la suspensión celular de los animales isquémicos respecto a la expresión de CD45 y CD11b muestra dos poblaciones CD11b⁺ con distinta expresión de CD45. Las células CD45^{low} son la microglía residente. Mientras que las células CD45^{high} son los infiltrados sanguíneos. Una pequeña población CD45^{high} CD11b⁻ comprende a los linfocitos infiltrados. El análisis de estas poblaciones en los animales sham muestra una caracterización pobre de estos marcadores, con unas poblaciones difusas debido al escaso número de eventos celulares obtenidos.

El rendimiento celular obtenido en animales sham fue bajo (Figura 5.1). Este hallazgo podría atribuirse a varias razones. Posiblemente, la intensa proliferación microglial inducida por la isquemia, principalmente localizada en las áreas peri-infarto (Denes et al., 2007), implicaría la obtención de un mayor número de células CD11b⁺ CD45^{low} en los animales isquémicos. Por lo tanto, en ausencia de una proliferación microglial, el aislamiento de leucocitos de la corteza sana en los animales sham parece tener un bajo rendimiento con la técnica empleada. Otra posibilidad podría estar relacionada con la morfología microglial, la cual es ramificada en el cerebro normal, mientras que es ameboide cuando se activa (Gehrmann et al., 1995). Estos cambios morfológicos podrían favorecer el filtrado de células no ramificadas a través de las mallas de 50µm que empleamos en la técnica experimental, mientras que la alta complejidad de la microglía no activada podría dificultar este filtrado. Respecto a la población infiltrada, es lógico que en los animales sham no aparezca, dado que en un cerebro sano la infiltración es baja (Gelderblom et al., 2009).

Una vez comentado este punto, pasamos a discutir los resultados obtenidos. En primer lugar, los resultados de localización celular de los marcadores M2, CD36 y arginasa I por citometría de flujo muestran que su expresión se localiza en las células mieloides, de acuerdo con lo descrito por otros autores (Gordon and Martinez, 2010; Mantovani et al., 2005; Martinez et al., 2008; Martinez et al., 2009; Mosser, 2003; Mosser and Edwards, 2008). Más concretamente, en nuestro modelo de isquemia, nuestros resultados indican que CD36 se expresa en las células CD45^{low} CD11b⁺ correspondientes a la microglía cerebral de la lesión isquémica, mientras que arginasa I se expresa tanto en microglía como en células mieloides infiltradas CD45^{high} CD11b⁺ (Campanella et al., 2002; Carson et al., 1998).

En este contexto, la localización de CD36 en la microglía cerebral tras isquemia ya se ha documentado en otros estudios (Cho et al., 2005), aunque en este caso su expresión se ha asociado con el daño isquémico. Su contribución a la inflamación mediada por TLRs, o a la formación de células espumosas explicaría las acciones perniciosas de esta molécula (Cho and Kim, 2009). Por el contrario, otros trabajos relacionan la inducción de CD36 mediada por RSG con un efecto beneficioso en el infarto hemorrágico por su implicación en la fagocitosis de restos celulares (Zhao et al., 2009a), o también por su capacidad para la eliminación de la proteína β -amiloide en la enfermedad de Alzheimer (Escribano et al., 2010). Por tanto, en el contexto de una activación de PPAR γ , estas evidencias indican que el papel de CD36 no es deletéreo sino que, por el contrario, tendría acciones pro-resolutivas.

Por otra parte, la localización de arginasa I en microglía se ha asociado *in vitro* a la polarización M2 (Michelucci et al., 2009). Esta enzima, junto con la NOS, está implicada en el metabolismo de la arginina. La preponderancia de la actividad arginasa en esta vía facilita la formación de poliaminas, esperminas o prolinas asociadas con la inhibición de la inflamación, la proliferación celular o la síntesis de matriz extracelular (Colton, 2009).

La co-localización de los marcadores Ym1 y CD206 por inmunofluorescencia mostró que su expresión se producía en los neutrófilos,

aunque también caracterizamos una subpoblación de monocitos Ym1⁺, tal y como indica su fenotipo CD11b⁺Iba1⁻NIMPR14⁻ (Ajami et al., 2011).

La expresión de CD206 en neutrófilos está poco descrita, pero su relación con la fagocitosis y el reconocimiento de patrones bacterianos asociados a dominios tipo lectinas (Taylor et al., 2005) sugieren su expresión en los fagocitos de la inmunidad innata. A pesar de encontrar co-localización exclusiva de CD206 con el marcador de neutrófilos NIMPR14, no podemos descartar que este antígeno se exprese en otros lugares del cerebro, dado que la expresión que encontramos en los western blot de animales sham indica que CD206 se expresa ya en el cerebro no isquémico, aumentando su expresión tras la isquemia. De este modo, CD206 se ha asociado a los macrófagos perivasculares del parénquima cerebral (Perry and Gordon, 1988).

Evidencias experimentales han encontrado expresión de Ym1 en neutrófilos (Harbord et al., 2002). Este marcador, además de ser característico de una polarización M2, presenta propiedades interesantes asociadas con la neuroprotección, como la regulación del tráfico leucocitario, (Chang and Karin, 2001) o la reorganización de la matriz extracelular (Mantovani et al., 2005). Por lo tanto, es importante tener en cuenta que Ym1 es capaz de llevar a cabo funciones beneficiosas en la isquemia independientemente de dónde se exprese.

Además de encontrar expresión de Ym1 en los neutrófilos, nuestro estudio indica la existencia de una subpoblación de monocitos Ym1⁺ infiltrados en la lesión isquémica. La infiltración de estos monocitos en el cerebro isquémico ya se ha descrito por otros autores (Perego et al., 2011). Centrándonos en el estudio de esta población específica de monocitos Ym1⁺, nuestros resultados de cuantificación por estereología muestran que el tratamiento con RSG incrementó aún más la infiltración de estos monocitos M2 inducida tras la isquemia. El tratamiento con RSG no produjo un incremento en el número de monocitos Ym1⁺ infiltrados en el cerebro de los animales 5-LO^{-/-}, indicando que la actividad 5-LO está implicada en la infiltración de estas células. Estos resultados confirman otros previos que implican a PPAR γ en el

incremento de la infiltración de monocitos M2 (Stienstra et al., 2008) y son congruentes con la acciones de PPAR γ en la inducción de la polarización M2 en monocitos humanos, los cuales presentan propiedades anti-inflamatorias (Bouhlef et al., 2007). Además, los resultados obtenidos son los primeros en implicar a 5-LO en el incremento de la infiltración de monocitos M2 que media la activación de PPAR γ .

Curiosamente, el efecto de RSG en la expresión de Ym1 por los neutrófilos infiltrados es similar al efecto encontrado en monocitos. Este resultado sugiere que el *switch* hacia unos u otros productos de 5-LO podría estar jugando un papel clave en la resolución de la inflamación a nivel de la biología del neutrófilo. De hecho, tal y como he comentado en la introducción de esta Tesis Doctoral, tanto LXA₄ como LTB₄ tienen efectos importantes en el neutrófilo (Serhan et al., 2007; Serhan et al., 2008).

5.4 PPAR γ y fagocitosis de neutrófilos: Papel de 5-LO

La fagocitosis de los neutrófilos es una fase clave en la resolución de la inflamación. La ingestión de estas células desencadena una respuesta en el macrófago encaminada a su desactivación y a la vuelta a la homeostasis tisular (Colton, 2009; Mosser, 2003). Con el fin de caracterizar la fagocitosis de neutrófilos por los macrófagos/microglía del tejido isquémico, llevamos a cabo experimentos de doble marcaje utilizando un marcador de macrófagos/microglía (Iba1) con un marcador de neutrófilos (NIMPR14). Los eventos definidos como fagocitosis de neutrófilos se determinaron tras detectar la existencia de partículas NIMPR14⁺ en el interior de un macrófago/microglía de morfología ameboide (activado) e íntegra. Definir de este modo la morfología microglial es importante, puesto que es posible que los neutrófilos fagociten restos de macrófagos apoptóticos, lo que podría ser motivo de confusión en nuestro estudio si sólo prestamos atención al hecho de que exista una co-localización entre los dos marcadores estudiados. Este tipo de caracterizaciones de eventos fagocíticos ya se han descrito en la bibliografía en el contexto de la isquemia (Denes et al., 2007).

Los resultados obtenidos indican que el tratamiento con RSG incrementa la fagocitosis de neutrófilos en la lesión isquémica en los ratones WT. De acuerdo con estos resultados, la activación del receptor PPAR γ con RSG causa un incremento de la capacidad fagocítica de los macrófagos/microglía (Escribano et al., 2010; Zhao et al., 2009a). Este efecto podría asociarse al incremento en la expresión de CD36 en los macrófagos/microglía que induce RSG, ya que este receptor está implicado en la fagocitosis de neutrófilos por su capacidad de reconocer la fosfatidilserina oxidada presente en los neutrófilos apoptóticos (Greenberg et al., 2006).

Respecto al papel de 5-LO en la fagocitosis de neutrófilos mediada por PPAR γ , nuestros resultados indican que la actividad 5-LO es de nuevo necesaria para que RSG incremente la fagocitosis de los neutrófilos, puesto que el tratamiento con este agonista PPAR γ no incrementó la fagocitosis en los animales 5-LO $^{-/-}$ al compararse con sus controles no tratados. Aun así, la función fagocítica en los animales 5-LO $^{-/-}$ no es diferente al de los animales WT tratados con RSG y, además, es mayor que el de los animales WT tratados con vehículo. Este hecho sugiere que en el caso de los ratones 5-LO $^{-/-}$, donde los niveles de expresión de CD36 son bajos, un incremento en el aclaramiento de neutrófilos implica la existencia de otras vías alternativas, no relacionadas con el reconocimiento de la fosfatidilserina oxidada por CD36, que se potencian cuando la actividad 5-LO es defectiva. En este contexto, la presencia de un mayor número de neutrófilos Ym1 $^{+}$ infiltrados en el cerebro isquémico de los ratones 5-LO $^{-/-}$ podría relacionarse con su fagocitosis, aunque se requieren nuevos estudios que exploren esta posibilidad.

5.5 Intermodulación de la actividad 5-LO y de la expresión de PPAR γ

5.5.1 Expresión y actividad transcripcional de PPAR γ en isquemia: Implicación de 5-LO

Los resultados de expresión y actividad transcripcional de PPAR γ encontrados en el cerebro isquémico indican que la MCAO incrementa la expresión del receptor, si bien mantienen unos niveles de actividad transcripcional similares a los de los animales sham. Este hecho confirma la creencia general de que PPAR γ es un receptor regulado principalmente por unión del agonista, no por sus niveles de expresión. De acuerdo con esto, el tratamiento con RSG no produjo un incremento de la expresión del receptor, pero sí de su actividad transcripcional, como es de esperar de las acciones de un fármaco agonista. De acuerdo con estos resultados, estudios en la literatura indican que la expresión de PPAR γ aumenta en las neuronas del hemisferio ipsilateral tras la inducción de la MCAO en rata, pero que este incremento de expresión no se refleja en un incremento de su actividad transcripcional. En este estudio, al igual que en nuestro caso, el tratamiento con RSG sí incrementó la actividad transcripcional de PPAR γ (Victor et al., 2006). El incremento en la expresión de PPAR γ en neuronas del cerebro isquémico podría estar relacionado con un mecanismo de defensa ante el daño isquémico. Así, se ha demostrado que la deficiencia de PPAR γ incrementa la susceptibilidad de las neuronas a la isquemia. Este hecho se ha asociado con los efectos anti-oxidantes del receptor en la neurona mediados por la activación de genes como la superóxido dismutasa 2, la catalasa o la glutatión transferasa (Zhao et al., 2009b).

Curiosamente, nuestros resultados muestran la existencia de una sobreexpresión de PPAR γ en el cerebro isquémico de los ratones 5-LO $^{-/-}$ y, aún existiendo mayores niveles de expresión del receptor, el tratamiento con RSG no incrementó la actividad transcripcional de PPAR γ en estos ratones. Por lo tanto, nuestros resultados apoyan la idea de que la actividad enzimática de 5-

LO es necesaria para el mantenimiento de la actividad transcripcional de PPAR γ , hasta el punto de que la falta de esta enzima, al truncar su correcta señalización, induciría un aumento de la expresión de PPAR γ en un intento contrarrestarlo, aunque sin éxito. Es interesante destacar que muchos de los ligandos endógenos de PPAR γ mejor descritos proceden del metabolismo del ácido araquidónico. Así, se han descrito metabolitos de lipoxigenasas (por ejemplo, 15-HODE, 15-HETE) y ciclooxigenasas (como, PGJ2, o 15d-PGJ2) como mediadores importantes de su activación endógena (Nosjean and Boutin, 2002). En relación con estas evidencias, la expresión de CD36, gen diana típico de PPAR γ en el macrófago (Chawla et al., 2001; Moore et al., 2001; Tontonoz et al., 1998), tampoco se indujo tras el tratamiento con RSG en los ratones 5-LO $^{-/-}$, confirmando la importancia de 5-LO en la actividad transcripcional de PPAR γ .

