

EFFECTE DE L'ADMINISTRACIÓ DE L'RT-PA EN  
CONDICIONS ISQUÈMIQUES IN VITRO I IN VIVO:  
CAV-1 COM A POTENCIAL BIOMARCADOR DE  
VOLUM D'INFART

**Pau Comajoan von Arend**

Per citar o enllaçar aquest document:  
Para citar o enlazar este documento:  
Use this url to cite or link to this publication:  
<http://hdl.handle.net/10803/669184>



<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/deed.ca>

Aquesta obra està subjecta a una llicència Creative Commons Reconeixement-  
NoComercial-SenseObraDerivada

Esta obra está bajo una licencia Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-  
SinObraDerivada

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial-  
NoDerivatives licence

Tesi Doctoral

**Efecte de l'administració de l'rt-PA en condicions  
isquèmiques *in vitro* i *in vivo*: Cav-1 com a  
potencial biomarcador de volum d'infart**

Pau Comajoan von Arend  
2019

Universitat  
de Girona

IdIB  
Gi





Tesi doctoral

**Efecte de l'administració de l'rt-PA en condicions isquèmiques *in vitro* i *in vivo*: Cav-1 com a potencial biomarcador de volum d'infart**

Pau Comajoan von Arend  
2019

Programa de doctorat en Biologia molecular, Biomedicina i Salut.

**Directores de tesi**

Dra. Elisabet Kádár García

Dra. M<sup>a</sup> Carme Gubern Mérida

Dra. M<sup>a</sup> del Mar  
Castellanos Rodrigo

**Doctorand**

Pau Comajoan von Arend

Memòria presentada per optar al títol de doctor per la Universitat de Girona



## AGRAÏMENTS

Fa uns 4 anys enrere no m'hagués imaginat mai que ara estaria escrivint els agraïments d'una tesi, i de fet, molt probablement no l'hagués acabat si no m'hagués trobat amb el bon rotllo i la bona companyia que han suposat alenades d'aire fresc en els moments més feixucs del procés. Sona a tòpic però no pot ser més cert.

En primer lloc voldria començar donant les gràcies a les directores d'aquesta tesi, l'Elisabet, la Carme i la Mar, per el fet d'haver apostat per mi i haver-me donat la oportunitat de desenvolupar la tesi en els grups de Neuro de la UdG i de l'IdibGi. La veritat és que ha sigut un plaer treballar amb vosaltres i no ho dic per quedar bé però m'ho heu posat molt fàcil.

No cal dir que una part imprescindible de la recerca és el finançament i en aquest sentit vull agrair tot el suport aportat per els grups de Neurologia Cel·lular i Molecular de la UdG i de Patologia Cerebrovascular de l'IdibGi, i els seus IPs, la Gemma i en Joaquín. Així com també agrair a la Universitat de Girona pel fet de concedir-me la beca IF-UdG 2015 que m'ha permès realitzar aquests 4 anys de feina.

També m'agradaria destacar el meravellós despatx on es conrea la recerca anomenat la Granja i donar les gràcies a les companyes i companys per les bones, i no tant bones, però profitoses estones que hem passat. A l'Elena i la Sandra, les veteranes que han anat acollint i encarrilant a tots els novatos que anàvem començant i ja son doctores (pràcticament); A l'Iker i l'Ellana i els debats frikis que ens muntàvem ideals per procrastinar una mica. A l'Eli per els moments de calma i a l'Irene, una gran companya de grup que m'entenia perfectament quan em desfogava parlant dels problemes dels models animals. Llavors hi ha la part "upstairs" amb tota la tropa de bioquímics. Pedro (ànims que aviat estaràs escrivint això mateix), Laura, Anna, Adrià, Àlex, Montse, moltes gràcies per les bones estones dinant i el bon ambient que es respirava quan us venia envair el laboratori.

Voldria donar les gràcies també als ja doctors que van anar acabant i van marxar a provar sort a fora de la UdG, en Pau, la Sara, la Mireia, en Luis, en Santi, l'Imma... per la seva ajuda durant els primers mesos/anys de doctorat on encara no sabia gaire on m'havia ficat.

No puc acabar sense agrair a tota la colla de l'IdibGi, el companyerisme i el bon rotllo entre poiates. Maria, Jes, Ferran, Marina, Berta, Rocio...

Finalment, i no per això menys important, gràcies família perquè mai heu dubtat que pogués arribar fins aquí i això m'ha fet anar tirant en moments de dubtes. I a tu, Carla, gràcies per aguantar-me dia a dia i ser el meu punt de referència, puntal i companya d'aventures.

Moltes gràcies a tothom, no he pogut estar envoltat d'una companyia millor.

Pau

## PUBLICACIÓ DERIVADA D'AQUESTA TESI:

Comajoan P, Gubern C, Huguet G, Serena J, Kádár E, Castellanos M (2018) Evaluation of common housekeeping proteins under ischemic conditions and/or rt-PA treatment in bEnd.3 cells. *J Proteomics* 184:10-5.

Publicació adjuntada a l'Annex.





## LLISTA D'ABREVIATURES

ACM	artèria cerebral mitjana
ADN	àcid desoxiribonucleic
AF6	afadina-6
AIT	atac isquèmic transitori
AMPA	de l'anglès "α-amino-3-hydroxy-5-methylisoxasole-4-propionic"
APC	de l'anglès "activated protein C"
ARN	àcid ribonucleic
ATCC	de l'anglès "American Type Culture Collection"
ATP	de l'anglès "adenosine triphosphate"
BDNF	de l'anglès "brain-derived neurotrophic factor"
BHE	barrera hematoencefàlica
BMECs	de l'anglès "brain microvascular endothelial cells"
BSA	de l'anglès "bovine serum albumin"
CAMs	de l'anglès "cell adhesion molecules"
Cav-1, 2 i 3	Caveolina-1, 2 i 3
CEs	cèl·lules endotelials
COX2	ciclooxygenasa-2
CSD	de l'anglès "caveolin scaffold domain"
CT	de l'anglès "computed tomography"
DAB	diaminobenzidina
DALYs	de l'anglès "disability-adjusted life-years"
DIV3, 4	dia <i>in vitro</i> 3, 4
DMEM HG	de l'anglès "high glucose Dulbecco's Modified Eagle's medium"
ELISA	de l'anglès "enzyme-linked immunosorbent assay"
eNOS	de l'anglès "endothelial nitric oxide synthase"

ER $\alpha$	de l'anglès "estrogen receptor $\alpha$ "
FBS	de l'anglès "fetal bovine serum"
FDA	de l'anglès "Food and Drug Administration"
GAPDH	de l'anglès "glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase"
GDNF	de l'anglès "glial-derived neurotrophic factor"
GLUT1	de l'anglès "Glucose transporter 1"
GLUT3	de l'anglès "Glucose transporter 3"
GPCR	de l'anglès "G protein-coupled receptors"
GSK3 $\beta$	de l'anglès "Glycogen synthase kinase 3 beta"
HIF-1	de l'anglès "hypoxia-inducible factor"
HPRT	de l'anglès "Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase"
HQ	histoquímica
ICAM-1	de l'anglès "intracellular cell adhesion molecule 1"
IF	immunofluorescència
IGF-1	de l'anglès "insulin-like growth factor 1"
IHF	immunohistofluorescència
IL-1 $\beta$	interleuquina 1 $\beta$
IL-6	interleuquina 6
iNOS	de l'anglès "inducible nitric oxide synthase"
IP3	inositol 1,4,5-trifosfat
LDH	lactat deshidrogenasa
LRP	de l'anglès "low-density lipoprotein receptor-related protein"
MAGI	de l'anglès "membrane associated guanylate kinase inverted"
MALS	molècules d'adhesió de leucòcits
MAPK	de l'anglès "mitogen-activated protein kinases"

MAUs	molècules adhesives d'unió
MB	membrana basal
MCAO	de l'anglès "middle cerebral artery occlusion"
MCP-1	de l'anglès "monocyte chemoattractant protein-1"
MEC	matriu extracel·lular
MMPs	matrix metalloproteases
MRI	de l'anglès "magnetic resonance imaging"
MUPP1	de l'anglès "multi-PDZ domain protein 1"
NADPH	nicotinamida adenina dinucleòtid fosfat
NINDS	de l'anglès "National Institute of Neurological Disorders and Stroke"
NMDA	N-metil-D-aspartat
nNOS	de l'anglès "neuronal nitric oxide synthase"
NO	de l'anglès "nitric oxide"
NOS	de l'anglès "nitric oxide synthase"
NOX	de l'anglès "NADPH oxidase"
PAI-1	de l'anglès "plasminogen activator inhibitor 1"
PAR1	de l'anglès "protease-activated receptor 1"
PAR-3	de l'anglès "partitioning-defective protein 3"
PAs	peus astrocítics
PBS	de l'anglès "phosphate buffered saline"
PCs	perícits
PI3K	de l'anglès "phosphoinositide 3-kinase"
PKB	de l'anglès "protein kinase B"
PKC, A	de l'anglès "protein kinase C, A"
PLVAP	de l'anglès "plasmalemma vesicle-associated protein"
POG	privació d'oxigen i glucosa
PVDF	de l'anglès "polyvinylidene difluoride"
RhoA	de l'anglès "Ras homolog A"

RNS	de l'anglès "reactive nitrogen species"
ROS	de l'anglès "reactive oxygen species"
RTK	de l'anglès "receptor tyrosine kinases"
rt-PA	de l'anglès "recombinant tissue plasminogen activator"
SFK	de l'anglès "Src family kinase"
SLC2A1	de l'anglès "Solute Carrier Family 2 Member 1"
SNC	sistema nerviós central
TBST	de l'anglès "Tris buffered saline" amb Tween-20 o Tritó X-100
TEER	de l'anglès "transendothelial electrical resistance"
TGF $\beta$	de l'anglès "transforming growth factor- $\beta$ "
TH	transformació hemorràgica
TLRs	de l'anglès "toll-like receptors"
TNF- $\alpha$	de l'anglès "tumor necrosis factor $\alpha$ "
t-PA	de l'anglès "tissue plasminogen activator"
UAs	unions adherents
UEs	unions estretes
UNV	unitat neurovascular
VE-cadherina	de l'anglès "vascular endothelial cadherin"
VEGF	de l'anglès "vascular endothelial growth factor"
WB	"Western blot"
XO	de l'anglès "xanthine oxidase"
ZO-1	Zonula Occludens 1

## ÍNDIX DE FIGURES

<b>Figura 1.1</b>	Classificació eitològica de l'íctus.	5
<b>Figura 1.2</b>	Territoris vasculars de les artèries cerebrals principals	6
<b>Figura 1.3</b>	Fisiopatologia cel·lular i molecular de l'íctus isquèmic	8
<b>Figura 1.4</b>	Components de la BHE	21
<b>Figura 1.5</b>	Representació esquemàtica de les diferents unions entre les CEs de la BHE	28
<b>Figura 1.6</b>	Representació esquemàtica d'una caveola i de la Caveolina	41
<b>Figura 1.7</b>	Configuracions comunament utilitzades en els models de BHE <i>in vitro</i>	48
<b>Figura 4.1</b>	Inserts semipermeables	59
<b>Figura 4.2</b>	Disseny experimental <i>in vitro</i>	61
<b>Figura 4.3</b>	Representació esquemàtica de la tècnica "Western blot"	66
<b>Figura 4.4</b>	Imatge representativa de la quantificació de la proteïna total amb els gels "Criterion TGX Stain-Free™"	67
<b>Figura 4.5</b>	Imatge representativa de la injecció de trombina a l'artèria ACM	70
<b>Figura 4.6</b>	Disseny experimental <i>in vivo</i>	71
<b>Figura 5.1</b>	Optimització del cultiu de bEnd.3	79
<b>Figura 5.2</b>	Efecte de 2,5 h de POG i/o tractament amb rt-PA sobre les cèl·lules bEnd.3	81
<b>Figura 5.3</b>	Imatge representativa de la proteïna total visualitzada amb la tecnologia "Stain-Free"	82
<b>Figura 5.4</b>	Nivells proteics de $\beta$ -Actina, $\alpha$ -Tubulina, GAPDH i HPRT en les cèl·lules bEnd.3 després de 2,5 h de POG i/o tractament amb rt-PA	83
<b>Figura 5.5</b>	Efecte de 2,5 h de POG i/o tractament amb rt-PA sobre els nivells de les proteïnes Claudina-5 i ZO-1 en les cèl·lules bEnd.3.	84
<b>Figura 5.6</b>	Anàlisi d'immunofluorescència de Claudina-5 i ZO-1 a les 72 h de reoxigenació en les cèl·lules bEnd.3	86
<b>Figura 5.7</b>	Efecte de 2,5 h de POG i/o tractament amb rt-PA sobre els nivells de Cav-1, pCav-1, l'activitat metabòlica i la permeabilitat transcel·lular de les cèl·lules bEnd.3	88
<b>Figura 5.8</b>	Anàlisi d'immunofluorescència de Cav-1 en les cèl·lules bEnd.3 després de 2,5 h de POG i 72 h de reoxigenació	89
<b>Figura 5.9</b>	Efecte de l'MCAO sobre el volum d'infart, l'hemorràgia i l'edema	91
<b>Figura 5.10</b>	Anàlisi d'immunofluorescència de Cav-1 en el model <i>in vivo</i> tromboembòlic in situ a les 24 h post-MCAO	92
<b>Figura 5.11</b>	Determinació dels nivells sèrics de Cav-1 en el model tromboembòlic in situ i anàlisi de correlacions	94