A la vista de estos resultados, sugerimos que diferentes polimorfismos o alteraciones de otro tipo que varíen la actividad 5-LO podrían alterar la señalización PPAR γ . Este hecho podría tener distintas repercusiones en diferentes procesos fisiológicos y patológicos. Así, por ejemplo, el tratamiento de la diabetes mellitus con pioglitazona podría también depender de 5-LO, cuya actividad permitiría una correcta activación de PPAR γ , aumentando por tanto la sensibilidad a la glucosa. Polimorfismos de 5-LO en estos pacientes podrían, por tanto, alterar la respuesta al tratamiento.

5.5.2 PPAR γ y la inducción de la expresión de 5-LO

El estudio de la expresión de 5-LO tras isquemia indica que el tratamiento con RSG induce su expresión *in vivo* en las neuronas del área lesionada e, *in vitro*, en cultivos de neuronas corticales. Además, en ambos casos, este incremento de expresión depende específicamente de la activación PPAR γ , ya que el tratamiento conjunto de RSG con el antagonista específico de PPAR γ , T0070907, inhibe esta inducción. Estos datos corroboran estudios previos de *microarrays* de ARNm en los que se encontró un incremento de la expresión de 5-LO en el cerebro de ratas tratadas con RSG (Pereira et al.,

2006). De acuerdo con estos resultados, datos no publicados de mi equipo de investigación obtenidos mediante un análisis bioinformático de la secuencia del promotor de 5-LO, mostraron en éste la existencia de 5 posibles lugares de unión de PPARs, apoyando la idea de que 5-LO es un gen diana de PPAR γ . Por otra parte, nuestros estudios *in vitro* sobre cultivos puros de astrocitos muestran que el tratamiento con RSG no produce la inducción de 5-LO en estas células, por lo que la inducción de 5-LO por RSG parece ser dependiente del tipo celular.

5.6 LXA₄ como mediador de las acciones de la vía PPAR γ -5-LO

5.6.1 Implicación de RSG en la síntesis de LXA₄

Nuestros resultados muestran que el tratamiento con RSG incrementa los niveles de LXA₄ en el cerebro isquémico, y que este incremento no se produce en los ratones 5-LO^{-/-} tratados con el agonista PPAR γ . Estos resultados son coherentes con los estudios llevados a cabo en ratas (Sobrado et al., 2009) y apuntan por un lado, a que la actividad 5-LO es la responsable de la producción de LXA₄ intracerebral inducida por activación del receptor PPAR γ por RSG, y por otro, a que LXA₄ es un posible mediador de la vía PPAR γ -5-LO descrita en esta Tesis Doctoral. Así, dado que la actividad 5-LO es necesaria para la producción de LXA₄ (Serhan and Levy, 2003), el incremento de la expresión neuronal de 5-LO tras el tratamiento con RSG parece ser el responsable de este efecto.

En relación con estos datos, nuestros resultados obtenidos en cultivos de neuronas indican que su tratamiento con el agonista PPAR γ RSG incrementa los niveles de LXA₄ en los sobrenadantes de estos cultivos. El hecho de que seamos capaces de detectar niveles basales de LXA₄ en cultivos puros de neuronas es novedoso. Las rutas clásicas de biosíntesis de este compuesto se han atribuido a procesos transcelulares, donde más de un tipo celular está implicado en su producción, y donde es necesaria la acción

combinada de diferentes lipoxigenasas (Serhan and Levy, 2003). La existencia de distintas lipoxigenasas neuronales haría posible una producción endógena de LXA₄. La expresión de 5-LO en neuronas se ha documentado en varias ocasiones (Zhang et al., 2006; Zhou et al., 2006). Además de 5-LO, 12-LO es la lipoxigenasa más abundante en cerebro, y su expresión se ha identificado en neuronas del SNC y en cultivos primarios de neuronas (Lebeau et al., 2004; Li et al., 1997). Nosotros encontramos que la inducción de 5-LO en neuronas corticales tratadas con RSG se asocia a un incremento en la producción de LXA₄. La revisión de las rutas de biosíntesis de este compuesto sugiere que la acción combinada entre la 5-LO y la 12-LO neuronal podrían estar implicadas en su producción, al igual que se ha descrito para la interacción de la 5-LO de neutrófilos con la 12-LO epitelial (Serhan and Levy, 2003).

En una situación *in vivo*, como la isquemia cerebral, elucidar de dónde proviene la biosíntesis de LXA₄ es extremadamente difícil. A las lipoxigenasas neuronales habría que añadirles la acción de la 12-LO epitelial o la 15-LO de macrófagos. En nuestro marco experimental no hemos observado inducción de estas lipoxigenasas por efecto de la isquemia, aunque es cierto que la caracterización que hemos realizado se limita al análisis de niveles de ARNm 5 horas tras la MCAO y que su cooperación en la síntesis de LXA₄ es perfectamente posible. Aun así, el hecho de que la inducción de 5-LO por RSG sea un factor determinante para el incremento de la producción de LXA₄ intracerebral sugiere una ruta de biosíntesis donde la 5-LO neuronal juega un papel clave y regulador del proceso.

En este contexto, es destacable que RSG induce un cambio en la actividad metabólica de 5-LO en isquemia hacia una síntesis preferencial de LXA₄ en detrimento de la producción de LTB₄, que existe en ausencia del agonista PPAR_γ (Sobrado et al., 2009). Este hecho indica que 5-LO inducida *de novo* por la activación PPAR_γ presenta una actividad metabólica diferente a la de la 5-LO implicada en la inflamación, la cual está principalmente destinada a la producción de LTB₄ (Sharma and Mohammed, 2006). Muchos trabajos relacionados con la regulación de esta enzima indican que su actividad enzimática es dependiente de su localización celular. Así, la biosíntesis de

leucotrienos implica la asociación de 5-LO a la membrana nuclear (Peters-Golden and Brock, 2003). La fosforilación (Werz et al., 2002), la presencia de Ca^{2+} (Hammarberg et al., 2000), su localización subcelular (Hanaka et al., 2002; Mandal et al., 2008) o la existencia de distintas isoformas de la enzima (Boudreau et al., 2011) son factores determinantes para la actividad enzimática de 5-LO. Estas evidencias, junto con nuestros estudios sobre el metabolismo de 5-LO, sugieren que RSG, además de incrementar la expresión de 5-LO, modula la actividad de la enzima favoreciendo la síntesis de LXA_4 . Así, ya se ha descrito que la fosforilación de 5-LO en la serina 253 mediada por agonistas $\text{PPAR}\gamma$ previene su asociación a la membrana perinuclear favoreciendo la síntesis de epi-lipoxinas (Ye et al., 2008). En relación con este estudio, nuestros resultados indican que la localización de 5-LO en las neuronas del cerebro isquémico es fundamentalmente citoplasmática.

5.6.2 Neuroprotección mediada por LXA_4

Las lipoxinas son derivados del ácido araquidónico con propiedades anti-inflamatorias (Serhan et al., 2008). Al igual que ocurre con los leucotrienos, su síntesis depende de la actividad 5-LO pero, al contrario de aquéllos, sus acciones como moléculas de resolución de la inflamación las conforman como candidatas plausibles que pueden explicar la implicación de la 5-LO neuronal en la neuroprotección por RSG. Así, y de acuerdo con otros estudios similares (Wu et al., 2010), nuestros resultados demuestran que el tratamiento con LXA_4 disminuye el volumen del infarto. Se ha descrito que las acciones de LXA_4 son mediadas principalmente a través de su unión al receptor de LXA_4 o FPLR1, un receptor 7TM acoplado a proteínas G. Su activación tiene varios efectos en el contexto de la respuesta inflamatoria, como la inhibición de la quimiotaxis de neutrófilos, la disminución de la producción de EROs o el incremento de la infiltración de monocitos (Chiang et al., 2000). Además, se ha descrito que LXA_4 es un agonista del receptor para hidrocarburos de arilo o AhR (Schaldach et al., 1999). Tanto la activación de AhR, como de FPLR1 por LXA_4 es capaz de incrementar la expresión de SOCS2 (Suppressor of cytokines 2), importante mediador de las acciones anti-inflamatorias de LXA_4 (Machado et al., 2006). En

este contexto, mi equipo de investigación ha comenzado una nueva línea de estudios destinados a caracterizar la implicación de AhR en la isquemia cerebral. Pero además, puesto que nuestros resultados indican que la acción neuroprotectora de LXA₄ se inhibe cuando se lleva a cabo el tratamiento combinado de LXA₄ con el antagonista de PPAR_γ, T0070907, es muy posible que LXA₄ presente algún tipo de agonismo directo o indirecto o sinergia con PPAR_γ que explique que sus acciones neuroprotectoras sean dependientes de la activación de este receptor nuclear.

5.6.3 Implicación de LXA₄ en la polarización M2

Al explorar *in vitro* la acción de LXA₄ hemos demostrado por primera vez que esta molécula es capaz de modular el fenotipo de macrófagos RAW incrementando en ellos la expresión de marcadores M2 tales como CD36, CD206, arginasa I e Ym1. En este contexto, las lipoxinas no habían sido directamente implicadas en la polarización M2 de los macrófagos, si bien muchas evidencias que las involucran en las fases de la resolución del proceso inflamatorio sugieren un papel de estos compuestos en la modulación del macrófago hacia un fenotipo pro-resolutivo (Gordon and Martinez, 2010; Serhan et al., 2007). Además, varios estudios *in vitro* han mostrado que LXA₄ es capaz de reducir la actividad pro-inflamatoria del macrófago. Así, se ha demostrado que LXA₄ es capaz de inhibir la activación de NF-κB, la producción de EROs o de incrementar la fagocitosis de los neutrófilos apoptóticos (Kure et al., 2010; Mitchell et al., 2007; Zhou et al., 2007).

En relación a la polarización M2 que media LXA₄, es interesante destacar los trabajos del grupo del profesor Aliberti, dónde se demuestra que determinados patógenos intracelulares, como *Mycobacterium tuberculosis* o *Toxoplasma gondii*, son capaces de incrementar la producción de LXA₄. Este hecho se ha asociado a una estrategia del patógeno para escapar a la respuesta Th1 citotóxica del sistema inmunitario (Aliberti, 2005). Por lo tanto, LXA₄ modula la inmunidad favoreciendo una respuesta Th2 humoral deficitaria para la eliminación de estos parásitos intracelulares.

Nuestros estudios de fagocitosis *in vitro* con bolas de látex indican que el tratamiento con LXA₄ estimula la fagocitosis de los macrófagos. Este hecho está en relación con las propiedades de LXA₄ comentadas anteriormente. En este contexto, la disminución de la inflamación asociada a una mayor fagocitosis y a la sobreexpresión de marcadores M2 que induce LXA₄ nos lleva a proponer que este compuesto es capaz de ejercer una polarización directa M2 en el macrófago. Así, los efectos en neuroprotección que observamos tras el tratamiento con LXA₄ sugieren que, al igual que RSG, una atenuación en la fase M1 del proceso inflamatorio asociada a una polarización M2 de los macrófagos/microglía en el cerebro isquémico son responsables de la reducción del área infartada.

En resumen, todos estos datos apuntan a que los efectos pro-resolutivos de LXA₄ descritos principalmente por el grupo de Serhan (Serhan et al., 2008) se deben a su papel en la polarización M2.

5.7 Sumario: La vía PPAR_γ-5-LO en la isquemia cerebral

Nuestros resultados indican que la pérdida de la actividad PPAR_γ encontrada en el cerebro isquémico de los animales 5-LO^{-/-} tratados con RSG impide tanto las acciones transrepositoras del receptor como la inducción de marcadores de fenotipo alternativo. Volviendo al modelo de sumoilación, donde la activación de PPAR_γ es necesaria para impedir la ubiquitinación de co-represores de genes pro-inflamatorios (Pascual et al., 2005), es muy posible que la activación PPAR_γ con RSG induzca, a través de 5-LO, la síntesis de nuevos ligandos endógenos de este receptor y que, por tanto, la deficiencia de estos ligandos impida su activación sostenida y, por ende, su sumoilación. Dado que la actividad PPAR_γ es necesaria para la correcta expresión de un fenotipo M2 en el macrófago (Chawla, 2010), las acciones metabólicas de 5-LO parecen también estar implicadas en el mantenimiento de la actividad

transcripcional de PPAR γ y, por tanto, tal y como muestran nuestros resultados, influyen directamente la polarización M2 que induce RSG tras la isquemia.

De acuerdo con estos efectos, la dependencia de 5-LO que muestran las acciones neuroprotectoras de PPAR γ sugiere que una incorrecta polarización M2 en los ratones 5-LO $^{-/-}$ es la responsable, en parte, de que el tratamiento con RSG no induzca neuroprotección en estos animales. Así, pensamos que en ausencia de 5-LO, la transrepresión de los mediadores pro-inflamatorios o M1 y la inducción de los marcadores M2 está impedida, contribuyendo ambos a la pérdida de la neuroprotección inducida por la activación de PPAR γ . En resumen, estos datos indican que la polarización M2 en el proceso isquémico agudo que media RSG es dependiente de la actividad 5-LO y apoyan que la polarización M2 es una estrategia para contrarrestar los efectos deletéreos de la inflamación aguda en la isquemia cerebral.