## ÍNDIX DE TAULES

<b>Taula 1.1</b>	Factors de risc involucrats en l'ictus isquèmic	4
<b>Taula 1.2</b>	Les cèl·lules bEnd.3 com a model d'isquèmia	50
<b>Taula 4.1</b>	Volums utilitzats durant el protocol de POG en les diferents plaques de cultiu	60
<b>Taula 4.2</b>	Anticossos utilitzats per "Western blot"	66
<b>Taula 4.3</b>	Anticossos utilitzats per immunocitofluorescència	68
<b>Taula 4.4</b>	Anticossos utilitzats per immunohistofluorescència	76
<b>Taula 5.1</b>	Correlacions entre la immunoreactivitat de Cav-1 de l'àrea zona infartada i els paràmetres de dany: volum d'infart, volum hemorràgic i edema	94





# ÍNDEX

PUBLICACIÓ DERIVADA D'AQUESTA TESI .....	i
LLISTA D'ABREVIATURES .....	iii
ÍNDEX DE FIGURES .....	vii
ÍNDEX DE TAULES .....	ix
RESUM.....	xv
RESUMEN .....	xvii
SUMMARY.....	xxi
1. INTRODUCCIÓ.....	1
1.1 Ictus .....	2
1.1.1 Definició .....	2
1.1.2 Epidemiologia.....	2
1.1.3 Factors de risc .....	3
1.1.4 Classificació .....	4
1.2 Fisiopatologia de la isquèmia cerebral.....	6
1.2.1 Desequilibri iònic i excitotoxicitat.....	8
1.2.2 Difusió de la despolarització .....	9
1.2.3 Estrès oxidatiu i nitrosatiu .....	9
1.2.4 Inflamació.....	11
1.2.5 Disrupció de la barrera hematoencefàlica.....	12
1.2.6 Mecanismes de reparació.....	13
1.3 Tractament de l'ictus isquèmic en fase aguda.....	14
1.3.1 Teràpia trombolítica .....	15
1.3.2 Trombectomia mecànica .....	19
1.4 Barrera hematoencefàlica.....	20
1.4.1 Components de la BHE.....	21
1.4.2 Proteïnes expressades per les cèl·lules endotelials de la microvasculatura cerebral.....	25
1.4.3 Mecanismes de disrupció de la BHE .....	30
1.5 Caveolines .....	38
1.5.1 Cav-1 i la isquèmia cerebral .....	41
1.6 Models experimentals d'isquèmia cerebral.....	44
1.6.1 Models d'isquèmia cerebral focal <i>in vivo</i> .....	45

1.6.2	Models d'isquèmia cerebral <i>in vitro</i> .....	46
1.7	Estudi de l'expressió de proteïnes mitjançant "Western blot" .....	50
1.7.1	Normalització mitjançant controls endògens.....	51
1.7.2	Normalització mitjançant proteïna total: Gels "stain-free" .....	51
2.	HIPÒTESIS I OBJECTIUS .....	53
4.	MATERIAL I MÈTODES .....	57
4.1	Model <i>in vitro</i> de BHE.....	58
4.1.1	Cultiu de la línia cel·lular de ratolí bEnd.3 .....	58
4.1.2	Privació d'oxigen i glucosa (POG) i tractament amb rt-PA .....	60
4.1.3	Grups experimentals i recollida de mostres <i>in vitro</i> .....	60
4.1.4	Anàlisi de la viabilitat i de l'activitat metabòlica cel·lular.....	61
4.1.5	Anàlisi de les permeabilitats iònica i transcel·lular.....	63
4.1.6	"Western blot" .....	64
4.1.7	Immunocitofluorescència .....	67
4.2	Model d'isquèmia <i>in vivo</i> tromboembòlic <i>in situ</i> amb administració tardana d'rt-PA .....	69
4.2.1	Grups experimentals i recollida de mostres <i>in vivo</i> .....	70
4.2.2	ELISA.....	72
4.2.3	Determinació dels paràmetres de dany .....	73
4.2.4	Immunohistofluorescència .....	75
4.3	Anàlisi estadístic .....	76
5.	RESULTATS.....	77
5.1	Anàlisi de l'efecte a llarg termini de l'rt-PA en un model <i>in vitro</i> de BHE i avaluació de proteïnes constitutives per la normalització de la tècnica de "Western blot" .....	78
5.1.1	Efecte de la POG i del tractament amb rt-PA sobre la viabilitat cel·lular i l'activitat metabòlica de les cèl·lules bEnd.3 .....	78
5.1.2	Efecte de la POG i del tractament amb rt-PA sobre la permeabilitat iònica i transcel·lular de les cèl·lules bEnd.3 .....	80
5.1.3	Efecte de la POG i del tractament amb rt-PA sobre els nivells de les proteïnes constitutives $\beta$ -Actina, $\alpha$ -Tubulina, GAPDH i HPRT en les cèl·lules bEnd.3.....	81
5.1.4	Efecte de la POG i del tractament amb rt-PA sobre els nivells de les proteïnes Claudina-5 i ZO-1 en les cèl·lules bEnd.3.....	84
5.2	Anàlisi dels nivells de Cav-1 en condicions d'isquèmia i tractament amb rt-PA en un model <i>in vitro</i> de BHE i en un model <i>in vivo</i> tromboembòlic .....	87

5.2.1	Efecte de la POG i del tractament amb rt-PA sobre Cav-1 i la seva fosforil·lació en les cèl·lules bEnd.3.....	87
5.2.2	Efecte de la isquèmia sobre els nivells de Cav-1 a l'àrea infartada en el model tromboembòlic <i>in situ</i> amb administració tardana d'rt-PA .....	90
5.2.3	Anàlisi dels nivells sèrics de Cav-1 en el model d'isquèmia tromboembòlic <i>in situ</i> amb administració tardana d'rt-PA. Correlació amb paràmetres de dany i nivells de Cav-1 tissulars.....	93
6.	DISCUSSIÓ.....	95
6.1	Model de BHE <i>in vitro</i> : efecte a llarg termini de l'rt-PA i controls endògens per la normalització de "Western blot" .....	97
6.2	Cav-1 post-isquèmia i administració d'rt-PA <i>in vitro</i> i <i>in vivo</i> .....	103
6.3	Discussió general.....	108
7.	CONCLUSIONS.....	111
8.	BIBLIOGRAFIA .....	115
9.	ANNEX.....	135



## RESUM

L'activador del plasminogen tissular recombinant (rt-PA) és actualment l'únic fàrmac aprovat per al tractament de l'ictus isquèmic agut. No obstant, l'estreta finestra terapèutica, deguda al risc associat de transformació hemorràgica (TH) quan la seva administració és produïda més enllà de les 4,5 h de l'ictus, provoca que només s'apliqui a <5-7% dels pacients. Tot i que està descrit que la TH està relacionada amb la disrupció de la barrera hematoencefàlica (BHE) deguda a l'rt-PA, els mecanismes subjacents encara no estan del tot establerts. Un component principal de la BHE són les cèl·lules endotelials que formen vasos i capil·lars del teixit nerviós. La línia cel·lular endotelial de microvasculatura cerebral de ratolí bEnd.3 s'ha descrit com un bon model *in vitro* de BHE, però no s'han analitzat els efectes de l'rt-PA més enllà de les 6 h post-reoxigenació. En aquesta tesi s'han avaluat els efectes de l'rt-PA (20 µg/ml) a llarg termini (fins les 72 h post-administració) sobre la viabilitat cel·lular, l'activitat metabòlica i les permeabilitats iònica i transcel·lular en la línia bEnd.3, sotmesa a 2,5 h de privació d'oxigen i glucosa (POG) i reoxigenada, així com sobre l'expressió de les proteïnes d'unions estretes Claudina-5 i ZO-1. A més, mitjançant la tecnologia "Stain-Free", s'han analitzat els nivells de quatre proteïnes potencialment constitutives ( $\beta$ -Actina,  $\alpha$ -Tubulina, GAPDH i HPRT) per tal de confirmar la seva idoneïtat per la normalització dels resultats obtinguts per "Western blot" en les nostres condicions experimentals amb la línia cel·lular bEnd.3. D'altra banda, l'expressió de Caveolina-1 (Cav-1) i la seva fosforilació (pCav-1) s'han relacionat amb la regulació de la permeabilitat de la BHE però el seu rol durant l'ictus isquèmic és força desconegut i existeixen controvèrsies, ja que si li atribueix tant un rol protector com un de perjudicial. En aquesta tesi, s'han avaluat els efectes de l'rt-PA sobre els nivells de Cav-1 i pCav-1 després d'una POG en la línia bEnd.3. Així mateix, els nivells de Cav-1 també han estat analitzats en un model *in vivo* tromboembòlic amb oclusió de l'artèria cerebral mitjana (MCAO de l'anglès "middle cerebral artery occlusion") *in situ* amb administració tardana d'rt-PA.

Els resultats obtinguts en l'avaluació de l'efecte de l'rt-PA en condicions isquèmiques a més llarg termini sobre la línia bEnd3, mostren que el fàrmac en condicions control incrementa tant la permeabilitat iònica com la transcel·lular en el curs temporal analitzat però no afecta la viabilitat cel·lular ni l'activitat metabòlica. En canvi, en condicions isquèmiques, l'rt-PA

accentua els efectes de la POG sobre la viabilitat cel·lular i l'activitat metabòlica des de les 48 fins a les 72 h, sobre la permeabilitat transcel·lular des de les 24 fins a les 72 h, i disminueix significativament els nivells de ZO-1 a la membrana plasmàtica a les 72 h de reoxigenació. D'altra banda, respecte a les proteïnes potencialment constitutives analitzades, la POG redueix significativament els nivells de la  $\beta$ -Actina, l' $\alpha$ -Tubulina, el GAPDH i l'HPRT en la línia bEnd3 des de les 3 fins a les 72 h de reoxigenació sense evidenciar cap efecte significatiu de l'rt-PA excepte per el GAPDH, el qual s'ha detectat incrementat en condicions control a les 3 h de reoxigenació. L'anàlisi de Cav-1 en les cèl·lules bEnd.3 mostra que la POG incrementa els seus nivells de forma significativa a tots els temps analitzats, i que en canvi, l'addició de l'rt-PA els disminueix. A més, s'ha detectat que la POG indueix una disminució de la proporció entre pCav-1 i Cav-1 a les 72 h mentre que s'ha observat un increment d'aquesta proporció en les cèl·lules isquèmiques tractades amb rt-PA. Aquests resultats es relacionen amb un increment de la permeabilitat transcel·lular detectat també a les 72 h, suggerint que l'rt-PA juga un paper determinant alterant els nivells de Cav-1 i pCav-1 i la permeabilitat transcel·lular de les cèl·lules bEnd.3 després de 72 h de reoxigenació. Finalment, l'anàlisi de Cav-1 a nivell sèric i tissular en el model *in vivo* mostra, per primera vegada, una correlació positiva entre els nivells de Cav-1 en sèrum i en el teixit infartat a les 24 h post-MCAO, i una correlació positiva entre els nivells sèrics de Cav-1 després de 3 h d'MCAO i el volum d'infart determinat a les 24 h de la oclusió.

En conjunt, els resultats obtinguts mostren que els efectes de l'rt-PA es mantenen com a mínim fins a les 72 h de reoxigenació, i que per tant, es requereixen estudis a llarg termini per tal de dilucidar els mecanismes dependents del temps associats a la disrupció de la BHE, i per explorar noves teràpies protectores per al tractament de l'íctus isquèmic. D'altra banda, s'ha demostrat que la POG provoca canvis significatius en els nivells proteics de  $\beta$ -Actina, l' $\alpha$ -Tubulina, el GAPDH i l'HPRT indicant que aquestes proteïnes no són adequades com a controls de càrrega per "Western blot" en les nostres condicions experimentals, i es presenta la tecnologia "Stain-Free" com a una alternativa a la normalització tradicional amb proteïnes constitutives. Finalment, tenint en compte la correlació dels nivells sèrics de Cav-1 amb el volum d'infart i amb els nivells de Cav-1 en teixit, els nivells sèrics de Cav-1 podrien representar un potencial biomarcador predictor del pronòstic després d'una isquèmia en absència d'rt-PA. Tot i això, es requereixen més estudis per confirmar els resultats.

## RESUMEN

El activador del plasminógeno tisular recombinante (rt-PA) es actualmente el único fármaco aprobado para el tratamiento del ictus isquémico agudo. Sin embargo, la estrecha ventana terapéutica, debida al riesgo asociado de transformación hemorrágica (TH) cuando su administración se produce pasadas las 4,5 h del ictus, provoca que tan sólo se aplique a <5-7% de los pacientes. Aunque está descrito que la TH se encuentra relacionada con la disrupción de la barrera hematoencefálica (BHE) debida al rt-PA, los mecanismos moleculares subyacentes todavía no están del todo establecidos. Las células endoteliales representan un componente principal de la BHE las cuales se pueden encontrar formando vasos y capilares del tejido nervioso. La línea celular endotelial de microvasculatura cerebral de ratón bEnd.3 se ha descrito como un buen modelo *in vitro* de BHE, pero no se han analizado los efectos del rt-PA más allá de las 6 h post-reoxigenación. En esta tesis se han evaluado los efectos del rt-PA (20 µg/ml) a largo plazo (hasta las 72 h post-administración) sobre la viabilidad celular, la actividad metabólica y las permeabilidades iónica y transcelular en la línea bEnd.3, sometida a 2,5 h de privación de oxígeno y glucosa (POG) y la posterior reoxigenación, así como sobre la expresión de las proteínas de uniones estrechas Claudina-5 y ZO-1. Además, mediante la tecnología “Stain-Free”, se han analizado los niveles de cuatro proteínas potencialmente constitutivas ( $\beta$ -Actina,  $\alpha$ -Tubulina, GAPDH y HPRT) con el fin de confirmar su idoneidad para la normalización de los resultados obtenidos por “Western blot” en nuestras condiciones experimentales con la línea celular bEnd.3. Por otro lado, la expresión de Caveolina-1 (Cav-1) y su forma fosforilada (pCav-1) se han relacionado con la regulación de la permeabilidad de la BHE, pero su rol durante el ictus isquémico es bastante desconocido y existen controversias ya que se le atribuye a la vez un rol protector y perjudicial. En la presente tesis se han evaluado los efectos del rt-PA sobre los niveles de Cav-1 y pCav-1 después de una POG en la línea bEnd.3. Así mismo, los niveles de Cav-1 también han sido analizados en un modelo *in vivo* tromboembólico con oclusión de la arteria cerebral media (MCAO del inglés “middle cerebral artery occlusion”) *in situ* con administración tardía de rt-PA.

Los resultados obtenidos en la evaluación del efecto del rt-PA en condiciones isquémicas a más largo plazo sobre la línea bEnd.3 muestran que el fármaco, en condiciones control,



incrementa tanto la permeabilidad iónica como la transcelular en el curso temporal analizado, pero no afecta a la viabilidad celular ni a la actividad metabólica. En cambio, en condiciones isquémicas, el rt-PA acentúa los efectos de la POG sobre la viabilidad celular y la actividad metabólica desde las 48 hasta las 72 h, sobre la permeabilidad transcelular desde las 24 hasta las 72 h, y disminuye significativamente los niveles de ZO-1 en la membrana plasmática a las 72 h de reoxigenación. Por otro lado, respecto a las proteínas potencialmente constitutivas analizadas, la POG reduce significativamente los niveles de  $\beta$ -Actina,  $\alpha$ -Tubulina, el GAPDH y HPRT en la línea bEnd.3 desde las 3 hasta las 72 h de reoxigenación sin evidenciar efectos significativos del rt-PA excepto para GAPDH, la cual se ha detectado incrementada en condiciones control a las 3 h de reoxigenación. El análisis de Cav-1 en las células bEnd.3 muestra que la POG incrementa sus niveles de forma significativa en todos los tiempos analizados, mientras que, la adición de rt-PA los disminuye. Además, se ha detectado que la POG induce una disminución de la proporción entre pCav-1 y Cav-1 a las 72 h mientras que se ha observado un incremento de ésta proporción en las células isquémicas tratadas con rt-PA. Éstos resultados se relacionan con un incremento de la permeabilidad transcelular detectado también a las 72 h, sugiriendo que el rt-PA juega un papel determinante alterando los niveles de Cav-1 y pCav-1, y la permeabilidad transcelular de las células bEnd.3 tras 72 h de reoxigenación. Finalmente, el análisis de los niveles séricos y tisulares de Cav-1 en el modelo *in vivo* muestra, por primera vez, una correlación positiva entre los niveles de Cav-1 en el suero y en el tejido infartado a las 24 h post-MCAO, y una correlación positiva entre los niveles séricos de Cav-1 tras 3 h de MCAO y el volumen de infarto determinado a las 24 h de la oclusión.

En conjunto, los resultados obtenidos muestran que los efectos del rt-PA se mantienen como mínimo hasta las 72 h de reoxigenación, y que por lo tanto, se requieren estudios a largo plazo con el fin de dilucidar los mecanismos dependientes del tiempo asociados a la disrupción de la BHE, y para explorar nuevas terapias protectoras para el tratamiento del ictus isquémico. Por otro lado, se ha demostrado que la POG provoca alteraciones significativas en los niveles proteicos de  $\beta$ -Actina,  $\alpha$ -Tubulina, GAPDH y HPRT, indicando que éstas proteínas no son adecuadas como controles de carga para “Western blot” en nuestras condiciones experimentales, y se presenta la tecnología “Stain-Free” como una alternativa a la normalización tradicional con proteínas constitutivas. Finalmente, teniendo en cuenta la

correlación de los niveles séricos de Cav-1 con el volumen de infarto y con los niveles de Cav-1 en tejido, los niveles séricos de Cav-1 podrían representar un potencial biomarcador con capacidad de predecir el pronóstico tras una isquemia en ausencia de rt-PA. Sin embargo, se requieren estudios adicionales para confirmar los resultados.



## SUMMARY

Recombinant tissue plasminogen activator (rt-PA) is currently the only FDA-approved drug for the treatment of acute ischaemic stroke. However, the application of this therapy is limited to <5-7% of patients due to the associated increased risk of haemorrhagic transformation (HT) when it is applied beyond 4.5 h of the ischaemic onset. Although it is known that HT is related to rt-PA-induced blood brain barrier (BBB) disruption, the underlying mechanisms are not well established. Endothelial cells are a major component of BBB forming the capillaries of the nervous tissue. It has been reported that the bEnd.3 mouse cerebral microvascular endothelial cell line represents a suitable *in vitro* BBB model. However, its alterations due to rt-PA have not been analysed beyond 6 h of reoxygenation. We assessed time-dependent effects of rt-PA (20 µg/ml) until 72 h of reoxygenation on the bEnd.3 murine brain endothelial cell line subjected either to control conditions or to 2.5 hours of oxygen and glucose deprivation (OGD). Parameters of cell viability, metabolic activity and ionic and transcellular permeability were analysed as well as tight junctions' proteins Claudin-5 and ZO-1 levels. We also analysed the reliability of four commonly used housekeeping proteins:  $\beta$ -Actin,  $\alpha$ -Tubulin, GAPDH and HPRT as Western blot loading controls in our experimental conditions using Stain-Free technology. Likewise, Caveolin-1 (Cav-1) expression and its phosphorylation (pCav-1) have been linked to endothelial barrier permeability but their role in cerebral ischaemic injury is controversial and remains largely unknown with the suggestion of both protective and detrimental roles. Here, the effects of rt-PA on bEnd.3 cells Cav-1 and pCav-1 protein levels have been analysed in OGD conditions. In addition, Cav-1 protein levels have been also analysed in a thromboembolic middle cerebral artery occlusion (MCAO) *in situ* model with delayed rt-PA administration.

The analysis of long term rt-PA effects on bEnd.3 cells after an OGD shows that rt-PA treatment increases both the ionic and transcellular permeability until 72 h but do not modify cell viability or metabolic activity under control conditions. In OGD conditions, rt-PA exacerbates OGD effects on cell viability and metabolic activity from 48 to 72 h, on transcellular permeability from 24 to 72 h post-reoxygenation, and significantly decreases ZO-1 protein levels at the plasma membrane at 72 h of reoxygenation. On the other hand, OGD significantly decreases  $\beta$ -Actin,  $\alpha$ -Tubulin, GAPDH and HPRT protein levels from 3, to

72 h post-OGD without significant rt-PA treatment effects except for the GAPDH levels, which increased in control condition at 3 h post-OGD. The analysis of Cav-1 and pCav-1 protein levels in bEnd.3 cells shows increased Cav-1 levels after OGD which however, are reduced when rt-PA is added to the culture. In addition, it has been detected that OGD induces a reduction in pCav-1/Cav-1 ratio at 72 h of reoxygenation while this ratio has been increased in OGD cells treated with rt-PA. These results are related with a transcellular permeability increase detected in OGD-treated bEnd.3 cells at 72 h of reoxygenation suggesting a key role of rt-PA modifying Cav-1 and pCav-1 levels and transcellular permeability. Finally, the analysis of serum and tissue Cav-1 levels in the *in vivo* model describes, for the first time, a positive correlation between serum and tissue Cav-1 levels in the infarcted area at 24 h post-MCAO, and a positive correlation between serum Cav-1 levels after 3 h of MCAO and infarct volume at 24 h post-occlusion.

Overall, the obtained results show that the effects of rt-PA are maintained at least up to 72 h of reoxygenation and therefore, long-term studies are needed to elucidate time-dependent molecular mechanisms associated to BBB breakdown, and to explore protective BBB therapies after ischaemic stroke and rt-PA treatment. On the other hand, it has been demonstrated that OGD induces significant alterations to  $\beta$ -Actin,  $\alpha$ -Tubulin, GAPDH and HPRT levels, indicating that these proteins are not suitable as loading controls for Western Blot analysis in our experimental conditions proposing Stain-Free technology as an alternative normalization method to traditional housekeeping proteins. Finally, taking into account the obtained correlations of serum Cav-1 levels with infarct volume and tissue Cav-1 levels, serum Cav-1 levels could represent a potential biomarker predicting the ischaemic outcome before rt-PA administration. Notwithstanding, further studies are required to confirm the results.

# 1. INTRODUCCIÓ

## 1.1 Ictus

### 1.1.1 Definició

Tradicionalment, el mot ictus, que en llatí significa cop, s'utilitza per descriure una pèrdua sobtada de funcions neurològiques com a resultat d'una alteració del flux sanguini a una regió determinada del cervell. Quan aquesta alteració és causada per una interrupció del flux sanguini es parla d'ictus isquèmic o infart cerebral, mentre que si l'alteració ve donada per la ruptura d'una artèria o vena cerebral s'anomena ictus hemorràgic.

Recentment s'ha realitzat una actualització de la definició de l'ictus passant a ser una disfunció focal aguda del cervell, retina o medul·la espinal amb més de 24 h de durada, o de qualsevol durada en el cas que per tècniques d'imatge (CT o MRI, de l'anglès "computed tomography" i "magnetic resonance imaging" respectivament) o per autòpsia, és determini un infart o una hemorràgia. Si la durada d'aquesta disfunció és inferior a 24 h i no hi ha evidències que mostrin infart o hemorràgia, llavors el terme utilitzat és atac isquèmic transitori o AIT (Sacco et al., 2013).