Además, nuestros resultados indican que, al igual que ocurre con los macrófagos, RSG promueve la entrada de neutrófilos Ym1 $^{+}$ a la lesión en un proceso dependiente de la actividad 5-LO. Este hecho implicaría que los efectos de la actividad PPAR γ no sólo se restringen al macrófago, sino que también actúan en neutrófilos. De todas formas, se requieren nuevos estudios para caracterizar las funciones de los neutrófilos inducidos por la activación de PPAR γ , no sólo ya en el campo de la isquemia sino en el contexto inflamatorio.

Tal y como he comentado, RSG produce un cambio en la actividad enzimática de 5-LO destinada a la producción preferencial de LXA $_4$. En este contexto, las acciones neuroprotectoras de LXA $_4$ y su dependencia de la actividad PPAR γ , la inducción de su síntesis en el cerebro tras el tratamiento con RSG y sus acciones en la polarización M2 de macrófagos, sugieren que LXA $_4$ es un mediador clave de los efectos descritos para la vía PPAR γ -5-LO en la isquemia cerebral.

Así, como conclusión general de esta Tesis Doctoral, planteo el siguiente modelo en el que la inducción de 5-LO neuronal mediada por RSG produce un incremento en la síntesis de LXA $_4$ intracerebral que, de manera sinérgica con la

activación exógena de PPAR γ promoverá una polarización M2. Dado que la activación de PPAR γ en los animales 5-LO $^{-/-}$ es defectiva, tanto LXA $_4$ como otros metabolitos derivados de la vía 5-LO podrían ser candidatos a ejercer de agonistas endógenos manteniendo una activación sostenida del receptor y conduciendo así a la neuroprotección ejercida mediante la polarización de las células mieloides tras la isquemia.

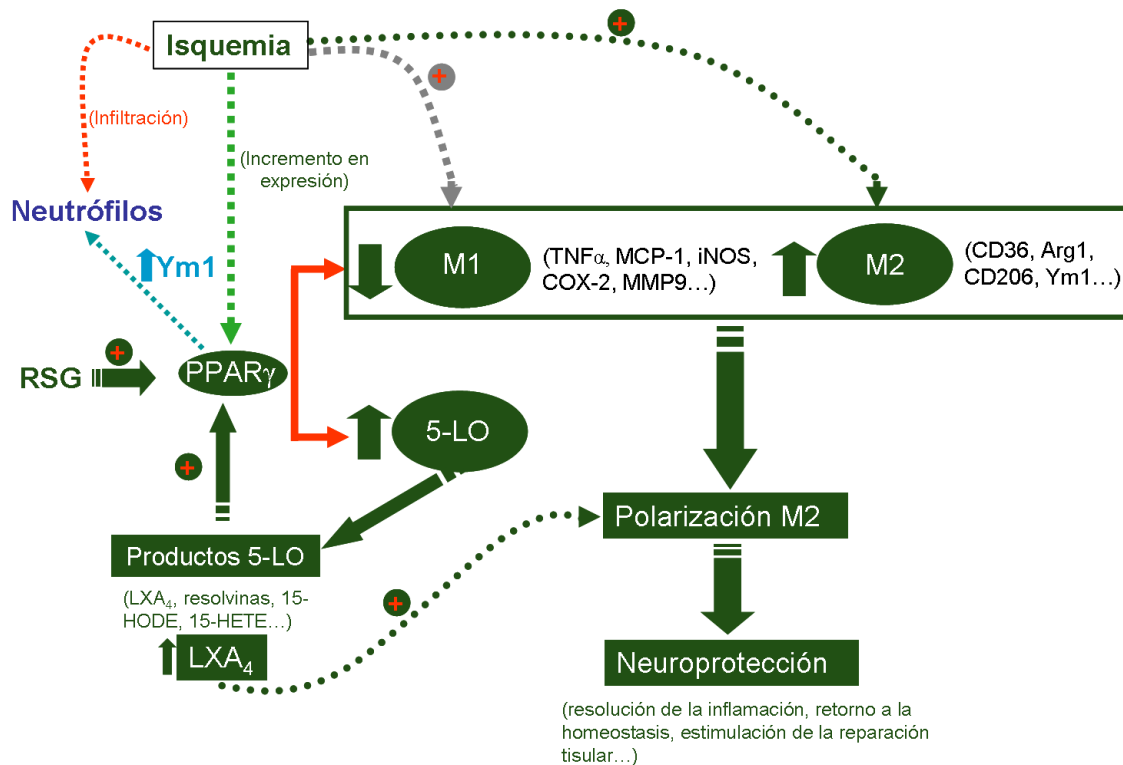


Figura 5.2 La polarización M2 mediada por RSG en isquemia cerebral: La vía PPAR γ -5-LO. La isquemia induce la expresión de marcadores M1 y M2 en el cerebro y la infiltración de los neutrófilos al área lesionada. La activación de PPAR γ por RSG promueve tanto la polarización M2 de las células mieloides (macrófagos, monocitos y neutrófilos) como la inducción de la expresión de 5-LO neuronal. Los productos derivados de la actividad 5-LO juegan un papel clave en promover una activación sostenida de PPAR γ , perpetuando el efecto de RSG, lo que convierte a esta enzima en un mediador importante en las acciones neuroprotectoras de PPAR γ en la isquemia cerebral. Dentro de los productos derivados de 5-LO, la LXA $_4$ podría tener un papel importante como mediador de estas acciones, ya que sus efectos en neuroprotección son dependientes de la actividad PPAR γ y sus acciones directas sobre los macrófagos indican un papel de este compuesto en la polarización M2 de los macrófagos

VI Conclusiones

Conclusiones

- 1- El agonista PPAR γ rosiglitazona induce la expresión de la 5-lipoxigenasa neuronal en el cerebro isquémico de forma dependiente de PPAR γ
- 2- La neuroprotección mediada por el agonista PPAR γ rosiglitazona en isquemia experimental en ratón es dependiente de la actividad 5-lipoxigenasa
- 3- La actividad transcripcional y el efecto transrepositor inducido por la activación de PPAR γ en isquemia experimental en roedores está mediado por 5-lipoxigenasa.
- 4- La activación de PPAR γ con rosiglitazona incrementa los niveles de lipoxina intracerebral en el hemisferio ipsilateral de animales isquémicos. Este efecto es dependiente de 5-lipoxigenasa.
- 5- El agonista PPAR γ rosiglitazona induce la expresión de los marcadores de fenotipo alternativo de macrófagos CD36, arginasa I y CD206 en el cerebro isquémico de una forma dependiente de la actividad 5-lipoxigenasa.
- 6- El agonista PPAR γ rosiglitazona incrementa la infiltración de monocitos M2 al cerebro isquémico de forma dependiente de la actividad 5-lipoxigenasa.
- 7- Los marcadores de fenotipo alternativos en el cerebro isquémico se localizan en microglía/macrófago (CD36 y arginasa I), monocitos (Ym1) y neutrófilos (CD206, Ym1).
- 8- El agonista PPAR γ rosiglitazona incrementa la fagocitosis de neutrófilos por macrófagos/microglía en el cerebro isquémico de forma dependiente de 5-lipoxigenasa.

- 9- La lipoxina A₄ es neuroprotectora en la isquemia cerebral experimental mediante un mecanismo dependiente, al menos en parte, de PPAR_γ.
- 10- El agonista de PPAR_γ rosiglitazona induce la expresión de 5-lipoxigenasa e incrementa la producción de lipoxina A₄ en neuronas corticales cultivadas.
- 11- La lipoxina A₄ aumenta la expresión de los marcadores M2 CD36, CD206, arginasa I e Ym1 en macrófagos RAW 264.7.
- 12- La lipoxina A₄ incrementa el índice fagocítico de macrófagos de médula ósea diferenciados con M-CSF.
- 13- La activación de PPAR_γ con rosiglitazona induce la polarización M2 en el cerebro isquémico. Este efecto, al igual que los efectos anti-inflamatorios y la actividad transcripcional de este receptor, depende de la 5-lipoxigenasa, por lo que la modulación de la vía PPAR_γ-5-LO presenta un potencial terapéutico para el tratamiento del ictus.

VII Summary

Background

Inflammation is considered a major player of tissue damage after stroke; it is therefore a potential therapeutic target for this devastating disease that remains one of the major causes of death and disability worldwide. Early after stroke onset, ischemic injury is exacerbated by a robust inflammatory response that involves activation of resident glial cells, as well as influx of blood-derived cells recruited by cytokines, adhesion molecules, and chemokines.

In this context, microglial cells, the resident macrophages of the brain, are activated within minutes of the ischemic occlusion and may remain activated for several weeks after initial injury. Furthermore, monocytes/macrophages and neutrophils are recruited to the brain tissue, usually with a delay of hours to a few days, contributing to the initiation of the inflammatory response after ischemia.

Current evidence indicates that macrophages are plastic cells that have the ability to undergo different forms of polarised activation, the extremes of which are called classic or M1 and alternative or M2 reflecting the Th1/Th2 nomenclature of T helper cells. The term M2 was proposed for macrophages whose polarization is driven by Th2-derived IL-4 and IL-13, or by Treg-derived anti-inflammatory mediators like IL-10 and TGF- β . Whereas the M1 phenotype is pro-inflammatory and possesses a predominant role in the initial killing phase of inflammation, M2 is a phenotype with a distinctive gene program that, instead, leads mainly to inhibition of inflammation and tissue reconstruction (Figure 1.6). This evidence suggests that polarization towards one of these states might be crucial for the contribution of mononuclear phagocytes, including resident microglia, to inflammatory damage.

Using stroke experimental models, several groups including ours demonstrated the neuroprotective properties of different agonists of Peroxisome Proliferator Activated Receptor Gamma (PPAR γ) (Table 5), a ligand-activated transcription factor belonging to the nuclear receptor superfamily, with metabolic but also anti-inflammatory actions due to trans-repression of inflammatory

genes. Interestingly, this receptor has been shown to orchestrate the switch of the macrophage phenotype towards the alternatively activated or M2 type. In this context, 5-lipoxygenase (5-LO), a gene early induced by PPAR γ activation in the ischemic brain, has been implicated in the neuroprotective effect of PPAR γ activation after MCAO in rats, as indicated by preliminary evidences from my research group (Figure 1.11).

With this background, the purpose of this Doctoral Thesis is to study the presence of M2 phenotypes of microglia and/or macrophages in the ischemic brain, to explore whether polarization towards an M2 phenotype accounts for the neuroprotective effects of PPAR γ activation and to demonstrate the implication of 5-LO in this pathway after experimental stroke.

Hypothesis and objectives

Hypothesis

The immunomodulatory and neuroprotective effect of PPAR γ in experimental brain ischemia depends on the enzyme 5-LO, the metabolic activity of which is necessary for the M2 polarization of immune cells and for resolution of inflammation.

Objectives

In order to demonstrate this hypothesis we present the following objectives:

A) Study of the implication of 5-LO in the anti-inflammatory effects of PPAR γ in brain ischemia: inhibition of classic or M1 activation

- 1- Characterization of rosiglitazone as a PPAR γ agonist
- 2- Study of the role of 5-LO in the inhibition of M1 activation induced by rosiglitazone in brain ischemia in rats

3- Study of the effect of the PPAR γ agonist rosiglitazone in 5-LO expression in cerebral ischemia in rat

B) Study of the alternative or M2 activation in experimental brain ischemia and of the role of the PPAR γ -5-LO pathway in this process

1- Study of the role of 5-LO in rosiglitazone-induced neuroprotection in experimental cerebral ischemia in mice

2- Analysis of the cellular expression of 5-LO in experimental cerebral ischemia in mice. Effect of PPAR γ

3- Study of the role of 5-LO in the expression and signaling of PPAR γ in experimental cerebral ischemia in mice

4- Study of the levels of the 5-LO product lipoxin A₄ (LXA₄) in experimental cerebral ischemia in mice. Effect of PPAR γ

5- Study of the alternative or M2 activation in mouse brain: effect of ischemia and of the PPAR γ -5-LO pathway

6- Analysis of the cellular location of M2 markers in the ischemic brain in mice.

7-Characterization of the phagocytosis of neutrophils by microglia/macrophages after cerebral ischemia in mice. Effect of the PPAR γ -5-LO pathway

C) Effect of the 5-LO product LXA₄ in neuroprotection and M2 activation

1-Study of the neuroprotective effect of LXA₄ in cerebral ischemia in rats

2-Characterization of LXA₄ production *in vitro*

3-*In vitro* study of the effect of LXA₄ on M2 activation and phagocytic function in macrophages

Material and Methods

Animals and experimental procedures for *in vivo* experiments

Animals: WT controls (B6;129SF2/J) and 5-LO-deficient mice (B6;129S2-*Alox5*^{tm1Fun}/J; 5-LO^{-/-}) as well as C57BL mice (8-10 weeks) were obtained from the Jackson Laboratories. For the studies of the expression of 5-LO, its implication in the inhibition of pro-inflammatory markers mediated by rosiglitazone (RSG) and the neuroprotective effect induced by lipoxin A₄ (LXA₄), male Wistar rats were used.

Middle cerebral artery occlusion (MCAO) model: Animals were subjected to permanent focal cerebral ischemia through a combination of both distal MCAO and ipsilateral common carotid artery occlusion (CCAO), experimental conditions that lead to moderately sized cortical infarcts.

Treatment protocols: Animals were allocated by randomization (coin toss) to different treatments groups. In a set of experiments, WT and *Alox5*^{-/-} mice received either an intraperitoneal (i.p.) administration of vehicle (saline) and the other group, 3 mg/kg rosiglitazone, 10 min after MCAO (n=6-8/group). Control groups consisted of respective sham-operated animals that received an i.p. injection of either saline or rosiglitazone 10 min after the sham procedure. In another set of experiments, C57BL mice or Wistar rats were treated with vehicle or rosiglitazone +/- 5 mg/kg BWA4C, a specific 5-LO inhibitor.

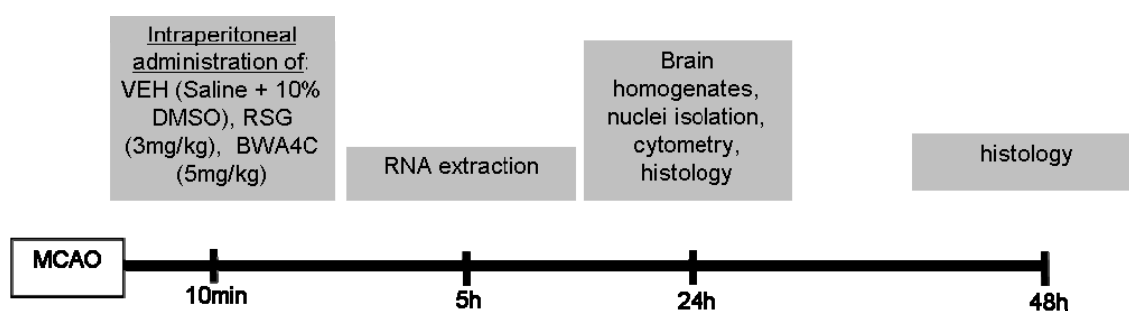


Figure 1. Administration protocol and sample extraction for experimental procedures

The neuroprotective effect of LXA₄ was evaluated in Wistar rats which received an intracerebroventricular (i.c.v) administration of LXA₄ after MCAO. A subgroup of LXA₄-treated animals also received an i.c.v administration of the PPAR_γ antagonist T0070907 before the LXA₄ injection.

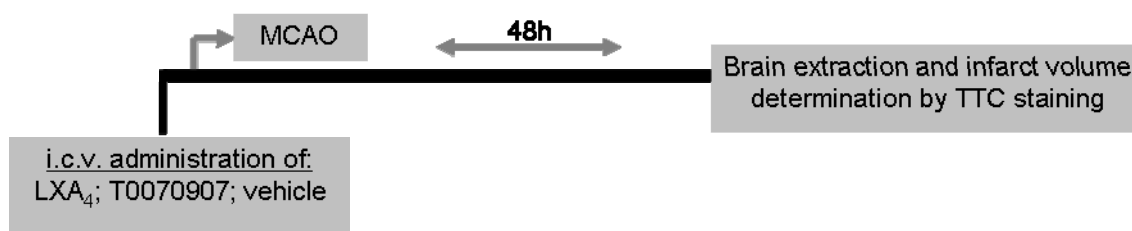


Figure 2. Neuroprotective effect of LXA₄ in Wistar rats: administration protocol and procedure

Brain infarct determination: Magnetic resonance examination was performed 24 hours after pMCAO using a BIOSPEC BMT 47/40 (Bruker, Ettlingen, Germany). Infarct volume was calculated using the ImageJ software (NIH, USA) from the T2-weighted images. In addition, infarct volume to assess the neuroprotective effect of LXA₄ was determined by TTC (2,3,5-trifенил-tетразолиум chloride) staining 48h after MCAO.

Cell cultures and experimental procedures for *in vitro* experiments

Primary neuronal or astrocyte cultures were prepared from pre-natal (neurons) or neonatal (astrocytes) Wistar rat cortex. For the study of 5-LO mRNA expression, cultures were treated with RSG for 8 hours. 5-LO immunofluorescence analysis in neurons, as well as determination of levels of LXA₄ in supernatants of neurons and astrocytes were performed 24 hours after treatment.

Bone marrow-derived macrophages (BMM) were obtained by culturing bone marrow cells in the presence of M-CSF. Determination of the phagocytic

capacity of these cells was performed 3 hours after LXA₄ treatment. The expression of markers of M2 activation in RAW 264.7 macrophages was performed 5 hours after LXA₄ treatment.

Experimental techniques

Western blotting: protein was extracted from infarct and peri-infarct areas of mice brains collected 24h after MCAO. Samples were homogenised by sonication in the presence of protease inhibitors (Roche Diagnostics, Indianapolis, USA) and 0,1% of Nonidet p40. The protein extracts were prepared by high-acceleration centrifugation (12000g x 20min 4°C). Laemmli electrophoresis sample buffer (Bio-Rad) was added to extracts containing 25 µg of protein and denatured by heating at 90°C for 10 min. Proteins were separated in SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE), transferred to a nitrocellulose membrane (HybondTM-P; Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg, Germany), and incubated with specific antibodies. Western blots were developed using ECL technique. The chemiluminiscent signal was acquired with a CCD camera (Syngene, Cambridge, U.K.) and quantified with Gene Tools software (Syngene, Cambridge U.K.). β-actin were used as loading controls.

Protein determination by cytometric bead array (CBA): protein homogenates from brain infarcted tissue obtained 24h after pMCAO were used to measure the protein levels of TNF-α and MCP-1 using a BDTM Cytometric Bead Array (CBA) as described according to the manufacturer's instructions (BD Bioscience).

Quantitative RT-PCR: total RNA was extracted from rat cortex, cultured macrophages, astrocytes or neurons using TRIzol[®] reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). RNA quantity was determined spectrophotometrically and the purity was confirmed by the relative absorbance at 260nm versus 280nm. 1 µg of RNA was reverse-transcribed with iScript cDNA Synthesis kit (BioRad). Quantitative real-time PCR was performed using a Biorad iQ5 Thermocycler with triplicate samples.

Immunofluorescence: Animals were sacrificed 24 or 48h after MCAO by pentobarbital overdose followed by trans-cardiac perfusion with 0.1M phosphate buffer and 4% p-formaldehyde in 0.1M phosphate buffer (pH 7.4). Brains were removed, post-fixed overnight and placed in 30% sucrose for 48h. Coronal series sections (30µm) were cut on a freezing microtome (Leica SM2000R, Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany) and stored in cryoprotective solution. Double-label immunofluorescence was performed on free-floating sections.

For 5-LO immunodetection in rat neuronal cultures, treated cells were fixed with 4% paraformaldehyde (15 min). The cells were pre-incubated with 0.2% Triton X-100 and with 10% normal goat serum in PBS for 15 min at room temperature. After this time, cells were incubated at 4°C overnight with rabbit polyclonal antibody against 5-LO (1:100; Cayman Chemical Co.) and with mouse monoclonal antibody against neuronal nuclei (NeuN Millipore Bioscience Research Reagents, 1:100) as the primary antibodies, followed by detection with secondary antibodies. After washing, cells were counterstained for 15 min at room temperature with TOPRO (Invitrogen Labeling and Detection) before mounting.

Stereological analysis: To estimate the number of Ym1+ or Ym1-neutrophils or monocytes in the infarct core, 7 coronal sections between -1.94 and -2.46mm posterior to bregma (30µm per section, 600µm apart) were quantified with the optical fractionator approach. The reliability of the sampling scheme was confirmed by the calculation of the Schmitz-Hof coefficient of error (CE), which was <0.1.

Brain dissociation and subsequent inflammatory cell analysis by flow cytometry: 24h after MCAO, mice brain were removed, and infarct and peri-infarct tissue was dissected with a scalpel, placed into 15 mL of ice-cold PBS and dissociated in a single cell suspension using a gentleMACS™ Dissociator (Miltenyi) according to manufacturer's instructions. Cell suspension were resuspended in 3 mL of 50% Percoll and overlaid on the top of a gradient

containing 3 mL of 30% of Percoll. The gradient was centrifuged at 500g for 40 minutes at room temperature. Cells were collected from the 30% to 50% interface and were incubated with conjugated antibodies CD36-PercP (Santa Cruz), CD11b-FITC, CD45-PE and Gr1-APC (Miltenyi) for 45 minutes at 4°C. Intracellular staining of arginase I was performed after cell fixation in 2% PFA and permeabilization.

Determination of lipoxin A₄ levels: Quantitative analysis of LXA₄ levels in cerebral cortex dissected from the MCA territory 24 h after the occlusion was performed by ELISA (EA 45 Lipoxin A₄ assay kit, Oxford Biomedical Research, Oxford, MI, USA). Samples were previously purified using C18 octadecyl mini-columns (Amprep™ Mini-Columns, Amersham Biosciences, UK). For the quantitative analysis of LXA₄ levels of neurons and astrocytes, supernatants of the cell cultures were collected 24 hours after treatment incubation and frozen at -80°C for posterior ELISA analysis.

Nuclear extracts: Brain tissue from peri-infarct areas of 5-LO^{-/-} and wild type mice was collected 18h after MCAO. Nuclear extracts were prepared crushing tissue or incubating the cell suspension of the culture in 10 mM HEPES (pH 7.9), 1.5 mM MgCl₂, 10 mM KCl, and 0.5% Nonidet P-40. Nuclei were pelleted at 12,000g for 1 min at 4°C and lysed in 20mM HEPES (pH 7.9), 15 mM MgCl₂, 420 mM NaCl and 0.2 mM EDTA. After centrifugation (12,000g for 5 min at 4°C), the pellet was discarded.

PPAR_γ transcriptional activity assay: PPAR_γ activity was assessed in isolated nuclei. The procedure was performed using the PPAR_γ Transcription Factor Assay kit (Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI, USA) following manufacturer's recommendations.

LanthaScreen™ TR-FRET PPAR_γ Co-activator Assay: in order to assess the ability of RSG to act as PPAR_γ ligand, TR-FRET (Time-Resolved Fluorescence Resonance Energy Transfer) assay *in vitro* was performed with the LanthaScreen TR-FRET PPAR_γ competitive binding assay according to the instructions of the manufacturer (Invitrogen).

Phagocytosis analysis: to analyse phagocytosis, co-localisation of Iba1/NIMP-R14 was analyzed using a laser-scanning confocal imaging system (Zeiss LSM710). The % of NIMP-R14/Iba1 co-labelling was calculated as the ratio between the number of Iba1+ cells engulfing NIMP-R14+ cells divided by the total number of activated Iba1+ cells found in the field. Two photographs of the ischemic core per section using the 20x magnification objective were taken in 7 coronal sections of each animal. Quantification of double cells in the orthogonal projection of z-stack files was performed using the cell counter tool of the software ImageJ (NIH). Analysis of phagocytosis was performed in both infarcted and peri-infarct areas of the brain 48h after ischemia.

In vitro phagocytic assay: pre-treated MCSF bone marrow macrophages were incubated with polystyrene latex beads conjugated to fluorescein (SIGMA). The beads were dissolved in pre-warmed serum-free BME medium and added to the cells. The plate was centrifuged for 1 min at $250 \times g$ before 30 min incubation at 37°C . At the end of the incubation, $300\mu\text{l}$ of ice-cold medium was added to the cells to stop the reaction. The cells were detached from the well by gentle pipetting, washed and transferred to a flow tube for flow cytometry examination. Prior to acquisition, cells were incubated for 15min with propidium iodide solution ($5\mu\text{g/ml}$) (Santa Cruz) to assess cell death. A total of 75,000 events were collected from each sample using a FACSCalibur flow cytometer with CellQuest software (BD Pharmingen, San Jose, CA). Data were analyzed using the software FlowJo (Tree Star Inc.). Data were represented as the increase in the phagocytic index (number of fluorescein⁺ cells x mean intensity of fluorescein) vs. vehicle treated macrophages (considered as a 100% phagocytic index).

Statistical analysis: results are expressed as mean \pm S.E.M. of the indicated number of experiments; Student's *t* test was used to compare 2 groups and 1-way ANOVA to compare >2 groups. $P < 0.05$ was considered statistically significant.

Results:**OBJECTIVE 1: Study of the implication of 5-LO in the anti-inflammatory effects of PPAR γ in brain ischemia: inhibition of classic or M1 activation**

-Characterization of rosiglitazone as a PPAR γ agonist: RSG was characterized as a *bona fide* PPAR γ agonist because of its ability to bind to the ligand binding domain of PPAR γ , its capacity to activate the transcriptional activity of the receptor and its anti-inflammatory actions (Figure 4.1).

-Study of the role of 5-LO in the inhibition of M1 activation induced by rosiglitazone in brain ischemia in rats: anti-inflammatory effects of PPAR γ activation in brain ischemia were confirmed by protein expression analysis of inflammatory markers in the ischemic brain. The results show that RSG treatment inhibits the expression of TNF α , iNOS, COX-2 and MMP9 induced by brain ischemia. In this settings, inhibition of 5-LO activity using the 5-LO specific inhibitor BWA4C abolished the trans-repressor effect induced by PPAR γ activation, demonstrating that these effects are mediated by 5-LO activity (Figure 4.2).

-Study of the effect of the PPAR γ agonist rosiglitazone in 5-LO expression in cerebral ischemia in rat: our results show that RSG up-regulates 5-LO expression in the ischemic rat brain in a PPAR γ -dependent fashion (Figure 4.3). The expression of this *de novo* RSG-induced 5-LO was mainly located in the neurons surrounding the ischemic tissue (Figure 4.4).