D'altra banda, es pot trobar que de forma col·loquial, es fa referència a l'ictus anomenant-lo embòlia, trombosis o vessament cerebral, però no és del tot correcte ja que aquests altres termes només descriuen alguns dels tipus d'ictus. Concretament, l'embòlia consisteix en la oclusió d'un vas sanguini a causa d'un coàgul format en una regió distal al cervell com per exemple al cor o sobre una placa arterioscleròtica d'una artèria proximal. La trombosis és la formació d'un coàgul a un vas sanguini qualsevol, i per tant no necessàriament implica que es produeixi una isquèmia. Per últim, el terme vessament cerebral descriu una hemorràgia cerebral i per tant només fa referència a un ictus hemorràgic.

### 1.1.2 Epidemiologia

L'ictus és una de les principals causes de mort (11,02% de totes les morts) i de discapacitat a tot el món (dades del 2017) (Institute for Health Metrics and Evaluation, 2017). Tot i que la mortalitat i la discapacitat deguda a l'ictus han disminuït en els últims anys, el nombre absolut de persones que han sobreviscut a un ictus, o han quedat discapacitades, afectades o han mort, ha incrementat significativament. Concretament, al 2017, la incidència d'aquesta malaltia va ser de 11,9 milions de persones (un 64,9% d'ictus isquèmic), deixant 6,2 milions de morts (44,5% d'ictus isquèmic) i es va estimar una pèrdua de 132 milions

d'anys degut a discapacitats (DALYs de l'anglès "disability-adjusted life-years") (Institute for Health Metrics and Evaluation, 2017). S'especula que els efectes combinats de les millores en els tractaments de l'ictus, el creixement i envelliment de la població, i l'increment de la prevalença de varis factors de risc, són els principals causants d'aquest increment en el nombre de supervivents/afectats per un ictus. D'altra banda, s'han identificat disparitats significatives entre els homes i les dones, on els homes presenten una incidència clarament superior d'ictus isquèemics que les dones. Igualment, els experts suggereixen que es deixi d'etiquetar l'ictus com una malaltia de la vellesa ja que dues tercers parts dels ictus es donen en persones menors de 70 anys. Analitzant les dades en persones de poca i mitjana edat, l'augment en el nombre de casos d'ictus detectats sembla relacionat amb el risc metabòlic (Feigin et al., 2017).

### 1.1.3 Factors de risc

La prevenció es pot definir com l'acció de dur a terme un conjunt de mesures per a evitar, contrarestar o disminuir un risc. En aquest sentit, determinar i comprendre les causes originàries d'una malaltia és fonamental per poder impedir-ne la seva aparició o en el cas de no poder evitar-se, minimitzar al màxim els seus efectes. L'ictus és una malaltia heterogènia ja que es pot originar per diverses causes (Veure apartat 1.1.4), i per tant, es fa complicat identificar tots els factors de risc que incrementen la probabilitat de patir-lo. Alguns d'aquests factors no es poden modificar com és el cas de l'edat, el sexe o l'historial familiar els quals s'etiqueten com a factors de risc no modificables. En canvi, hi ha altres factors com la hipertensió, la dieta i els hàbits de fumar o fer esport, que si que es poden modificar reduint d'aquesta manera el risc de patir un ictus. Al 2010, l'estudi INTERSTROKE va demostrar que un conjunt de 10 factors de risc modificables eren capaços d'explicar un 90% del risc d'ictus (Taula 1.1) (O'Donnell et al., 2010). Ara bé, l'augment de la incidència de l'ictus no es pot atribuir únicament a aquests factors sinó que s'inclourien també altres factors com el síndrome metabòlic, les apnees del son o la inflamació crònica, entre d'altres, tal com descriuen Bang et al. Per tant, es fa necessari adquirir un major coneixement de l'epidemiologia i de la fisiopatologia de l'ictus amb l'objectiu de millorar la prevenció, el diagnòstic i el tractament, i així reduir l'impacte d'aquesta malaltia (Touzé et al., 2003; Bang et al., 2015; Boehme et al., 2017).

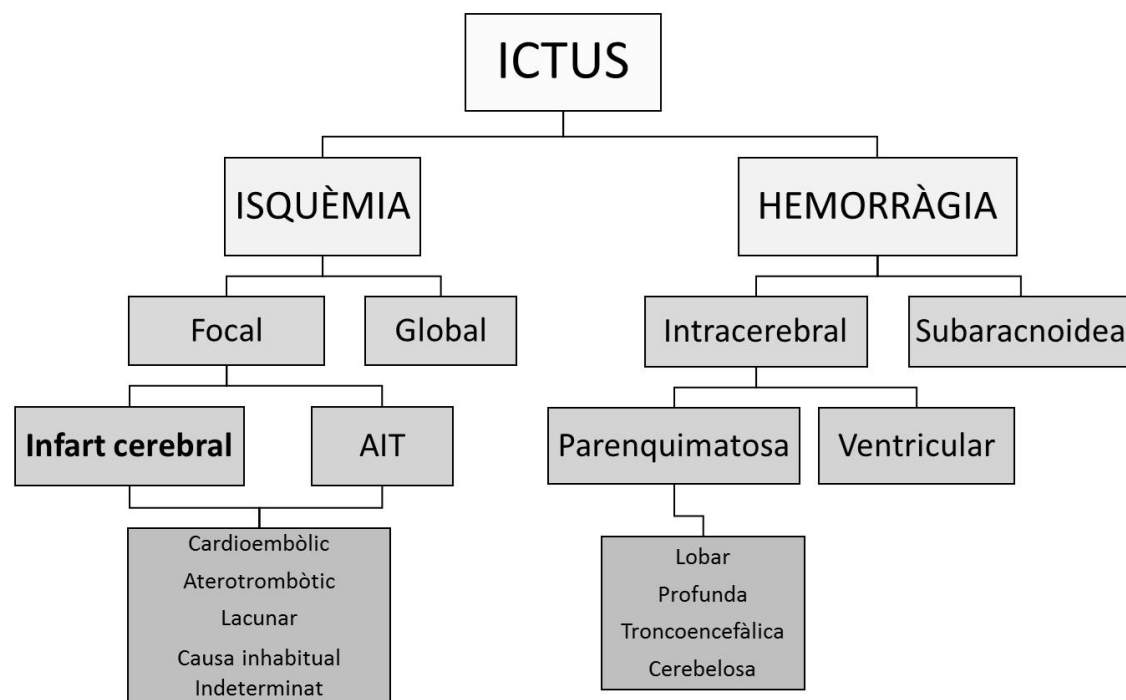


Taula 1.1| Factors de risc involucrats en l'ictus isquèmic.

Factors de risc no modificables	10 factors de risc modificables que expliquen el 90% del risc (estudi INTERSTROKE, 2010)	Nous factors de risc modificables proposats (Bang et al., 2015)
Edat	Hipertensió	Genètica
Sexe	Tabaquisme	Síndrome metabòlic
Raça/Ètnia	Índex de cintura/maluc	Apnea del son
Factors hereditaris	Dieta	Inflamació crònica
	Sedentarisme	Malaltia renal crònica
	Hiperlipèmia	Estrès psicosocial
	Diabetis Mellitus	Depressió/Fatiga
	Consum d'alcohol	Contaminació de l'aire
	Cardiopatia	Infeccions
	Índex d'apolipoproteïna B/A1	

#### 1.1.4 Classificació

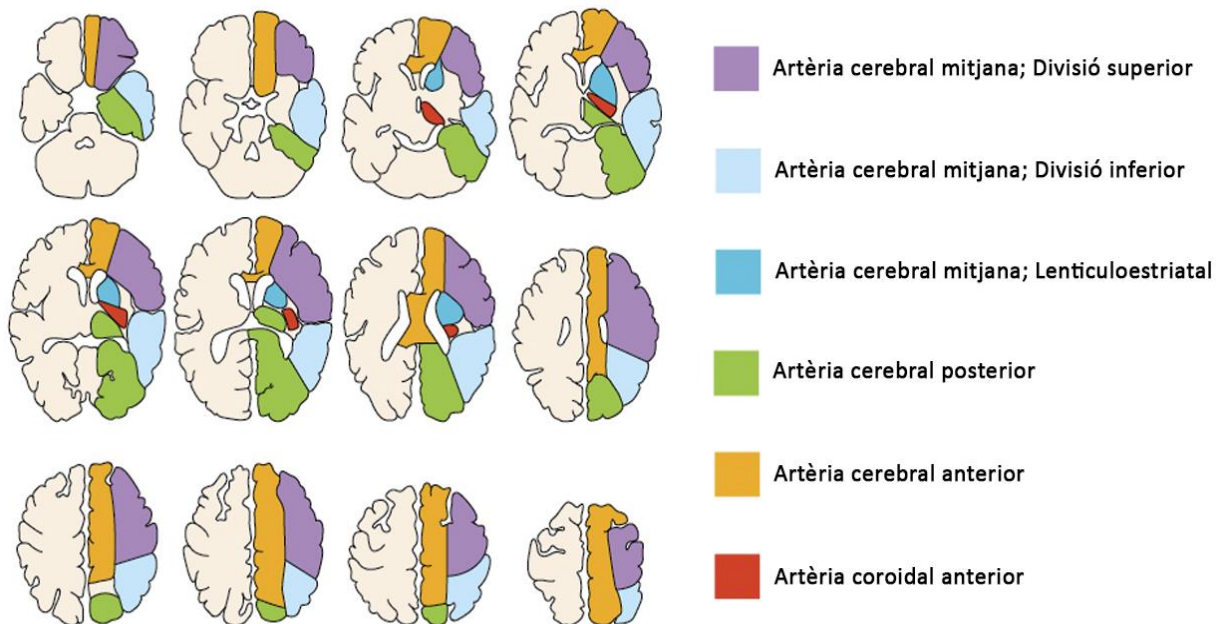
Aproximadament un 85% dels ictus són de tipus isquèmic mentre que el 15% restant són hemorràgics, tot i que aquesta proporció pot variar en funció de la població analitzada. L'hemorràgia produïda durant el trencament d'un vas provoca danys degut a la compressió de les estructures cerebrals i es pot classificar bàsicament en dos grups depenent de la zona on s'ha produït, és a dir, intracerebral o subaracnoïdea. D'altra banda, els ictus isquèmics normalment s'etiqueten en funció de la causa originària de l'insult: cardioembòlics quan el coàgul prové del cor, aterotrombòtics quan prové d'una placa d'ateroma, lacunars quan el vas obstruït és petit, altres causes més específiques o inhabituals (disseccions, vasculitis, desordres genètics i altres) i els ictus de causa desconeguda (Figura 1.1). És molt important determinar el mecanisme etiopatogènic responsable de l'ictus isquèmic per poder aplicar el tractament adequat i una prevenció secundària eficaç.



**Figura 1.1 | Classificació etiològica de l'ictus.** AIT: atac isquèmic transitori.

D'altra banda, en funció de la zona del cervell afectada, l'ictus isquèmic també es pot classificar en focal o global. Es parla d'ictus isquèmic focal quan s'obstrueix un vas resultant danyada només una regió del cervell. En aquest cas, quan desapareix la oclusió el flux sanguini torna a la normalitat. En la isquèmia focal, la regió afectada dependrà del vas obstruït (Figura 1.2). El 65% dels ictus isquèmics presenten lesions en el territori de l'artèria cerebral mitjana (ACM), fet que evidencia que la ACM i les seves ramificacions són els vasos més freqüentment implicats en l'ictus isquèmic (Bogousslavsky et al., 1988). L'ictus isquèmic global afecta a la totalitat del cervell, normalment com a resultat d'una disminució sistèmica del flux sanguini com per exemple una disminució de la pressió sanguínia o del volum de sang. Aquesta tesi es centra en l'ictus isquèmic focal.