OBJECTIVE 2: Study of the alternative activation or M2 in experimental brain ischemia and of the role of the PPAR γ -5-LO pathway in this process

-Study of the role of 5-LO in rosiglitazone-induced neuroprotection in experimental cerebral ischemia in mice: rosiglitazone treatment induces neuroprotection in wild type mice but not in 5-LO $^{-/-}$ mice (Figure 4.5). This result

points to the 5-LO activity as an important mediator of the effects of PPAR γ activation.

-Analysis of the cellular expression of 5-LO in experimental cerebral ischemia in mice. Effect of PPAR γ : as previously demonstrated in rat brain, immunofluorescence analysis of 5-LO in mice brain shows that RSG treatment induces 5-LO expression in neurons that surround the ischemic area (Figure 4.6).

-Study of the role of 5-LO in the expression and signaling of PPAR γ in experimental cerebral ischemia in mice: our results point to a disruption of PPAR γ signaling in 5-LO $^{-/-}$ mice, as shown by an altered regulation of the receptor expression, and a lack of PPAR γ transcriptional activity, anti-inflammatory actions (transrepression of TNF α and MCP-1) or induction of target gene expression (CD36) after RSG treatment in these animals (Figure 4.7). These data confirm the importance of 5-LO in PPAR γ -induced signaling pathways.

-Study of the levels of the 5-LO product lipoxin A $_4$ (LXA $_4$) in experimental cerebral ischemia in mice. Effect of PPAR γ : the effect of PPAR γ activation in the metabolic activity of 5-LO was studied based on the quantification of the intracerebral levels of its product LXA $_4$. Our results show that RSG treatment increases the levels of LXA $_4$ in wild type but not in 5-LO $^{-/-}$ mice (Figure 4.8), pointing to the PPAR γ -mediated *de novo* expression of neuronal 5-LO as the main responsible for this effect.

-Study of the alternative activation or M2 in mouse brain: effect of ischemia and of PPAR γ -5-LO pathway: our results show that the expression of markers of M2 activation such as CD36, arginase I, Ym1 or CD206 were induced in brain after ischemia (Figure 4.9) and that PPAR γ activation up-regulates their expression or increases the infiltration of cells expressing these markers into the ischemic brain (Figures 4.9 and 4.12), suggesting that PPAR γ mediates an M2 polarization after ischemia. This effect may participate in the neuroprotective actions of PPAR γ activation. This hypothesis is reinforced by

the lack of M2 polarization by RSG found in 5-LO^{-/-} mice, an effect that could explain the lack of neuroprotection after PPAR γ activation in these mice.

-Analysis of the cellular location of M2 markers in the ischemic brain in mice: cellular location of M2 markers in the ischemic brain showed that CD36 was mainly expressed by CD11b⁺ CD45^{high} cells, which have been described as microglia. By the other hand, arginase I expression was found in microglial cells, but also in CD11b⁺CD45^{high} cells, which are considered myeloid blood borne cells infiltrated into the brain tissue (Figure 4.10). Immunofluorescence analysis of the expression of CD206 and Ym1 showed their location in neutrophils of the ischemic tissue (Figure 4.11) and, in the case of Ym1, a monocytic population was also immunoreactive for this marker (Figure 4.12). Furthermore, our results also showed that RSG increases the infiltration of Ym1⁺ monocytes into the ischemic tissue in a 5-LO dependent fashion (Figure 4.12). Interestingly, RSG treatment exerts the same effect on the Ym1⁺ neutrophilic population that infiltrates into the tissue (Figure 4.13).

-Characterization of microglia/macrophages phagocytosis of neutrophils after cerebral ischemia in mice. Effect of the PPAR γ -5-LO pathway: analysis of phagocytosis of neutrophils by microglia/macrophages of the ischemic tissue shows that RSG-treatment increases the number of neutrophils engulfed by Iba1⁺ cells in these areas. This resolutive effect induced by RSG treatment was not found in 5-LO^{-/-} mice (Figure 4.14).

OBJECTIVE 3: Effect of the 5-LO product LXA₄ in neuroprotection and M2 activation

-Study of the neuroprotective effect of LXA₄ in cerebral ischemia in rats: our data demonstrate that LXA₄ administration is neuroprotective in brain ischemia. This effect is, at least in part, mediated by PPAR γ (Figure 4.15).

-Characterization of LXA₄ production in vitro: *in vitro* experiments in neuronal cultures confirmed that PPAR γ activation also induces 5-LO expression, which was mainly found in the cytoplasm of the neurons. This effect

was absent in astrocytic cultures (Figure 4.15 and 4.16). Furthermore, LXA₄ endogenous synthesis by neuronal cultures was increased after RSG treatment in a concentration-dependent fashion (Figure 4.16), in agreement with our findings *in vivo*.

-In vitro study of the effect of LXA₄ in M2 activation and phagocytic function in macrophages: direct effect of LXA₄ in cultured macrophages was also evaluated. On one hand, our results show that LXA₄ treatment increases the expression of markers of M2 activation in RAW macrophages (Figure 4.17). Furthermore, LXA₄ treatment also increased the phagocytic capacity of bone marrow macrophages (Figure 4.18).

Taking into account that LXA₄ treatment partially mediates PPAR_γ-induced neuroprotection and M2 polarization, our results indicate that this compound is an important mediator of the 5-LO-PPAR_γ pathway that could explain the obligatory role of 5-LO in the neuroprotective effects mediated by PPAR_γ activation.

Conclusions

- 1- The PPAR_γ agonist rosiglitazone induces the expression of a neuronal 5-lipoxygenase in the ischemic brain in a PPAR_γ-dependent fashion
- 2- PPAR_γ agonist rosiglitazone-mediated neuroprotection in experimental ischemia in mice is dependent on the 5-lipoxygenase activity
- 3- Transcriptional activity and trans-repressor effect induced by PPAR_γ activation in experimental ischemia in rodents are mediated by 5-lipoxygenase
- 4- PPAR_γ activation by rosiglitazone increases the intracerebral levels of LXA₄ in the ipsilateral hemisphere of ischemic animals. This effect is dependent on 5-lipoxygenase
- 5- The PPAR_γ agonist rosiglitazone induces the expression of markers of alternatively activated macrophages such as CD36, arginase I and CD206 in the ischemic brain in a 5-lipoxygenase-dependent fashion

- 6- The PPAR γ agonist rosiglitazone increases the infiltration of M2 monocytes into the ischemic brain in a 5-lipoxygenase-dependent fashion
- 7- The markers of alternative activation in the ischemic brain are localized in microglia/macrophages (CD36, arginase I), monocytes (Ym1) and neutrophils (CD206, Ym1).
- 8- The PPAR γ agonist rosiglitazone increases the phagocytosis of neutrophils by microglia/macrophages in the ischemic brain in a 5-lipoxygenase dependent fashion
- 9- Lipoxin A₄ is neuroprotective in experimental cerebral ischemia by a mechanism dependent, at least in part, on PPAR γ
- 10- The PPAR γ agonist rosiglitazone induces the expression of 5-lipoxygenase and increases the production of lipoxin A₄ in cortical cultured neurons
- 11- Lipoxin A₄ increases the expression of the M2 markers CD36, CD206, arginase I and Ym1 in RAW 264.7 macrophages
- 12- Lipoxin A₄ increases the phagocytic index of M-CSF-differentiated bone marrow macrophages
- 13- PPAR γ activation with rosiglitazone induces M2 polarization in brain ischemia. This effect, as well as its anti-inflammatory properties and its transcriptional activity depend on the enzyme 5-lipoxygenase; therefore, modulation of the PPAR γ -5-LO pathway is a potential strategy for the therapeutic treatment of ischemic stroke.

VIII Bibliografía

BIBLIOGRAFÍA

- Ajami, B., Bennett, J.L., Krieger, C., McNagny, K.M., Rossi, F.M., 2011. Infiltrating monocytes trigger EAE progression, but do not contribute to the resident microglia pool. *Nat Neurosci.* 14, 1142-9.
- al-Essa, L.Y., Niwa, M., Kohno, K., Nozaki, M., Tsurumi, K., 1995. Heterogeneity of circulating and exudated polymorphonuclear leukocytes in superoxide-generating response to cyclic AMP and cyclic AMP-elevating agents. Investigation of the underlying mechanism. *Biochem Pharmacol.* 49, 315-22.
- Aliberti, J., 2005. Host persistence: exploitation of anti-inflammatory pathways by *Toxoplasma gondii*. *Nat Rev Immunol.* 5, 162-70.
- Amantea, D., Nappi, G., Bernardi, G., Bagetta, G., Corasaniti, M.T., 2009. Post-ischemic brain damage: pathophysiology and role of inflammatory mediators. *FEBS J.* 276, 13-26.
- Auriel, E., Bornstein, N.M., 2010. Neuroprotection in acute ischemic stroke-current status. *J Cell Mol Med.* 14, 2200-2.
- Boudreau, L.H., Bertin, J., Robichaud, P.P., Laflamme, M., Ouellette, R.J., Flamand, N., Surette, M.E., 2011. Novel 5-lipoxygenase isoforms affect the biosynthesis of 5-lipoxygenase products. *FASEB J.* 25, 1097-105.
- Bouhlef, M.A., Derudas, B., Rigamonti, E., Dievart, R., Brozek, J., Haulon, S., Zawadzki, C., Jude, B., Torpier, G., Marx, N., Staels, B., Chinetti-Gbaguidi, G., 2007. PPARgamma activation primes human monocytes into alternative M2 macrophages with anti-inflammatory properties. *Cell Metab.* 6, 137-43.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 72, 248-54.
- Breider, T., Callebert, J., Heneka, M.T., Landreth, G., Launay, J.M., Hirsch, E.C., 2002. Protective action of the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonist pioglitazone in a mouse model of Parkinson's disease. *J Neurochem.* 82, 615-24.
- Campanella, M., Sciorati, C., Tarozzo, G., Beltramo, M., 2002. Flow cytometric analysis of inflammatory cells in ischemic rat brain. *Stroke.* 33, 586-92.
- Cardona, A.E., Piro, E.P., Sasse, M.E., Kostenko, V., Cardona, S.M., Dijkstra, I.M., Huang, D., Kidd, G., Dombrowski, S., Dutta, R., Lee, J.C., Cook, D.N., Jung, S., Lira, S.A., Littman, D.R., Ransohoff, R.M., 2006. Control of microglial neurotoxicity by the fractalkine receptor. *Nat Neurosci.* 9, 917-24.
- Carson, M.J., Reilly, C.R., Sutcliffe, J.G., Lo, D., 1998. Mature microglia resemble immature antigen-presenting cells. *Glia.* 22, 72-85.
- Castellanos, M., Castillo, J., Garcia, M.M., Leira, R., Serena, J., Chamorro, A., Davalos, A., 2002. Inflammation-mediated damage in progressing lacunar infarctions: a potential therapeutic target. *Stroke.* 33, 982-7.
- Colton, C.A., 2009. Heterogeneity of microglial activation in the innate immune response in the brain. *J. Neuroimmune Pharmacol.* 4, 399-418.
- Collino, M., Aragno, M., Mastrocola, R., Gallicchio, M., Rosa, A.C., Dianzani, C., Danni, O., Thiemermann, C., Fantozzi, R., 2006. Modulation of the oxidative stress and inflammatory response by PPAR-gamma agonists in

- the hippocampus of rats exposed to cerebral ischemia/reperfusion. *Eur J Pharmacol.* 530, 70-80.
- Cramer, T., Yamanishi, Y., Clausen, B.E., Forster, I., Pawlinski, R., Mackman, N., Haase, V.H., Jaenisch, R., Corr, M., Nizet, V., Firestein, G.S., Gerber, H.P., Ferrara, N., Johnson, R.S., 2003. HIF-1 α is essential for myeloid cell-mediated inflammation. *Cell.* 112, 645-57.
- Cuenca-Lopez, M.D., Brea, D., Galindo, M.F., Anton-Martinez, D., Sanz, M.J., Agulla, J., Castillo, J., Jordan, J., 2010. [Inflammatory response during ischaemic processes: adhesion molecules and immunomodulation]. *Rev Neurol.* 51, 30-40.
- Cui, M., Wang, L., Liang, X., Ma, X., Liu, Y., Yang, M., Liu, K., Wei, X., Zhou, Z., Chen, Y.H., Sun, W., 2010. Blocking TRAIL-DR5 signaling with soluble DR5 reduces delayed neuronal damage after transient global cerebral ischemia. *Neurobiol Dis.* 39, 138-47.
- Culmsee, C., Kriegelstein, J., 2007. Ischaemic brain damage after stroke: new insights into efficient therapeutic strategies. *International Symposium on Neurodegeneration and Neuroprotection. EMBO Rep.* 8, 129-33.
- Chakravarti, A., Rusu, D., Flamand, N., Borgeat, P., Poubelle, P.E., 2009. Reprogramming of a subpopulation of human blood neutrophils by prolonged exposure to cytokines. *Lab Invest.* 89, 1084-99.
- Chandra, V., Huang, P., Hamuro, Y., Raghuram, S., Wang, Y., Burris, T.P., Rastinejad, F., 2008. Structure of the intact PPAR-gamma-RXR- nuclear receptor complex on DNA. *Nature.* 456, 350-6.
- Chang, L., Karin, M., 2001. Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature.* 410, 37-40.
- Chapman, G.A., Moores, K., Harrison, D., Campbell, C.A., Stewart, B.R., Srijbos, P.J., 2000. Fractalkine cleavage from neuronal membranes represents an acute event in the inflammatory response to excitotoxic brain damage. *J Neurosci.* 20, RC87.
- Chawla, A., Barak, Y., Nagy, L., Liao, D., Tontonoz, P., Evans, R.M., 2001. PPAR-gamma dependent and independent effects on macrophage-gene expression in lipid metabolism and inflammation. *Nat Med.* 7, 48-52.
- Chawla, A., 2010. Control of macrophage activation and function by PPARs. *Circ Res.* 106, 1559-69.
- Chen, S.T., Hsu, C.Y., Hogan, E.L., Maricq, H., Balentine, J.D., 1986. A model of focal ischemic stroke in the rat: reproducible extensive cortical infarction. *Stroke.* 17, 738-43.
- Chiang, N., Fierro, I.M., Gronert, K., Serhan, C.N., 2000. Activation of lipoxin A(4) receptors by aspirin-triggered lipoxins and select peptides evokes ligand-specific responses in inflammation. *J Exp Med.* 191, 1197-208.
- Cho, S., Park, E.M., Febbraio, M., Anrather, J., Park, L., Racchumi, G., Silverstein, R.L., Iadecola, C., 2005. The class B scavenger receptor CD36 mediates free radical production and tissue injury in cerebral ischemia. *J Neurosci.* 25, 2504-12.
- Cho, S., Kim, E., 2009. CD36: a multi-modal target for acute stroke therapy. *J Neurochem.* 109 Suppl 1, 126-32.
- Chomczynski, P., Sacchi, N., 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.* 162, 156-9.

- Chung, S.W., Kang, B.Y., Kim, S.H., Pak, Y.K., Cho, D., Trinchieri, G., Kim, T.S., 2000. Oxidized low density lipoprotein inhibits interleukin-12 production in lipopolysaccharide-activated mouse macrophages via direct interactions between peroxisome proliferator-activated receptor-gamma and nuclear factor-kappa B. *J Biol Chem.* 275, 32681-7.
- Daynes, R.A., Jones, D.C., 2002. Emerging roles of PPARs in inflammation and immunity. *Nat Rev Immunol.* 2, 748-59.
- del Zoppo, G., Ginis, I., Hallenbeck, J.M., Iadecola, C., Wang, X., Feuerstein, G.Z., 2000. Inflammation and stroke: putative role for cytokines, adhesion molecules and iNOS in brain response to ischemia. *Brain Pathol.* 10, 95-112.
- del Zoppo, G.J., 2010. Acute anti-inflammatory approaches to ischemic stroke. *Ann N Y Acad Sci.* 1207, 143-8.
- Denes, A., Vidyasagar, R., Feng, J., Narvainen, J., McColl, B.W., Kauppinen, R.A., Allan, S.M., 2007. Proliferating resident microglia after focal cerebral ischaemia in mice. *J.Cereb.Blood Flow Metab.* 27, 1941-1953.
- Diab, A., Deng, C., Smith, J.D., Hussain, R.Z., Phanavanh, B., Lovett-Racke, A.E., Drew, P.D., Racke, M.K., 2002. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonist 15-deoxy-Delta(12,14)-prostaglandin J(2) ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol.* 168, 2508-15.
- Dreyer, C., Krey, G., Keller, H., Givel, F., Helftenbein, G., Wahli, W., 1992. Control of the peroxisomal beta-oxidation pathway by a novel family of nuclear hormone receptors. *Cell.* 68, 879-87.
- Escribano, L., Simon, A.M., Gimeno, E., Cuadrado-Tejedor, M., Lopez de Maturana, R., Garcia-Osta, A., Ricobaraza, A., Perez-Mediavilla, A., Del Rio, J., Frechilla, D., 2010. Rosiglitazone rescues memory impairment in Alzheimer's transgenic mice: mechanisms involving a reduced amyloid and tau pathology. *Neuropsychopharmacology.* 35, 1593-604.
- Farina, C., Aloisi, F., Meinl, E., 2007. Astrocytes are active players in cerebral innate immunity. *Trends Immunol.* 28, 138-45.
- Feigin, V.L., 2007. Stroke in developing countries: can the epidemic be stopped and outcomes improved? *Lancet Neurol.* 6, 94-7.
- Feinstein, D.L., Galea, E., Gavrilyuk, V., Brosnan, C.F., Whitacre, C.C., Dumitrescu-Ozimek, L., Landreth, G.E., Pershadsingh, H.A., Weinberg, G., Heneka, M.T., 2002. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonists prevent experimental autoimmune encephalomyelitis. *Ann Neurol.* 51, 694-702.
- Fernandez-Boyanapalli, R.F., Frasch, S.C., McPhillips, K., Vandivier, R.W., Harry, B.L., Riches, D.W., Henson, P.M., Bratton, D.L., 2009. Impaired apoptotic cell clearance in CGD due to altered macrophage programming is reversed by phosphatidylserine-dependent production of IL-4. *Blood.* 113, 2047-55.
- Fierro, I.M., Serhan, C.N., 2001. Mechanisms in anti-inflammation and resolution: the role of lipoxins and aspirin-triggered lipoxins. *Braz J Med Biol Res.* 34, 555-66.
- Finch, C.E., Laping, N.J., Morgan, T.E., Nichols, N.R., Pasinetti, G.M., 1993. TGF-beta 1 is an organizer of responses to neurodegeneration. *J Cell Biochem.* 53, 314-22.

- Forman, B.M., Tontonoz, P., Chen, J., Brun, R.P., Spiegelman, B.M., Evans, R.M., 1995. 15-Deoxy-delta 12, 14-prostaglandin J2 is a ligand for the adipocyte determination factor PPAR gamma. *Cell*. 83, 803-12.
- Forman, B.M., Chen, J., Evans, R.M., 1997. Hypolipidemic drugs, polyunsaturated fatty acids, and eicosanoids are ligands for peroxisome proliferator-activated receptors alpha and delta. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 94, 4312-7.
- Fridlender, Z.G., Sun, J., Kim, S., Kapoor, V., Cheng, G., Ling, L., Worthen, G.S., Albelda, S.M., 2009. Polarization of tumor-associated neutrophil phenotype by TGF-beta: "N1" versus "N2" TAN. *Cancer Cell*. 16, 183-94.
- Garay, P.A., McAllister, A.K., 2010. Novel roles for immune molecules in neural development: implications for neurodevelopmental disorders. *Front Synaptic Neurosci*. 2, 136.
- Gehrmann, J., Banati, R.B., Wiessner, C., Hossmann, K.A., Kreutzberg, G.W., 1995. Reactive microglia in cerebral ischaemia: an early mediator of tissue damage? *Neuropathol Appl Neurobiol*. 21, 277-89.
- Gelderblom, M., Leyboldt, F., Steinbach, K., Behrens, D., Choe, C.U., Siler, D.A., Arumugam, T.V., Orthey, E., Gerloff, C., Tolosa, E., Magnus, T., 2009. Temporal and spatial dynamics of cerebral immune cell accumulation in stroke. *Stroke*. 40, 1849-57.
- Gonzalez, N., Bensinger, S.J., Hong, C., Beceiro, S., Bradley, M.N., Zelcer, N., Deniz, J., Ramirez, C., Diaz, M., Gallardo, G., de Galarreta, C.R., Salazar, J., Lopez, F., Edwards, P., Parks, J., Andujar, M., Tontonoz, P., Castrillo, A., 2009. Apoptotic cells promote their own clearance and immune tolerance through activation of the nuclear receptor LXR. *Immunity*. 31, 245-58.
- Gordon, S., Martinez, F.O., 2010. Alternative activation of macrophages: mechanism and functions. *Immunity*. 32, 593-604.
- Gottlicher, M., Widmark, E., Li, Q., Gustafsson, J.A., 1992. Fatty acids activate a chimera of the clofibrin acid-activated receptor and the glucocorticoid receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 89, 4653-7.
- Greenberg, M.E., Sun, M., Zhang, R., Febbraio, M., Silverstein, R., Hazen, S.L., 2006. Oxidized phosphatidylserine-CD36 interactions play an essential role in macrophage-dependent phagocytosis of apoptotic cells. *J Exp Med*. 203, 2613-25.
- Gundersen, H.J., Bagger, P., Bendtsen, T.F., Evans, S.M., Korbo, L., Marcussen, N., Moller, A., Nielsen, K., Nyengaard, J.R., Pakkenberg, B., et al., 1988. The new stereological tools: disector, fractionator, nucleator and point sampled intercepts and their use in pathological research and diagnosis. *APMIS*. 96, 857-81.
- Gupta, R.A., Brockman, J.A., Sarraf, P., Willson, T.M., DuBois, R.N., 2001. Target genes of peroxisome proliferator-activated receptor gamma in colorectal cancer cells. *J Biol Chem*. 276, 29681-7.
- Hacke, W., Kaste, M., Bluhmki, E., Brozman, M., Davalos, A., Guidetti, D., Larrue, V., Lees, K.R., Medeghri, Z., Machnig, T., Schneider, D., von Kummer, R., Wahlgren, N., Toni, D., 2008. Thrombolysis with alteplase 3 to 4.5 hours after acute ischemic stroke. *N Engl J Med*. 359, 1317-29.
- Hammarberg, T., Provost, P., Persson, B., Radmark, O., 2000. The N-terminal domain of 5-lipoxygenase binds calcium and mediates calcium stimulation of enzyme activity. *J Biol Chem*. 275, 38787-93.

- Hanaka, H., Shimizu, T., Izumi, T., 2002. Nuclear-localization-signal-dependent and nuclear-export-signal-dependent mechanisms determine the localization of 5-lipoxygenase. *Biochem J.* 361, 505-14.
- Hanger, C., Fletcher, V., Fink, J., Sidwell, A., Roche, A., 2007. Improving care to stroke patients: adding an acute stroke unit helps. *N Z Med J.* 120, U2450.
- Harbord, M., Novelli, M., Canas, B., Power, D., Davis, C., Godovac-Zimmermann, J., Roes, J., Segal, A.W., 2002. Ym1 is a neutrophil granule protein that crystallizes in p47phox-deficient mice. *J Biol Chem.* 277, 5468-75.
- Hauer, H., 2002. The mode of action of thiazolidinediones. *Diabetes Metab Res Rev.* 18 Suppl 2, S10-5.
- Henderson, W.R., Jr., 1994. The role of leukotrienes in inflammation. *Ann Intern Med.* 121, 684-97.
- Heneka, M.T., Feinstein, D.L., Galea, E., Gleichmann, M., Wullner, U., Klockgether, T., 1999. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonists protect cerebellar granule cells from cytokine-induced apoptotic cell death by inhibition of inducible nitric oxide synthase. *J Neuroimmunol.* 100, 156-68.
- Huang, J.T., Welch, J.S., Ricote, M., Binder, C.J., Willson, T.M., Kelly, C., Witztum, J.L., Funk, C.D., Conrad, D., Glass, C.K., 1999. Interleukin-4-dependent production of PPAR-gamma ligands in macrophages by 12/15-lipoxygenase. *Nature.* 400, 378-382.
- Huh, G.S., Boulanger, L.M., Du, H., Riquelme, P.A., Brotz, T.M., Shatz, C.J., 2000. Functional requirement for class I MHC in CNS development and plasticity. *Science.* 290, 2155-9.
- Iadecola, C., Zhang, F., Xu, X., 1995. Inhibition of inducible nitric oxide synthase ameliorates cerebral ischemic damage. *Am J Physiol.* 268, R286-92.
- Iadecola, C., Anrather, J., 2011. The immunology of stroke: from mechanisms to translation. *Nat Med.* 17, 796-808.
- Jatana, M., Giri, S., Ansari, M.A., Elango, C., Singh, A.K., Singh, I., Khan, M., 2006. Inhibition of NF-kappaB activation by 5-lipoxygenase inhibitors protects brain against injury in a rat model of focal cerebral ischemia. *J Neuroinflammation.* 3, 12.
- Jiang, C., Ting, A.T., Seed, B., 1998. PPAR-gamma agonists inhibit production of monocyte inflammatory cytokines. *Nature.* 391, 82-6.
- Jin, R., Yang, G., Li, G., 2010. Inflammatory mechanisms in ischemic stroke: role of inflammatory cells. *J.Leukoc.Biol.* 87, 779-789.
- Jozsef, L., Zouki, C., Petasis, N.A., Serhan, C.N., Filep, J.G., 2002. Lipoxin A4 and aspirin-triggered 15-epi-lipoxin A4 inhibit peroxynitrite formation, NF-kappa B and AP-1 activation, and IL-8 gene expression in human leukocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99, 13266-71.
- Kodera, Y., Takeyama, K., Murayama, A., Suzawa, M., Masuhiro, Y., Kato, S., 2000. Ligand type-specific interactions of peroxisome proliferator-activated receptor gamma with transcriptional coactivators. *J Biol Chem.* 275, 33201-4.
- Kriz, J., 2006. Inflammation in ischemic brain injury: timing is important. *Crit Rev Neurobiol.* 18, 145-57.