## Territoris vasculars



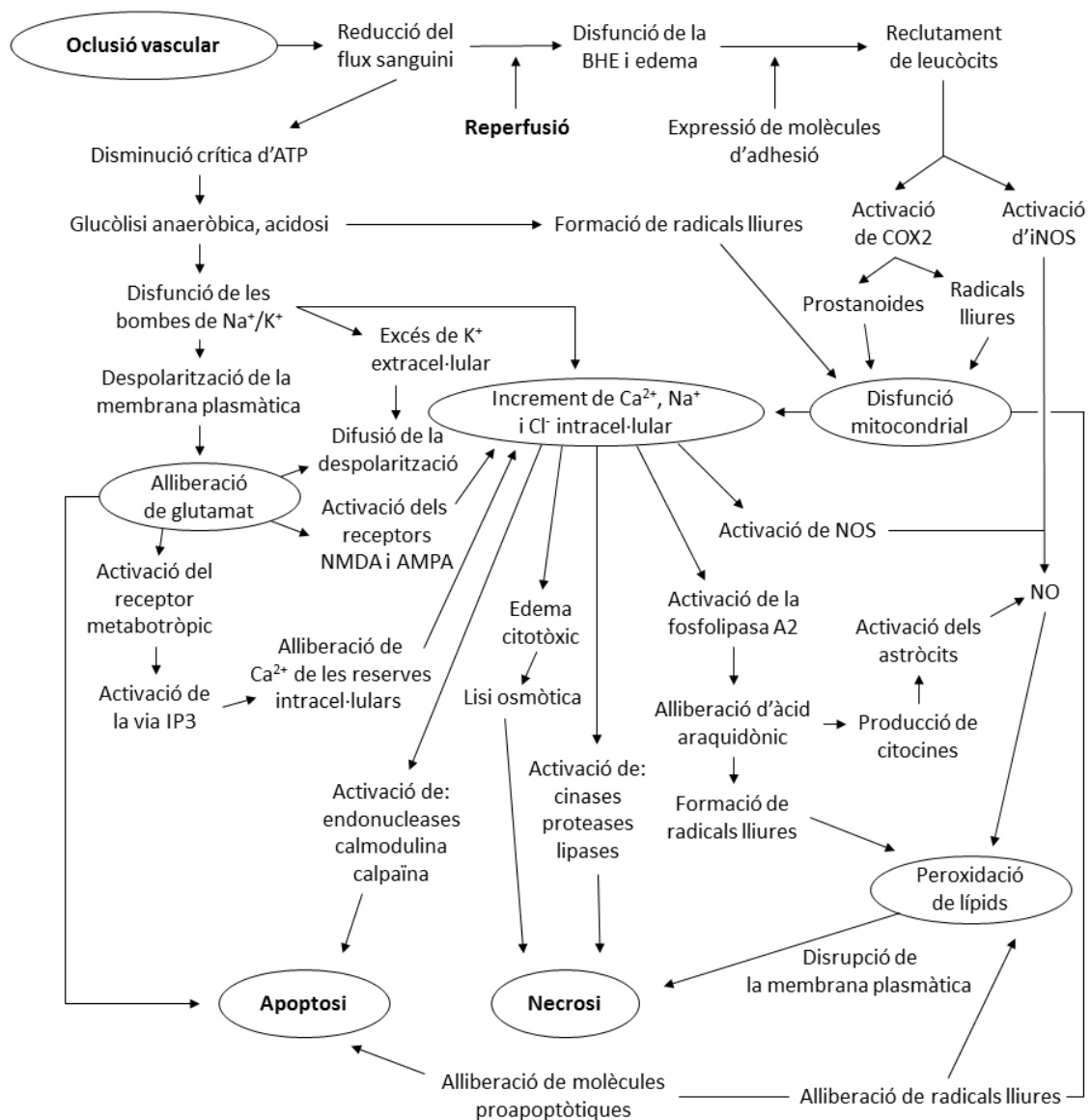
**Figura 1.2 | Territoris vasculars de les artèries cerebrals principals.** Adaptació de Jake Block, Martin I. Jordanov, Lawrence B. Stack, R. Jason Thurman. “The Atlas of Emergency Radiology”. [www.accessemergencymedicine.com](http://www.accessemergencymedicine.com); Copyright © The McGraw-Hill Companies, Inc. All rights reserved.

### 1.2 Fisiopatologia de la isquèmia cerebral

El requeriment elevat d'energia sumat a les baixes reserves energètiques evocuen al cervell a ser un òrgan especialment sensible al dany isquèmic on fins i tot un breu període isquèmic és capaç d'iniciar una complexa seqüència d'esdeveniments que en última instància pot acabar produint la mort cel·lular. El dany però, no es produeix de la mateixa forma ni amb el mateix grau a les diferents parts del cervell sinó que cada regió presenta diferents resistències al dany isquèmic, essent la matèria blanca més resistent que la grisa (Mattson et al., 2001). La fisiopatologia de la isquèmia cerebral és alhora simple i complexa. Simple en el sentit que l'esdeveniment inicial és l'oclusió intracerebral d'un vas sanguini que provoca una reducció del flux sanguini i com a conseqüència un infart a la zona circumdant; i complexa perquè aquesta reducció del flux sanguini desencadena un conjunt de processos en paral·lel amb diferents cursos temporals i diferents protagonistes en funció del tipus cel·lular analitzat. La cascada isquèmica a nivell cel·lular ha estat àmpliament estudiada en els últims anys i s'ha aconseguit identificar una gran diversitat de vies moleculars

involucrades (Figura 1.3). Alguns components de la cascada isquèmica s'activen tant bon punt esdevé la isquèmia, mentre que d'altres no ho fan fins al cap d'hores o dies (Moskowitz et al., 2010). Cal destacar que els mecanismes isquèmics activats a les regions amb un flux sanguini residual o nul, difereixen dels mecanismes de les regions que han sofert una reducció del flux més moderada. La regió isquèmica que queda pràcticament sense flux sanguini s'anomena nucli isquèmic i amb pocs minuts queda greument afectada. Degut a la falta d'oxigen i nutrients, es desencadenen varis processos incloent la dràstica disminució de l'energia, la desregulació de l'homeòstasi iònica cel·lular, l'acidosi, l'increment intracel·lular de calci, l'excitotoxicitat i l'increment de radicals lliures entre d'altres, que poden acabar provocant la mort cel·lular per necrosi. La necrosi es caracteritza morfològicament per un inflament inicial de les cèl·lules i orgànuls, una subseqüent disrupció de les membranes del nucli, dels orgànuls i plasmàtica, i finalment una desintegració de l'estructura nuclear i citoplasmàtica amb l'abocament de tot el contingut cel·lular a l'espai extracel·lular (Broughton et al., 2009). D'altra banda, les regions que envolten el nucli de l'infart, conegudes com a penombra isquèmica, comprenen una gran part del volum total de la lesió durant els primers estadis de la isquèmia, i presenten un gran potencial de ser rescatades ja que la majoria dels danys que pateixen són reversibles. És per aquest fet que l'objectiu principal de tots els tractaments de l'ictus isquèmic (Veure apartat 1.3) és restaurar el flux sanguini i rescatar tot el teixit de la penombra el més aviat millor (Fisher and Bastan, 2012). Com s'ha comentat anteriorment, els mecanismes que es desencadenen a les regions de penombra són diferents dels del nucli de l'infart ja que la isquèmia evoluciona més lentament i en última instància provoca la mort cel·lular per apoptosi. Alguns estudis han demostrat que moltes neurones de les regions de penombra isquèmica entren en apoptosi després de varies hores o fins hi tot dies i que, per tant, són potencialment recuperables després d'una isquèmia. A més, a diferència de la necrosi, l'apoptosi és un procés de mort cel·lular programada que minimitza el dany del teixit (Broughton et al., 2009).

A continuació s'explicaran amb més detall els diferents processos cel·lulars i moleculars que formen part de la fisiopatologia de l'ictus isquèmic.



**Figura 1.3| Fisiopatologia cel·lular i molecular de l'ictus isquèmic.** Representació esquemàtica dels principals esdeveniments moleculars que transcorren després d'una isquèmia i reperfusió. AMPA: àcid “ $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methylisoxasole-4-propionic”; NMDA: N-metil-D-aspartat; NO: òxid nítric; iNOS: òxid nítric-sintasa induïble; IP3: inositol 1,4,5-trifosfat; COX2: “cyclooxygenase-2”. Adaptació de Durukan and Tatlisumak, 2007.

### 1.2.1 Desequilibri iònic i excitotoxicitat

Una part significativa del dany neuronal induït per la isquèmia és deguda a l'acumulació excessiva d'aminoàcids excitadors que provoca un increment tòxic de calci intracel·lular (Mehta et al., 2007). Tot i que aquest procés és, a priori, una resposta defensiva vers un gran estrès, paradoxalment, aquest increment de calci intracel·lular activa diverses vies de

senyalització, que provoquen finalment la mort cel·lular. S'estima que el cervell consumeix un 20% de l'oxigen del cos per tal de generar el trifosfat d'adenosina (ATP, de l'anglès "adenosine triphosphate") suficient per mantenir els gradients iònics (Edvinsson and Hamel, 2002). Després de la reducció del flux sanguini i per tant, de la reducció dels nivells d'oxigen, les bombes cel·lulars comencen a fallar degut a la dràstica disminució dels nivells d'ATP, causant una desregulació iònica massiva a la cèl·lula. Això provoca que la cèl·lula s'infla per osmosi i es despolaritzi. Els ions de calci ( $\text{Ca}^{2+}$ ) entren a la cèl·lula a través de canals iònics i indueixen l'activació de varies proteases, quinases, lipases i endonucleases, iniciant l'apoptosi (Mattson et al., 2000). Paral·lelament, el glutamat, un dels neurotransmissors excitadors més importants del cervell, s'acumula a l'espai extracel·lular sobreactivant els seus receptors i conseqüentment, contribuint a l'increment de  $\text{Ca}^{2+}$  i sodi ( $\text{Na}^+$ ) principalment (Martin and Wang, 2010). S'ha descrit que l'increment de  $\text{Na}^+$  pot ser perjudicial per la supervivència de les neurones durant els primers estadis postisquèmia (Won et al., 2002), però varis estudis suggereixen que la toxicitat del glutamat depèn principalment de l'increment de  $\text{Ca}^{2+}$  (Arundine and Tymianski, 2004).

### 1.2.2 Difusió de la despolarització

A part de les conseqüències excitotòxiques a nivell molecular i cel·lular, l'alliberació massiva de glutamat i la desregulació iònica impacten també en l'evolució del dany isquèmic a nivell de teixit. La difusió de la despolarització cortical és un fenomen que consumeix alts nivells d'energia. Es desencadena degut a nivells excessivament elevats de glutamat i ions de potassi ( $\text{K}^+$ ) extracel·lulars i es caracteritza per una propagació lenta i devastadora de la despolarització de neurones i astròcits resultant en una disrupció dràstica dels gradients iònics (Somjen, 2001). Aquest fenomen s'ha observat en pacients isquèmics (Dohmen et al., 2008) i s'ha demostrat en models animals que una sola despolarització pot expandir l'àrea afectada més d'un 20% (Shin et al., 2006). Es creu que part de l'expansió de l'infart és deguda a la incompatibilitat entre l'alta demanda energètica per repolaritzar la membrana, i l'insuficient perfusió de la penombra isquèmica (Back et al., 1996).

### 1.2.3 Estrès oxidatiu i nitrosatiu

L'estrès oxidatiu i el nitrosatiu apareixen quan la producció de radicals lliures, com per exemple les espècies reactives d'oxigen i nitrogen (ROS/RNS, de l'anglès "reactive oxygen

species" i "reactive nitrogen species"), sobrepassa la capacitat antioxidant del sistema de defensa endogen (Beckman and Ames, 1998). Els radicals lliures són molècules altament reactives amb un o varis electrons desaparellats que poden interaccionar amb l'àcid desoxiribonucleic (ADN), proteïnes i lípids causant danys i disfuncions (Suh et al., 2008). Varis estudis han observat que en totes les formes de dany isquèmic hi ha un increment de radicals lliures, i s'ha descrit que tant les molècules ROS com les RNS juguen un paper clau en la inducció del dany després d'un ictus isquèmic agut (Allen and Bayraktutan, 2009). Durant la isquèmia, la formació de radicals lliures es pot donar per diversos mecanismes incloent la sobreactivació dels receptors de N-metil-D-aspartat (NMDA), l'excés de  $Ca^{2+}$  intracel·lular, la disfunció mitocondrial i l'activació de l'òxid nítric-sintasa neuronal (nNOS, de l'anglès "neuronal nitric oxide synthase") (Piantadosi and Zhang, 1996; Gürsoy-Özdemir et al., 2004; Cherubini et al., 2005). L'excés de ROS/RNS acaba causant la destrucció de macromolècules cel·lulars i contribueix a l'activació de processos de senyalització responsables de la mort cel·lular apoptòtica (Sugawara and Chan, 2003).

D'altra banda, l'intent a la desesperada de produir energia mitjançant la glucòlisi anaeròbica provoca una acumulació d'àcid làctic i una subseqüent acidosi. L'acidosi té un gran efecte prooxidant ja que incrementa la concentració de ions d'hidrogen ( $H^+$ ) i la velocitat de conversió de l'anió superòxid ( $O^{2-}$ ) a peròxid d'hidrogen ( $H_2O_2$ ) i a radicals d'hidroperoxil ( $HO_2$ ) (Saeed et al., 2007). A diferència d'altres òrgans, el cervell és especialment vulnerable al dany induït per radicals lliures degut a les condicions altament oxigenades del teixit, a lípids altament peroxidables i a la baixa concentració d'antioxidants endògens (Adibhatla and Hatcher, 2010).

En condicions isquèmiques, les ROS són principalment generades per diversos mecanismes i enzims, com per exemple l'oxidasa de nicotinamida adenina dinucleòtid fosfat (NADPH) coneguda com a NOX, la despolarització mitocondrial, l'oxidasa xantina (XO, de l'anglès "xanthine oxidase") i l'òxid nítric-sintasa (NOS, de l'anglès "nitric oxide synthase") (Fraser, 2011). Les ROS poden provocar efectes cel·lulars devastadors mitjançant processos que inclouen danys a l'ADN, la destrucció de proteïnes, la peroxidació de lípids, l'alliberament de  $Ca^{2+}$  de les reserves intracel·lulars, alteracions del citoesquelet i quimiotaxi. Així mateix, s'ha descrit que la  $H_2O_2$ , l' $O_2$  i el peroxinitrit ( $ONOO^-$ ) també poden alterar la vasculatura cerebral

incrementant la vasodilatació, l'agregació de plaquetes i induint un increment de la permeabilitat de les cèl·lules endotelials (CEs) (Wei et al., 1996).

Les RNS, d'altra banda, són bàsicament generades a partir de la combinació de l'òxid nítric (NO, de l'anglès "nitric oxide") amb altres molècules reactives com l'O<sup>2-</sup>, i de forma similar a les ROS, poden causar efectes importants a les cèl·lules, per exemple, facilitant l'obertura del porus de transició de la permeabilitat mitocondrial, inhibint enzims mitocondrials importants, danyant l'ADN, o activant canals iònics receptors de potencial transitori, subfamília M, membre 7, també anomenat TRPM7, que són permeables a Ca<sup>2+</sup> (Aarts and Tymianski, 2005; Pacher et al., 2007). A més, l'NO pot alterar post-traduccionament diversos grups de proteïnes com caspases, metal·loproteases o l'enzim glucolític "glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase" (GAPDH) (Gu et al., 2002).

#### 1.2.4 Inflamació

La inflamació és un punt crític en la fisiopatologia de les malalties cerebrovasculars, i especialment en el cas de l'ictus isquèmic, ja que varis estudis han indicat que la inflamació postisquèmica és un factor important de cara al pronòstic isquèmic a llarg termini (Chamorro and Hallenbeck, 2006; McColl et al., 2009). Després d'una isquèmia cerebral, la resposta inflamatòria s'inicia com a resultat de diversos factors com l'excés de ROS/RNS, l'aparició de cèl·lules necròtiques i el dany del teixit. El procés inflamatori involucra diversos tipus de cèl·lules, citocines inflamatòries i receptors cel·lulars com els "toll-like" (TLRs) (Amantea et al., 2009).

Hi ha varies poblacions de cèl·lules residents al cervell incloent CEs, astròcits, micròglia i neurones, amb la capacitat de secretar factors proinflamatoris després d'un insult isquèmic. En aquest sentit, diversos estudis han descrit un increment de citocines i molècules d'adhesió a CEs (CAMs, de l'anglès "cell adhesion molecules") en el teixit cerebral postisquèmia (Wang et al., 2007; Tuttolomondo et al., 2008).

La resposta inflamatòria inicial està regulada per l'activació i el reclutament de cèl·lules de la micròglia implicades en la resposta immunitària al cervell (Graeber and Streit, 2010). L'activació d'aquestes cèl·lules provoca la secreció de varies substàncies tant neuroprotectores com proinflamatòries. Els efectes neuroprotectors de la micròglia es deuen a la generació de factors neurotròfics com el factor de creixement "insulin-like" 1



(IGF-1, de l'anglès "insulin-like growth factor") i el factor neurotròfic derivat del cervell (BDNF, de l'anglès "brain-derived neurotrophic factor"). Pel que fa a les citocines proinflamàtories, aquestes inclouen el factor de necrosi tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ , de l'anglès "tumor necrosis factor"), les interleuquines 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) i 6 (IL-6), així com altres molècules potencialment citotòxiques com els prostanoides, les ROS i l'NO (Mrak and Griffin, 2005; Lucas et al., 2006). Així doncs, és important destacar que, degut a la barreja de factors neuroprotectors i proinflamatoris secretats durant el procés inflamatori, el rol global de la microglia pot diferir en funció del moment i de la situació analitzada, on a curt termini semblaria agreujar la lesió i en canvi contribuiria a la regeneració a llarg termini (Veure apartat 1.2.6) (Gelderblom et al., 2009).

Inicialment es creia que la microglia eren les úniques cèl·lules involucrades en el procés inflamatori del cervell, però recentment han anat apareixent estudis on s'ha demostrat una infiltració de neutròfils i monòcits provinents de la sang que també contribueixen a la inflamació postisquèmica. Una gran quantitat de leucòcits són reclutats a la zona isquèmica per iniciar la reparació del teixit fagocitant les restes necròtiques, regulant l'angiogènesi i regenerant la matriu extracel·lular (MEC). No obstant, aquestes cèl·lules també poden contribuir al dany isquèmic ja que un cop activats, produeixen ROS, radicals d'O<sup>2-</sup> i H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, a més d'alliberar enzims com la catepsina G, col·lagenases, gelatinases i heparinases que juntament amb les ROS acaben danyant la MEC i la vasculatura (Ross et al., 2007; Courties et al., 2014; Ruhnau et al., 2017).

### 1.2.5 Disrupció de la barrera hematoencefàlica

La barrera hematoencefàlica (BHE) tal i com es detallarà a l'apartat 1.4, és una estructura altament selectiva que separa el torrent sanguini de la resta de teixit cerebral que inclou diferents tipus de cèl·lules (Daneman and Prat, 2015). Les evidències demostren clarament que la isquèmia indueix un augment de la permeabilitat de la BHE tot i que els mecanismes involucrats en aquest procés encara no són del tot coneguts. Els treballs en models animals d'isquèmia han permès detectar que es produeixen alteracions de forma esglaonada començant per un increment de la transitosi en les CEs que formen part de la BHE, seguit de la degradació de proteïnes de la MEC i unions estretes (UEs) entre altres, essencials per la integritat de la BHE (Knowland et al., 2014). A més, s'ha descrit que la isquèmia causa canvis

dràstics en l'activitat i l'expressió endotelial de canals iònics i transportadors exportadors, a part de la inducció de la inflamació, que altera les relacions entre les CEs, la MEC i els astròcits contribuint a la disfunció de la BHE (Daneman and Prat, 2015) (Veure apartat 1.4.3).

#### 1.2.6 Mecanismes de reparació

S'ha demostrat àmpliament que la majoria de pacients que han patit un ictus isquèmic acaben presentant algun grau de millora al llarg del temps de recuperació. En aquest sentit, s'ha observat que les àrees de la penombra són altament dinàmiques i que els circuits neuronals adjacents a la zona afectada són reclutats per tal de restaurar el funcionament. Mitjançant tècniques d'imatge avançades i estudis electrofisiològics s'ha demostrat que aquesta remodelació a nivell de circuits es correlaciona amb processos moleculars més específics de plasticitat dendrítica i sinàptica (Li and Murphy, 2008).

D'altra banda, un dels grans avenços de l'última dècada ha estat la demostració que el cervell dels mamífers també és capaç de regenerar neurones mitjançant un procés anomenat neurogènesi. Aquest procés s'ha observat en determinades zones del cervell com la subventricular i la subgranular i en condicions normals, aquestes neurones noves migren cap a regions olfactòries i altres capes hipocampals, respectivament. No obstant, després d'una isquèmia, la neurogènesi sembla incrementar-se augmentant així la migració d'aquestes cèl·lules cap a la zona de lesió. Les dades publicades suggereixen que aquesta inducció de la neurogènesi com a resposta a la isquèmia contribueix de forma activa a la recuperació neurològica dels pacients (Chen et al., 2010). De fet, diversos estudis han demostrat que la inhibició de les cèl·lules precursoras neurals, les encarregades de dur a terme la neurogènesi, afecta negativament a la recuperació neurològica després d'una isquèmia (Jin et al., 2010a). En canvi, el trasplantament d'aquestes cèl·lules milloren la recuperació a més de potenciar la supervivència neuronal, indicant que aquests tipus cel·lular és essencial per el procés de reparació postisquèmia (Bacigaluppi et al., 2009).

Juntament a la neurogènesi i la plasticitat neural, la recuperació cerebral postisquèmia presenta patrons complexos de remodelació vascular. S'ha demostrat clarament que l'angiogènesi i la vasculogènesi, és a dir, els processos de formació de nous vasos, s'indueixen a les regions de la penombra després d'una isquèmia (Arai et al., 2009).

Aquestes processos són una peça clau per a la reparació postisquèmia i de fet, s'ha descrit en models animals que la seva inducció està correlacionada amb una disminució del dany isquèmic (Fan et al., 2010). De forma similar, s'ha demostrat una correlació en pacients isquèmics entre la densitat de vasos nous formats a la zona de penombra i la seva supervivència (Krupinski et al., 1994).

De fet, les respostes neurogèniques i angiogèniques estan altament coregulades després d'una isquèmia, fet que no sorprèn ja que són dos processos molt conservats evolutivament parlant que comparteixen mediadors i vies de senyalització (Carmeliet and Tessier-Lavigne, 2005). Així mateix, s'ha demostrat que la inducció de la neurogènesi deguda a la isquèmia també potencia l'angiogènesi i a la inversa. Per tant, semblaria que la reparació del cervell postisquèmia comprèn processos interdependents de plasticitat neuronal i neurovascular (Snapyan et al., 2009). Curiosament, moltes d'aquestes vies de senyalització s'activen en períodes de reparació diferents fet que provoca que puguin ser alhora perjudicials o beneficioses (Lo, 2008). La família de metal·loproteases de matriu (MMPs, de l'anglès "matrix metal·loproteases") i les ROS entre d'altres presenten aquest rol bifàsic ja que s'associen amb efectes perjudicials durant les primeres fases de la isquèmia, però alhora són essencials per la migració cel·lular durant la fase de remodelació (Zhao et al., 2006; Yang, 2019). L'estudi i la completa comprensió dels rols d'aquestes vies pot suposar un punt determinant per el desenvolupament de nous agents terapèutics en el tractament de la isquèmia.

### 1.3 Tractament de l'ictus isquèmic en fase aguda

Tradicionalment es poden distingir tres fases després d'un ictus: aguda, subaguda i crònica. No obstant, els rangs temporals que caracteritzen aquestes fases presenten variacions significatives dins la literatura. Normalment, l'interval entre el tercer i setè dia s'anomena fase aguda (des de l'aparició dels símptomes fins a l'estabilització mèdica del pacient). Del primer al sisè mes es defineix com a fase subaguda (període en el que es presenta una millora funcional progressiva), i després dels 3-6 mesos següents comença la fase crònica (període d'estabilització funcional) (Teismann et al., 2011).

Des d'un punt de vista terapèutic, el tractament de l'ictus isquèmic agut té tres objectius immediats: iniciar la reperfusió del teixit isquèmic, aturar la propagació de l'infart i prevenir

possibles rèpliques. La popular expressió en anglès “time is brain” posa èmfasi en la rapidesa amb la qual les neurones queden irreversiblement afectades durant un ictus isquèmic. Es calcula que una mitjana de 1,9 milions de neurones són destruïdes amb cada minut d'evolució d'una isquèmia tot i que hi ha diversos factors implicats com la regió afectada, la pressió sanguínia o la perfusió colateral que poden modificar el càlcul. Traslladant-ho al temps de vida del pacient, cada minut salvat durant un ictus isquèmic representa una mitjana de 1,8 dies addicionals de vida sana (Siket, 2016).