- Kure, I., Nishiumi, S., Nishitani, Y., Tanoue, T., Ishida, T., Mizuno, M., Fujita, T., Kutsumi, H., Arita, M., Azuma, T., Yoshida, M., 2010. Lipoxin A(4) reduces lipopolysaccharide-induced inflammation in macrophages and intestinal epithelial cells through inhibition of nuclear factor-kappaB activation. *J Pharmacol Exp Ther.* 332, 541-8.
- Lambe, K.G., Tugwood, J.D., 1996. A human peroxisome-proliferator-activated receptor-gamma is activated by inducers of adipogenesis, including thiazolidinedione drugs. *Eur J Biochem.* 239, 1-7.
- Leal, J., Luengo-Fernandez, R., Gray, A., Petersen, S., Rayner, M., 2006. Economic burden of cardiovascular diseases in the enlarged European Union. *Eur Heart J.* 27, 1610-9.
- Lebeau, A., Terro, F., Rostene, W., Pelaprat, D., 2004. Blockade of 12-lipoxygenase expression protects cortical neurons from apoptosis induced by beta-amyloid peptide. *Cell Death Differ.* 11, 875-84.
- Ledeboer, A., Breve, J.J., Poole, S., Tilders, F.J., Van Dam, A.M., 2000. Interleukin-10, interleukin-4, and transforming growth factor-beta differentially regulate lipopolysaccharide-induced production of pro-inflammatory cytokines and nitric oxide in co-cultures of rat astroglial and microglial cells. *Glia.* 30, 134-42.
- Lee, G., Elwood, F., McNally, J., Weiszmann, J., Lindstrom, M., Amaral, K., Nakamura, M., Miao, S., Cao, P., Learned, R.M., Chen, J.L., Li, Y., 2002. T0070907, a selective ligand for peroxisome proliferator-activated receptor gamma, functions as an antagonist of biochemical and cellular activities. *J Biol Chem.* 277, 19649-57.
- Levene, P.A., and Meyer, G.M., 1912. The action of leucocytes on glucose. *J. Biol. Chem.* 11, 361-370.
- Li, Y., Maher, P., Schubert, D., 1997. A role for 12-lipoxygenase in nerve cell death caused by glutathione depletion. *Neuron.* 19, 453-63.
- Liesz, A., Zhou, W., Mrcsko, E., Karcher, S., Bauer, H., Schwarting, S., Sun, L., Bruder, D., Stegemann, S., Cerwenka, A., Sommer, C., Dalpke, A.H., Veltkamp, R., 2011. Inhibition of lymphocyte trafficking shields the brain against deleterious neuroinflammation after stroke. *Brain.* 134, 704-20.
- Lipton, P., 1999. Ischemic cell death in brain neurons. *Physiol Rev.* 79, 1431-568.
- Lucas, S.M., Rothwell, N.J., Gibson, R.M., 2006. The role of inflammation in CNS injury and disease. *Br J Pharmacol.* 147 Suppl 1, S232-40.
- Machado, F.S., Johndrow, J.E., Esper, L., Dias, A., Bafica, A., Serhan, C.N., Aliberti, J., 2006. Anti-inflammatory actions of lipoxin A4 and aspirin-triggered lipoxin are SOCS-2 dependent. *Nat Med.* 12, 330-4.
- Mandal, A.K., Jones, P.B., Bair, A.M., Christmas, P., Miller, D., Yamin, T.T., Wisniewski, D., Menke, J., Evans, J.F., Hyman, B.T., Bacskai, B., Chen, M., Lee, D.M., Nikolic, B., Soberman, R.J., 2008. The nuclear membrane organization of leukotriene synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 105, 20434-9.
- Mantovani, A., Sica, A., Locati, M., 2005. Macrophage polarization comes of age. *Immunity.* 23, 344-6.
- Mantovani, A., Cassatella, M.A., Costantini, C., Jaillon, S., 2011. Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol.* 11, 519-31.

- Marsh, J.D., Keyrouz, S.G., 2010. Stroke prevention and treatment. *J Am Coll Cardiol.* 56, 683-91.
- Martin-Villalba, A., Herr, I., Jeremias, I., Hahne, M., Brandt, R., Vogel, J., Schenkel, J., Herdegen, T., Debatin, K.M., 1999. CD95 ligand (FasL/APO-1L) and tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand mediate ischemia-induced apoptosis in neurons. *J Neurosci.* 19, 3809-17.
- Martinez, F.O., Sica, A., Mantovani, A., Locati, M., 2008. Macrophage activation and polarization. *Front Biosci.* 13, 453-461.
- Martinez, F.O., Helming, L., Gordon, S., 2009. Alternative activation of macrophages: an immunologic functional perspective. *Annu Rev Immunol.* 27, 451-83.
- Matsumoto, H., Kumon, Y., Watanabe, H., Ohnishi, T., Takahashi, H., Imai, Y., Tanaka, J., 2007. Expression of CD200 by macrophage-like cells in ischemic core of rat brain after transient middle cerebral artery occlusion. *Neurosci Lett.* 418, 44-8.
- Matzinger, P., 2002. The danger model: a renewed sense of self. *Science.* 296, 301-5.
- McCarthy, K.D., de Vellis, J., 1980. Preparation of separate astroglial and oligodendroglial cell cultures from rat cerebral tissue. *J Cell Biol.* 85, 890-902.
- McKenna, N.J., O'Malley, B.W., 2002. Combinatorial control of gene expression by nuclear receptors and coregulators. *Cell.* 108, 465-74.
- Medawar, P.B., 1948. Immunity to homologous grafted skin; the fate of skin homografts transplanted to the brain, to subcutaneous tissue, and to the anterior chamber of the eye. *Br J Exp Pathol.* 29, 58-69.
- Meisel, C., Schwab, J.M., Prass, K., Meisel, A., Dirnagl, U., 2005. Central nervous system injury-induced immune deficiency syndrome. *Nat Rev Neurosci.* 6, 775-86.
- Michelucci, A., Heurtaux, T., Grandbarbe, L., Morga, E., Heuschling, P., 2009. Characterization of the microglial phenotype under specific pro-inflammatory and anti-inflammatory conditions: Effects of oligomeric and fibrillar amyloid-beta. *J Neuroimmunol.* 210, 3-12.
- Mitchell, D., O'Meara, S.J., Gaffney, A., Crean, J.K., Kinsella, B.T., Godson, C., 2007. The Lipoxin A4 receptor is coupled to SHP-2 activation: implications for regulation of receptor tyrosine kinases. *J Biol Chem.* 282, 15606-18.
- Moore, K.J., Rosen, E.D., Fitzgerald, M.L., Randow, F., Andersson, L.P., Altshuler, D., Milstone, D.S., Mortensen, R.M., Spiegelman, B.M., Freeman, M.W., 2001. The role of PPAR-gamma in macrophage differentiation and cholesterol uptake. *Nat Med.* 7, 41-7.
- Morgan, T.E., Nichols, N.R., Pasinetti, G.M., Finch, C.E., 1993. TGF-beta 1 mRNA increases in macrophage/microglial cells of the hippocampus in response to deafferentation and kainic acid-induced neurodegeneration. *Exp Neurol.* 120, 291-301.
- Mosser, D.M., 2003. The many faces of macrophage activation. *J Leukoc Biol.* 73, 209-12.
- Mosser, D.M., Edwards, J.P., 2008. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat.Rev.Immunol.* 8, 958-969.

- Mukundan, L., Odegaard, J.I., Morel, C.R., Heredia, J.E., Mwangi, J.W., Ricardo-Gonzalez, R.R., Goh, Y.P., Eagle, A.R., Dunn, S.E., Awakuni, J.U., Nguyen, K.D., Steinman, L., Michie, S.A., Chawla, A., 2009. PPAR-delta senses and orchestrates clearance of apoptotic cells to promote tolerance. *Nat Med.* 15, 1266-72.
- Nagy, L., Tontonoz, P., Alvarez, J.G., Chen, H., Evans, R.M., 1998. Oxidized LDL regulates macrophage gene expression through ligand activation of PPARgamma. *Cell.* 93, 229-40.
- Nakamura, T., Yamamoto, E., Kataoka, K., Yamashita, T., Tokutomi, Y., Dong, Y.F., Matsuba, S., Ogawa, H., Kim-Mitsuyama, S., 2007. Pioglitazone exerts protective effects against stroke in stroke-prone spontaneously hypertensive rats, independently of blood pressure. *Stroke.* 38, 3016-22.
- Nosjean, O., Boutin, J.A., 2002. Natural ligands of PPARgamma: are prostaglandin J(2) derivatives really playing the part? *Cell Signal.* 14, 573-83.
- Odegaard, J.I., Ricardo-Gonzalez, R.R., Goforth, M.H., Morel, C.R., Subramanian, V., Mukundan, L., Red, E.A., Vats, D., Brombacher, F., Ferrante, A.W., Chawla, A., 2007. Macrophage-specific PPARgamma controls alternative activation and improves insulin resistance. *Nature.* 447, 1116-1120.
- Pascual, G., Fong, A.L., Ogawa, S., Gamliel, A., Li, A.C., Perissi, V., Rose, D.W., Willson, T.M., Rosenfeld, M.G., Glass, C.K., 2005. A SUMOylation-dependent pathway mediates transrepression of inflammatory response genes by PPAR-gamma. *Nature.* 437, 759-63.
- Perego, C., Fumagalli, S., De Simoni, M.G., 2011. Temporal pattern of expression and colocalization of microglia/macrophage phenotype markers following brain ischemic injury in mice. *J Neuroinflammation.* 8, 174.
- Pereira, M.P., Hurtado, O., Cardenas, A., Alonso-Escolano, D., Bosca, L., Vivancos, J., Nombela, F., Leza, J.C., Lorenzo, P., Lizasoain, I., Moro, M.A., 2005. The nonthiazolidinedione PPARgamma agonist L-796,449 is neuroprotective in experimental stroke. *J Neuropathol Exp Neurol.* 64, 797-805.
- Pereira, M.P., Hurtado, O., Cardenas, A., Bosca, L., Castillo, J., Davalos, A., Vivancos, J., Serena, J., Lorenzo, P., Lizasoain, I., Moro, M.A., 2006. Rosiglitazone and 15-deoxy-Delta12,14-prostaglandin J2 cause potent neuroprotection after experimental stroke through noncompletely overlapping mechanisms. *J Cereb Blood Flow Metab.* 26, 218-29.
- Perry, V.H., Gordon, S., 1988. Macrophages and microglia in the nervous system. *Trends Neurosci.* 11, 273-7.
- Perry, V.H., Cunningham, C., Holmes, C., 2007. Systemic infections and inflammation affect chronic neurodegeneration. *Nat Rev Immunol.* 7, 161-7.
- Peters-Golden, M., Brock, T.G., 2003. 5-lipoxygenase and FLAP. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 69, 99-109.
- Ponomarev, E.D., Maresz, K., Tan, Y., Dittel, B.N., 2007. CNS-derived interleukin-4 is essential for the regulation of autoimmune inflammation and induces a state of alternative activation in microglial cells. *J Neurosci.* 27, 10714-21.

- Probert, L., Selmaj, K., 1997. TNF and related molecules: trends in neuroscience and clinical applications. *J Neuroimmunol.* 72, 113-7.
- Puellmann, K., Kaminski, W.E., Vogel, M., Nebe, C.T., Schroeder, J., Wolf, H., Beham, A.W., 2006. A variable immunoreceptor in a subpopulation of human neutrophils. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103, 14441-6.
- Puig-Kroger, A., Serrano-Gomez, D., Caparros, E., Dominguez-Soto, A., Relloso, M., Colmenares, M., Martinez-Munoz, L., Longo, N., Sanchez-Sanchez, N., Rincon, M., Rivas, L., Sanchez-Mateos, P., Fernandez-Ruiz, E., Corbi, A.L., 2004. Regulated expression of the pathogen receptor dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3 (ICAM-3)-grabbing nonintegrin in THP-1 human leukemic cells, monocytes, and macrophages. *J Biol Chem.* 279, 25680-8.
- Raes, G., Van den Bergh, R., De Baetselier, P., Ghassabeh, G.H., Scotton, C., Locati, M., Mantovani, A., Sozzani, S., 2005. Arginase-1 and Ym1 are markers for murine, but not human, alternatively activated myeloid cells. *J Immunol.* 174, 6561; author reply 6561-2.
- Raschke, W.C., Baird, S., Ralph, P., Nakoinz, I., 1978. Functional macrophage cell lines transformed by Abelson leukemia virus. *Cell.* 15, 261-7.
- Ricote, M., Li, A.C., Willson, T.M., Kelly, C.J., Glass, C.K., 1998. The peroxisome proliferator-activated receptor-gamma is a negative regulator of macrophage activation. *Nature.* 391, 79-82.
- Ricote, M., Glass, C.K., 2007. PPARs and molecular mechanisms of transrepression. *Biochim Biophys Acta.* 1771, 926-35.
- Roger, V.L., Go, A.S., Lloyd-Jones, D.M., Benjamin, E.J., Berry, J.D., Borden, W.B., Bravata, D.M., Dai, S., Ford, E.S., Fox, C.S., Fullerton, H.J., Gillespie, C., Hailpern, S.M., Heit, J.A., Howard, V.J., Kissela, B.M., Kittner, S.J., Lackland, D.T., Lichtman, J.H., Lisabeth, L.D., Makuc, D.M., Marcus, G.M., Marelli, A., Matchar, D.B., Moy, C.S., Mozaffarian, D., Mussolino, M.E., Nichol, G., Paynter, N.P., Soliman, E.Z., Sorlie, P.D., Sotoodehnia, N., Turan, T.N., Virani, S.S., Wong, N.D., Woo, D., Turner, M.B., 2012. Heart disease and stroke statistics--2012 update: a report from the American Heart Association. *Circulation.* 125, e2-e220.
- Rosamond, W., Flegal, K., Friday, G., Furie, K., Go, A., Greenlund, K., Haase, N., Ho, M., Howard, V., Kissela, B., Kittner, S., Lloyd-Jones, D., McDermott, M., Meigs, J., Moy, C., Nichol, G., O'Donnell, C.J., Roger, V., Rumsfeld, J., Sorlie, P., Steinberger, J., Thom, T., Wasserthiel-Smoller, S., Hong, Y., 2007. Heart disease and stroke statistics--2007 update: a report from the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. *Circulation.* 115, e69-171.
- Rosas-Ballina, M., Olofsson, P.S., Ochani, M., Valdes-Ferrer, S.I., Levine, Y.A., Reardon, C., Tusche, M.W., Pavlov, V.A., Andersson, U., Chavan, S., Mak, T.W., Tracey, K.J., 2011. Acetylcholine-synthesizing T cells relay neural signals in a vagus nerve circuit. *Science.* 334, 98-101.
- Schaldach, C.M., Riby, J., Bjeldanes, L.F., 1999. Lipoxin A4: a new class of ligand for the Ah receptor. *Biochemistry.* 38, 7594-600.
- Segel, G.B., Halterman, M.W., Lichtman, M.A., 2011. The paradox of the neutrophil's role in tissue injury. *J Leukoc Biol.* 89, 359-72.
- Serhan, C.N., Nicolaou, K.C., Webber, S.E., Veale, C.A., Dahlen, S.E., Puustinen, T.J., Samuelsson, B., 1986. Lipoxin A. Stereochemistry and biosynthesis. *J Biol Chem.* 261, 16340-5.