Fins a dia d'avui, la recanalització i la reperfusió són els dos pilars del tractament de l'ictus isquèmic agut ja que són la clau per reduir el volum d'infart i per revertir els dèficits neurològics. La recanalització es defineix per el grau d'obertura de l'arteria obstruïda, mentre que la reperfusió es mesura amb la quantitat de flux que retorna a la regió prèviament hipoperfosa. Aquest tractament funciona perquè en la majoria de casos, quan es produeix la oclusió, la zona circumdant no queda afectada tota de la mateixa manera sinó que queden regions amb una baixa perfusió però no infartades inicialment. Com s'ha comentat anteriorment, aquest teixit representa la penombra de la isquèmia i amb una restauració adequada i ràpida del flux sanguini és recuperable. L'administració intravenosa d'un agent trombolític o les intervencions endovasculares com la trombòlisi intra-arterial, la trombectomia mecànica o l'aspiració mecànica són les estratègies utilitzades actualment per aconseguir la reperfusió (Siket, 2016).

### 1.3.1 Teràpia trombolítica

Les primeres utilitzacions d'agents trombolítics administrats de forma intravenosa com a tractament de l'ictus isquèmic agut van aparèixer a l'any 1958 però no va ser fins al 1995 que l'activador tissular del plasminogen recombinant (rt-PA, de l'anglès “recombinant tissue plasminogen activator”) va ser testat pel “National Institute of Neurological Disorders and Stroke” (NINDS) (The National Institute of Neurological Disorders and Stroke rt-PA Stroke Study Group (NINDS Group), 1995). Posteriorment es va determinar la dosi i el protocol per administrar l'rt-PA de forma segura i es va seguir a la fase clínica III. Aquesta part es va dur a terme en pacients que portaven 3 h d'isquèmia aguda observant al cap de 3 mesos una millora significativa en els pacients que havien estat tractats amb el fàrmac tot i detectar també un increment en la incidència d'hemorràgies intracerebrals. Aquests resultats van

servir perquè l'agència americana "Food and Drug Administration" (FDA) aprovés l'ús de l'rt-PA al 1996, fet que va significar un gran avenç en la gestió de l'ictus isquèmic agut. Posteriorment es van continuar realitzant estudis per intentar ampliar l'interval temporal d'administració de l'rt-PA, com l'ATLANTIS o l'EPHITET, però no va ser fins al 2008 que l'estudi europeu ECASS III va permetre allargar la finestra terapèutica fins a 4,5 h (Hacke et al., 2008).

El tractament amb rt-PA evita la mort o la dependència a 1 de cada 7 pacients tractats i de cada 100 pacients tractats, 32 presentaran una nul·la o mínima discapacitat gràcies al fàrmac al cap de 3 mesos (Saver et al., 2010). No obstant, tot i l'eficàcia, el volum de pacients que poden rebre el tractament és molt baix (<10%) degut a l'estreta finestra terapèutica de 4,5 h (Metcalf and Davis, 2012). L'administració d'aquest fàrmac s'associa amb varis efectes adversos dels quals el més important és el risc de provocar una hemorràgia cerebral simptomàtica que s'observa en un 8% dels casos i que acaba agreujant l'ictus o fins i tot causant la mort (Donnan et al., 2008). Cal destacar que existeixen varis tipus d'rt-PA com la tenecteplasa o la desmoteplasa, diferenciats per petits canvis de la seva seqüència d'aminoàcids, que han estat estudiats recentment arribant a les proves clíniques de fase III (NOR-TEST i TASTE per la tenecteplasa i DIAS-3 i 4 per la desmoteplasa). Tret de l'estudi TASTE (de l'anglès, "Tenecteplase Versus Alteplase for Stroke Thrombolysis Evaluation Trial") que actualment encara està en desenvolupament, la resta d'estudis no han aconseguit demostrar una eficàcia superior dels nous fàrmacs respecte a l'rt-PA original (alteplasa). A banda de l'rt-PA, s'han estudiat altres estratègies terapèutiques per l'ictus isquèmic agut, fonamentalment dirigides al bloqueig d'alguna de les reaccions moleculars responsables de la mort neuronal en la isquèmia mitjançant l'ús de fàrmacs teòricament neuroprotectors com els agents estabilitzadors de calci, agents antiexcitotòxics, antioxidants, antiapoptòtics o antiinflamatoris. No obstant, tot i obtenir resultats molt prometedors en models animals, la neuroprotecció farmacològica no ha aportat beneficis en pacients amb un ictus isquèmic agut (Castillo et al., 2003; Woodruff et al., 2011).

Cal mencionar però que la teràpia trombolítica amb rt-PA representa una arma de doble tall ja que d'una banda promou la necessària trombòlisi però d'altra banda també promou una perillosa neurotoxicitat en el cervell isquèmic. En aquest sentit, s'ha establert que el t-PA

(de l'anglès "tissue plasminogen activator") exogen, és a dir, l'rt-PA que s'administra com a teràpia, pot creuar la BHE tant si està intacta com si està danyada, per acabar arribant al parènquima cerebral (Benchenane et al., 2005). Per tant, ambdós t-PAs, endogen i exogen, són capaços d'afectar a les funcions cerebrals. De fet, a part del seu rol proteolític, el t-PA pot induir vies de senyalització, que com s'explicarà a continuació, poden provocar greus danys a la zona afectada per la isquèmia (Jin et al., 2010b).

#### *1.3.1.1 El t-PA*

El t-PA és una proteasa serina d'uns 70 kDa que es troba present al plasma, al sistema nerviós central (SNC) i a la interfase entre la sang i el cervell, també anomenada unitat neurovascular (UNV). Estructuralment, presenta un domini amb activitat proteolítica, el qual li confereix la capacitat de proteasa; dos dominis "kringle", responsables de la interacció del t-PA amb la fibrina, i dos altres dominis amb funcions menys rellevants (Yepes et al., 2009). L'activitat vascular del t-PA està principalment controlada per una família de serpins (inhibidors de proteases serines): els inhibidors de l'activador del plasminogen tipus 1 (PAI-1, de l'anglès "plasminogen activator inhibitor"). L'equilibri entre el t-PA i el PAI-1 regula la fibrinòlisi a la vasculatura. El t-PA és, com indica el seu nom, l'encarregat d'activar el proenzim plasminogen i transformar-lo a plasmina, però les seves funcions van més enllà d'aquesta simple activació.

Durant l'aparició d'un coàgul, el t-PA s'uneix a la xarxa de fibrina mitjançant els seus dominis "kringle" augmentant així la seva afinitat per el plasminogen que igual que el t-PA, també queda unit a la xarxa de fibrina per els dominis "kringle", facilitant la interacció d'aquestes dues proteïnes (Rijken, 1995; Lijnen, 2006). Conseqüentment, els PAI es dissocien i el t-PA queda activat generant plasmina només al voltant del coàgul, i per tant induint la seva degradació. De forma similar, les CEs expressen l'annexina A2 a la superfície, també anomenada receptor de t-PA i plasminogen (Cesarman-Maus and Hajjar, 2005), que facilita la interacció d'aquestes dues proteïnes multiplicant per 60 la formació de plasmina i ajudant a mantenir la fluïdesa sanguínia. És per aquests motius que el t-PA actua a la sang com a fibrinolític, fet que va propiciar la seva utilització en teràpies de reperfusió en isquèmia cardíaca i cerebral (Rijken and Lijnen, 2009).

Al SNC, el t-PA és expressat per neurones, astròcits, micròglia i oligodendròcits i es troba particularment a l'hipocamp, l'hipotàlem, cerebel, cos callós, amígdala i medul·la espinal (Sappino et al., 1993; Correa et al., 2011). De forma similar, l'activitat del t-PA al parènquima està regulada per el PAI-1 però en aquest cas, ajudat també per la neuroserpina, un altre inhibidor potent present al SNC (Miranda and Lomas, 2006). El t-PA és un regulador clau dels processos de migració i remodelació cel·lulars gràcies a la seva capacitat de degradar la MEC i les unions cel·lulars. De fet, s'ha demostrat que el t-PA està implicat en el creixement axonal i en la plasticitat sinàptica, concretament en potenciació a llarg termini, processos associats amb aprenentatge i memòria (Seeds et al., 1997; Yepes and Lawrence, 2004).

### *1.3.1.2 Transformació hemorràgica de l'ictus isquèmic*

La transformació hemorràgica (TH) és un fenomen per el qual, després d'un ictus isquèmic i com a conseqüència del dany a la BHE, es produeix una hemorràgia intracerebral. Aquest procés forma part de l'evolució natural de l'ictus isquèmic, i es calcula que es produeix espontàniament en un 40-50% dels pacients (Arnould et al., 2004). No obstant, molts d'aquests casos són asimptomàtics i no es donen a les primeres 24 h, fet que dificulta la seva quantificació. Les hemorràgies importants, considerades a la bibliografia com hemorràgies parenquimals o simptomàtiques, són molt menys freqüents (2-5%) (Khatri et al., 2007) tot i que s'associen a una gran degeneració i comprometen críticament la vida del pacient. Aquestes hemorràgies més extenses contribueixen al deteriorament neurològic principalment a través de dos mecanismes: exercint un dany mecànic per compressió tant d'estructures com de vasos i un dany tòxic dels components sanguinis extravasats (Wang and Lo, 2003).

Tot i que la TH forma part de l'evolució natural de l'ictus, s'ha demostrat que la recanalització del vas obstruït, i especialment la teràpia trombolítica amb rt-PA, augmenten el risc de sagnat simptomàtic (entre un 8-9%), raó per la qual es limita la seva aplicació (Larrue et al., 2001).

La literatura suggereix la possibilitat que existeixin dos tipus de TH, una que es dona més ràpidament, entre les primeres 18 i 24 h d'isquèmia, i una TH més tardana que té lloc després de 18-24 h d'isquèmia. L'estrès oxidatiu, la neuroinflamació i la proteòlisi podrien ser els principals mecanismes causants de la TH primerenca (Veure apartat 1.4.3) mentre

que altres proteases i agents de remodelació vascular proangiogènics estarien més relacionats amb la TH tardana tot i que aquests últims no es detallaran ja que no exerceixen un paper fonamental en la TH en la fase aguda de la isquèmia (Jickling et al., 2014). Avui en dia una de les principals línies d'investigació en el camp de l'ictus és conèixer els mecanismes per els quals es produeix la TH.

### 1.3.2 Trombectomia mecànica

Una alternativa que està emergint amb força a l'hora de tractar pacients amb una oclusió intracranial d'artèria gran és l'anomenat tractament de recanalització endovascular o trombectomia mecànica. Tot i que porta dècades utilitzant-se en alguns centres, la recent publicació de varis estudis amb resultats molt prometedors ha provocat un fort increment en l'interès i el desenvolupament d'aquesta tècnica. Els grans beneficis observats en aquests estudis es basen en l'alta capacitat de reperfondre que presenten els "stents retrievers", uns instruments que s'introdueixen a l'artèria fins a la localització del coàgul, l'atrapen mitjançant el desplegament d'un entramat de fibres i l'extreuen conjuntament amb la retirada de l'instrument. D'aquesta forma s'aconsegueix una reperfusió més ràpida que es correlaciona amb majors beneficis clínics (Grotta and Hacke, 2015). Tot i això, aquesta tècnica presenta limitacions importants com per exemple el baix nombre de pacients que se'n poden beneficiar, la dificultat logística que suposa per els hospitals i l'insuficient nombre d'especialistes, entre d'altres (Goyal et al., 2016).

Per tant, la trombòlisi amb rt-PA i la trombectomia mecànica són les dues úniques estratègies de reperfusió que han estat aprovades per la pràctica clínica. Les dues han mostrat ser segures i efectives per els candidats adequats. La principal qüestió és que molts dels pacients amb un ictus isquèmic agut no podran rebre cap de les dues teràpies degut a les diverses restriccions que presenten. Alguns estudis que s'estan realitzant actualment, estan explorant la possibilitat d'ampliar les finestres terapèutiques utilitzant tècniques d'imatge avançades capaces d'identificar a pacients amb bona circulació col·lateral i per tant amb millor viabilitat del teixit afectat i d'aquesta manera ampliar el nombre de pacients potencialment tractables (Rabinstein, 2017).



#### 1.4 Barrera hematoencefàlica

La microvasculatura del teixit inclou com elements essencials per l'intercanvi de gasos i nutrients, els capil·lars que presenten propietats diferents en funció del tipus de teixit en el que es troben per tal de complir amb els seus requeriments metabòlics (Daneman and Prat, 2015).