- Serhan, C.N., Levy, B., 2003. Novel pathways and endogenous mediators in anti-inflammation and resolution. *Chem Immunol Allergy*. 83, 115-45.
- Serhan, C.N., Brain, S.D., Buckley, C.D., Gilroy, D.W., Haslett, C., O'Neill, L.A., Perretti, M., Rossi, A.G., Wallace, J.L., 2007. Resolution of inflammation: state of the art, definitions and terms. *FASEB J*. 21, 325-332.
- Serhan, C.N., Chiang, N., Van Dyke, T.E., 2008. Resolving inflammation: dual anti-inflammatory and pro-resolution lipid mediators. *Nat Rev Immunol*. 8, 349-61.
- Sharma, J.N., Mohammed, L.A., 2006. The role of leukotrienes in the pathophysiology of inflammatory disorders: is there a case for revisiting leukotrienes as therapeutic targets? *Inflammopharmacology*. 14, 10-6.
- Shichita, T., Hasegawa, E., Kimura, A., Morita, R., Sakaguchi, R., Takada, I., Sekiya, T., Ooboshi, H., Kitazono, T., Yanagawa, T., Ishii, T., Takahashi, H., Mori, S., Nishibori, M., Kuroda, K., Akira, S., Miyake, K., Yoshimura, A., 2012. Peroxiredoxin family proteins are key initiators of post-ischemic inflammation in the brain. *Nat Med*.
- Shimazu, T., Inoue, I., Araki, N., Asano, Y., Sawada, M., Furuya, D., Nagoya, H., Greenberg, J.H., 2005. A peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonist reduces infarct size in transient but not in permanent ischemia. *Stroke*. 36, 353-9.
- Sobrado, M., Pereira, M.P., Ballesteros, I., Hurtado, O., Fernandez-Lopez, D., Pradillo, J.M., Caso, J.R., Vivancos, J., Nombela, F., Serena, J., Lizasoain, I., Moro, M.A., 2009. Synthesis of lipoxin A4 by 5-lipoxygenase mediates PPARgamma-dependent, neuroprotective effects of rosiglitazone in experimental stroke. *J Neurosci*. 29, 3875-3884.
- Stevens, B., Allen, N.J., Vazquez, L.E., Howell, G.R., Christopherson, K.S., Nouri, N., Micheva, K.D., Mehalow, A.K., Huberman, A.D., Stafford, B., Sher, A., Litke, A.M., Lambris, J.D., Smith, S.J., John, S.W., Barres, B.A., 2007. The classical complement cascade mediates CNS synapse elimination. *Cell*. 131, 1164-78.
- Stevens, S.L., Bao, J., Hollis, J., Lessov, N.S., Clark, W.M., Stenzel-Poore, M.P., 2002. The use of flow cytometry to evaluate temporal changes in inflammatory cells following focal cerebral ischemia in mice. *Brain Res*. 932, 110-9.
- Stienstra, R., Duval, C., Keshtkar, S., van der Laak, J., Kersten, S., Muller, M., 2008. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma activation promotes infiltration of alternatively activated macrophages into adipose tissue. *J Biol Chem*. 283, 22620-7.
- Stout, R.D., Jiang, C., Matta, B., Tietzel, I., Watkins, S.K., Suttles, J., 2005. Macrophages sequentially change their functional phenotype in response to changes in microenvironmental influences. *J Immunol*. 175, 342-9.
- Strasser, A., Jost, P.J., Nagata, S., 2009. The many roles of FAS receptor signaling in the immune system. *Immunity*. 30, 180-92.
- Subbaramaiah, K., Lin, D.T., Hart, J.C., Dannenberg, A.J., 2001. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligands suppress the transcriptional activation of cyclooxygenase-2. Evidence for involvement of activator protein-1 and CREB-binding protein/p300. *J Biol Chem*. 276, 12440-8.
- Sundararajan, S., Gamboa, J.L., Victor, N.A., Wanderi, E.W., Lust, W.D., Landreth, G.E., 2005. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma

- ligands reduce inflammation and infarction size in transient focal ischemia. *Neuroscience*. 130, 685-96.
- Suzuki, Y., Claflin, J., Wang, X., Lengi, A., Kikuchi, T., 2005. Microglia and macrophages as innate producers of interferon-gamma in the brain following infection with *Toxoplasma gondii*. *Int J Parasitol*. 35, 83-90.
- Szczepanik, A.M., Funes, S., Petko, W., Ringheim, G.E., 2001. IL-4, IL-10 and IL-13 modulate A beta(1--42)-induced cytokine and chemokine production in primary murine microglia and a human monocyte cell line. *J Neuroimmunol*. 113, 49-62.
- Tarkowski, E., Rosengren, L., Blomstrand, C., Wikkelso, C., Jensen, C., Ekholm, S., Tarkowski, A., 1995. Early intrathecal production of interleukin-6 predicts the size of brain lesion in stroke. *Stroke*. 26, 1393-8.
- Taylor, P.R., Gordon, S., Martinez-Pomares, L., 2005. The mannose receptor: linking homeostasis and immunity through sugar recognition. *Trends Immunol*. 26, 104-10.
- Tiemessen, M.M., Jagger, A.L., Evans, H.G., van Herwijnen, M.J., John, S., Taams, L.S., 2007. CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells induce alternative activation of human monocytes/macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 104, 19446-51.
- Tontonoz, P., Nagy, L., Alvarez, J.G., Thomazy, V.A., Evans, R.M., 1998. PPARgamma promotes monocyte/macrophage differentiation and uptake of oxidized LDL. *Cell*. 93, 241-52.
- Tu, X.K., Yang, W.Z., Shi, S.S., Chen, C.M., Wang, C.H., 2009. 5-lipoxygenase inhibitor zileuton attenuates ischemic brain damage: involvement of matrix metalloproteinase 9. *Neurol Res*. 31, 848-52.
- Tugwood, J.D., Aldridge, T.C., Lambe, K.G., Macdonald, N., Woodyatt, N.J., 1996. Peroxisome proliferator-activated receptors: structures and function. *Ann N Y Acad Sci*. 804, 252-65.
- Tureyen, K., Kapadia, R., Bowen, K.K., Satriotomo, I., Liang, J., Feinstein, D.L., Vemuganti, R., 2007. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonists induce neuroprotection following transient focal ischemia in normotensive, normoglycemic as well as hypertensive and type-2 diabetic rodents. *J Neurochem*. 101, 41-56.
- Vats, D., Mukundan, L., Odegaard, J.I., Zhang, L., Smith, K.L., Morel, C.R., Wagner, R.A., Greaves, D.R., Murray, P.J., Chawla, A., 2006. Oxidative metabolism and PGC-1beta attenuate macrophage-mediated inflammation. *Cell Metab*. 4, 13-24.
- Victor, N.A., Wanderi, E.W., Gamboa, J., Zhao, X., Aronowski, J., Deiningner, K., Lust, W.D., Landreth, G.E., Sundararajan, S., 2006. Altered PPARgamma expression and activation after transient focal ischemia in rats. *Eur.J.Neurosci*. 24, 1653-1663.
- Vila, N., Castillo, J., Davalos, A., Chamorro, A., 2000. Proinflammatory cytokines and early neurological worsening in ischemic stroke. *Stroke*. 31, 2325-9.
- Wang, N., Verna, L., Chen, N.G., Chen, J., Li, H., Forman, B.M., Stemerman, M.B., 2002. Constitutive activation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma suppresses pro-inflammatory adhesion molecules in human vascular endothelial cells. *J Biol Chem*. 277, 34176-81.

- Wang, Q., Tang, X.N., Yenari, M.A., 2007. The inflammatory response in stroke. *J.Neuroimmunol.* 184, 53-68.
- Werz, O., Burkert, E., Fischer, L., Szellas, D., Dishart, D., Samuelsson, B., Radmark, O., Steinhilber, D., 2002. Extracellular signal-regulated kinases phosphorylate 5-lipoxygenase and stimulate 5-lipoxygenase product formation in leukocytes. *FASEB J.* 16, 1441-3.
- Wong, C.H., Jenne, C.N., Lee, W.Y., Leger, C., Kubes, P., 2011. Functional innervation of hepatic iNKT cells is immunosuppressive following stroke. *Science.* 334, 101-5.
- Wu, Y., Ye, X.H., Guo, P.P., Xu, S.P., Wang, J., Yuan, S.Y., Yao, S.L., Shang, Y., 2010. Neuroprotective effect of lipoxin A4 methyl ester in a rat model of permanent focal cerebral ischemia. *J Mol Neurosci.* 42, 226-34.
- Ye, Y., Lin, Y., Perez-Polo, J.R., Uretsky, B.F., Ye, Z., Tieu, B.C., Birnbaum, Y., 2008. Phosphorylation of 5-lipoxygenase at ser523 by protein kinase A determines whether pioglitazone and atorvastatin induce proinflammatory leukotriene B4 or anti-inflammatory 15-epi-lipoxin a4 production. *J Immunol.* 181, 3515-23.
- Zarruk, J.G., Fernandez-Lopez, D., Garcia-Yebenes, I., Garcia-Gutierrez, M.S., Vivancos, J., Nombela, F., Torres, M., Burguete, M.C., Manzanares, J., Lizasoain, I., Moro, M.A., 2012. Cannabinoid type 2 receptor activation downregulates stroke-induced classic and alternative brain macrophage/microglial activation concomitant to neuroprotection. *Stroke.* 43, 211-9.
- Zhang, L., Zhang, W.P., Hu, H., Wang, M.L., Sheng, W.W., Yao, H.T., Ding, W., Chen, Z., Wei, E.Q., 2006. Expression patterns of 5-lipoxygenase in human brain with traumatic injury and astrocytoma. *Neuropathology.* 26, 99-106.
- Zhao, X., Grotta, J., Gonzales, N., Aronowski, J., 2009a. Hematoma resolution as a therapeutic target: the role of microglia/macrophages. *Stroke.* 40, S92-4.
- Zhao, X., Strong, R., Zhang, J., Sun, G., Tsien, J.Z., Cui, Z., Grotta, J.C., Aronowski, J., 2009b. Neuronal PPARgamma deficiency increases susceptibility to brain damage after cerebral ischemia. *J Neurosci.* 29, 6186-95.
- Zhao, Y., Patzer, A., Herdegen, T., Gohlke, P., Culman, J., 2006. Activation of cerebral peroxisome proliferator-activated receptors gamma promotes neuroprotection by attenuation of neuronal cyclooxygenase-2 overexpression after focal cerebral ischemia in rats. *The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology.* 20, 1162-75.
- Zhou, X.Y., Wu, P., Zhang, L., Xiong, W., Li, Y.S., Feng, Y.M., Ye, D.Y., 2007. Effects of lipoxin A(4) on lipopolysaccharide induced proliferation and reactive oxygen species production in RAW264.7 macrophages through modulation of G-CSF secretion. *Inflamm Res.* 56, 324-33.
- Zhou, Y., Wei, E.Q., Fang, S.H., Chu, L.S., Wang, M.L., Zhang, W.P., Yu, G.L., Ye, Y.L., Lin, S.C., Chen, Z., 2006. Spatio-temporal properties of 5-lipoxygenase expression and activation in the brain after focal cerebral ischemia in rats. *Life Sci.* 79, 1645-56.