Hi ha tres classes principals de capil·lars en funció de la seva estructura. Els capil·lars continus no fenestrats de la pell i els pulmons es troben units mitjançant unions cel·lulars, presenten una membrana basal (MB) completa i una absència de porus a la seva membrana plasmàtica. Els capil·lars continus fenestrats de les vellositats intestinals i les glàndules endocrines tenen una MB similar als anteriors però amb la diferència que la membrana plasmàtica de les CEs conté porus. Per últim, els capil·lars discontinus del fetge presenten una MB incompleta i un espai important entre CEs. Aquestes classes de capil·lars difereixen majoritàriament en la regulació que exerceixen sobre l'intercanvi de soluts entre la sang i els teixits, essent els capil·lars continus els més restrictius, i els discontinus els menys restrictius (Aird, 2007a, 2007b).

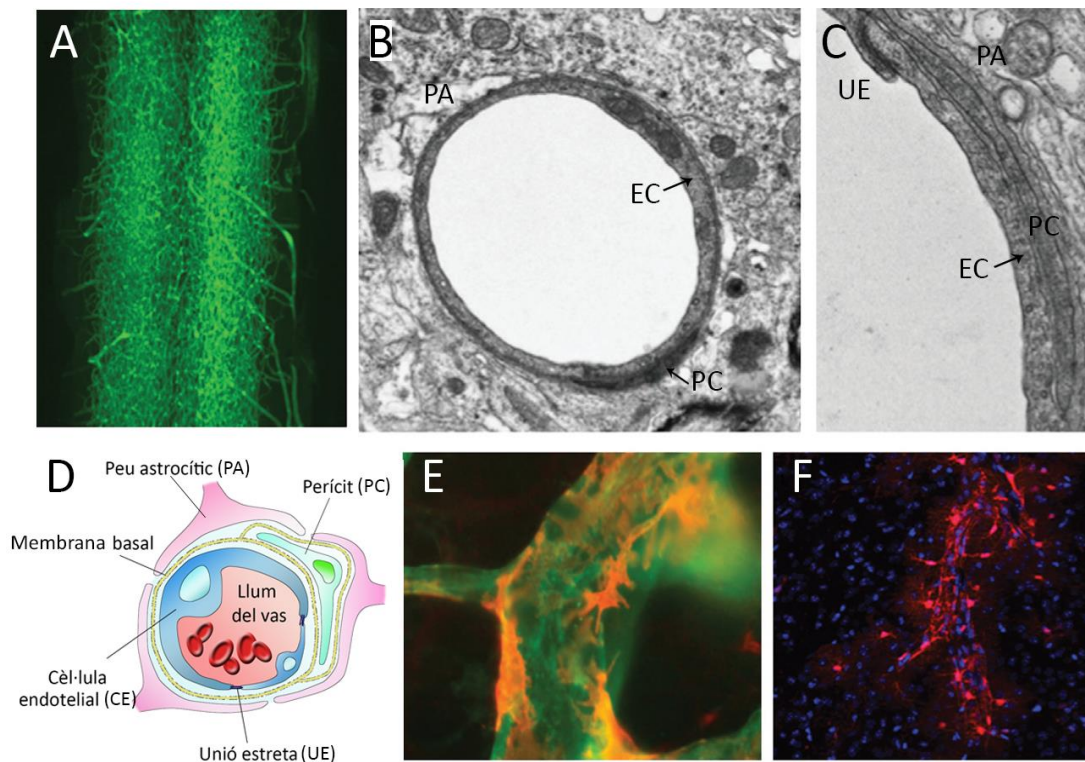
La BHE és una estructura amb propietats úniques present a la microvasculatura del SNC. Els capil·lars d'aquesta estructura són de tipus continu no fenestrats, però a més contenen una sèrie de propietats addicionals que els permeten regular l'intercanvi de molècules, ions, i cèl·lules entre la sang i la resta de teixit del SNC (Zlokovic, 2008; Daneman, 2012). Aquesta capacitat restrictiva és la que permet a les CEs de la BHE regular amb una gran precisió la homeòstasi del SNC, la qual cosa és essencial per mantenir un correcte funcionament neuronal i protegir el SNC de toxines, patògens, inflamacions, danys i malalties.

D'altra banda, la naturalesa restrictiva de la BHE esdevé un obstacle pel que fa al subministrament de fàrmacs destinats al SNC i per això s'han destinat grans esforços en generar estratègies per fer arribar el fàrmac en qüestió al teixit desitjat (Larsen et al., 2014). La pèrdua d'algunes, o de gran part de les propietats d'aquesta barrera durant malalties neurològiques com l'ictus, l'esclerosi múltiple, traumes cerebrals i desordres neurodegeneratius, és el major component de la patologia i progressió d'aquestes malalties (Zlokovic, 2008; Daneman, 2012). La disfunció de la BHE pot conduir a una desregulació iònica, una homeòstasi alterada, així com a una infiltració de cèl·lules i molècules

immunitàries dins el SNC, processos que en conjunt acaben provocant una disfunció i degeneració neuronal (Daneman and Prat, 2015).

#### 1.4.1 Components de la BHE

La BHE està formada per les CEs que constitueixen les parets dels vasos, els perícits (PCs) recobrint la cara externa de la capa de CEs, els peus astrocítics i la MB, l'element extracel·lular d'aquesta estructura que és secretat per els diferents tipus cel·lulars i exerceix funcions de suport estructural i transducció del senyal, entre d'altres. Les propietats de la BHE són principalment donades per les CEs però també són induïdes i mantingudes gràcies a interaccions amb PCs, cèl·lules immunològiques, de la glia i neurals (Figura 1.4).



**Figura 1.4 | Components de la BHE.** A) Marcatge vascular de la medul·la espinal on es pot observar la densitat de la xarxa vascular del SNC. B) Fotomicrografia electrònica d'una secció transversal d'un vas del SNC on s'observen les relacions entre les cèl·lules endotelials (CEs), els perícits (PCs) i els peus astrocítics (PAs). C) Fotomicrografia ampliada d'un vas on es mostren les relacions entre les CEs (amb les unions estretes (UEs)), els PCs i els PAs. D) Representació esquemàtica dels tipus cel·lulars que formen la BHE. E) Fotomicrografia immunofluorescent on es detecta la relació entre CEs (verd) i PCs (vermell). F) Fotomicrografia immunofluorescent que mostra com els astròcits (vermell) recobreixen un vas sanguini. Adaptació de Daneman and Prat, 2015.

#### 1.4.1.1 Cèl·lules endotelials

Les CEs que formen part de la paret dels vasos sanguinis són una derivació mesodèrmica de les cèl·lules epitelials escamoses. El diàmetre de grans artèries o venes pot estar format per dotzenes de CEs mentre que el de capil·lars més petits està constituït per una sola CEs plegada sobre si mateixa tot formant la llum del vas (Aird, 2007a, 2007b). Les CEs de la microvasculatura del SNC són extremadament planes, un 39% menys denses que les CEs musculars, i amb una distància de separació de la cara luminal a l'externa inferior a un quart de micra (Coomber and Stewart, 1985). Com s'ha comentat anteriorment, les CEs del SNC posseeixen unes propietats úniques en comparació amb les CEs de la resta de teixits, les quals confereixen la capacitat de regular finament l'intercanvi de ions, molècules i cèl·lules entre la sang i el teixit cerebral. Aquestes CEs estan unides entre elles mitjançant les UEs, les quals limiten eficaçment el pas paracel·lular de soluts (Reese and Karnovsky, 1967; Brightman and Reese, 1969; Westergaard and Brightman, 1973). A més, s'ha observat que aquest tipus de CEs presenten una freqüència de transcitosis extremadament baixa en comparació amb les CEs perifèriques, fet que les hi confereix una gran regulació al moviment transcel·lular de soluts (Coomber and Stewart, 1985) (Veure apartat 1.4.3.4). Aquesta barrera paracel·lular i transcel·lular tant restrictiva és la que permet controlar de forma única el pas de ions, molècules i cèl·lules entre la sang i el teixit cerebral. Les CEs del SNC expressen principalment dos tipus de transportadors. Els transportadors exportadors es troben polaritzats a la cara luminal i s'encarreguen de transportar una gran varietat de molècules lipofíliques que d'altra banda també podrien difondre cap a la sang a través de la membrana cel·lular (Cordon-Cardo et al., 1989; Thiebaut et al., 1989; Löscher and Potschka, 2005). El segon tipus de transportadors són els encarregats de facilitar el pas de nutrients específics cap al teixit cerebral i exportar els residus generats per les cèl·lules cap a la sang per tal de ser eliminats (Mittapalli et al., 2010) (Veure apartat 1.4.2.2).

En comparació amb altres tipus de CEs, les del SNC presenten una gran quantitat de mitocondris. Es creu que aquests mitocondris són els responsables de generar l'ATP necessari per mantenir el gradient iònic, requisit essencial per a dur a terme les funcions de transport. D'altra banda, aquestes CEs expressen nivells extremadament baixos de molècules d'adhesió de leucòcits (MALs), fet que limita en gran mesura, el nombre de cèl·lules immunològiques que s'infiltrin al SNC (Henninger et al., 1997; Aird, 2007b;

Daneman et al., 2010a). La combinació de les barreres físiques (UEs i baixa transmissió), les propietats moleculars (transportadors exportadors, metabolisme específic i baixa expressió de MALs, i dels transportadors específics per determinats nutrients, atorga a les CEs la capacitat de regular l'homeòstasi del SNC amb gran precisió.

#### *1.4.1.2 Perícits*

Els PCs són unes cèl·lules murals que recobreixen la cara externa del tub endotelial i integrades a la MB de la microvasculatura (Sims, 1986). Els PCs estenen llargues elongacions cel·lulars al llarg de la superfície externa de l'endoteli i sovint abasten a varis cossos de CEs. Aquestes cèl·lules contenen proteïnes contràctils mitjançant les quals poden controlar el diàmetre dels capil·lars (Peppiatt et al., 2006). Tot i que els PCs es situen envoltant els capil·lars, la majoria d'ells no arriba a tocar l'endoteli ja que la MB en la qual estan integrats, es troba entremig. Ara bé, en determinats punts sí que es formen adhesions amb l'endoteli descrites com unions "peg-and-socket", regulades per la molècula cadherina-N (Gerhardt et al., 2000). A part, també s'han identificat altres tipus de contacte entre els PCs i les CEs, com per exemple les unions d'adhesió, unions gap i UEs (Courtoy and Boyles, 1983; Cuevas et al., 1984; Larson et al., 1987; Díaz-Flores et al., 2009).

A diferència dels PCs d'altres teixits que deriven del mesoderm, els PCs del SNC deriven de la cresta neural, fet que els hi confereix unes propietats úniques (Majesky, 2007). S'ha descrit que aquestes cèl·lules són essencials per la formació de la BHE durant el desenvolupament i per el seu manteniment en l'edat adulta i posterior envelliment (Armulik et al., 2010; Daneman et al., 2010b). En aquest sentit, la microvasculatura del SNC presenta una proporció aproximada de CEs:PCs d'entre 1:1 i 1:3 mentre que per exemple en teixit muscular la proporció és de 100:1 (Shepro and Morel, 1993). Els PCs porten a terme papers importants en varis processos com la regulació de l'angiogènesi i de la infiltració de cèl·lules immunitàries, la formació de la MEC o la restauració de ferides, entre d'altres, i alguns estudis suggereixen que poden convertir-se en cèl·lules mare multipotents (Armulik et al., 2011).

#### *1.4.1.3 Astròcits*

Els astròcits són un tipus de cèl·lules de la glia que estenen les seves ramificacions polaritzades envoltant tant cossos neuronals com vasos sanguinis (Abbot et al., 2006). Els

peus d'aquestes elongacions pràcticament envolten tot el tub vascular i expressen un conjunt de proteïnes entre les quals es troben el distroglicà, la distrofina i l'aquaporina 4. El complex distroglicà-distrofina és important per associar el citoesquelet del peu astrocític a la MB. Aquesta unió està coordinada per l'aquaporina 4 que al mateix temps, regula l'homeòstasi de l'aigua al SNC (Noell et al., 2011; Wolburg et al., 2011). S'ha descrit que els astròcits juguen un paper important en la regulació de la BHE tot i que els mecanismes no estan del tot clars. S'ha observat que mitjançant astròcits purificats es pot induir el desenvolupament de propietats de BHE a vasos sanguinis que no formen part del SNC (Janzer and Raff, 1987). Cal destacar però que aquests estudis sovint utilitzen astròcits cultivats de cervells de ratolins neonatals, i per tant és probable que a part dels astròcits madurs, les cèl·lules progenitores puguin tenir un paper rellevant. En aquest sentit, alguns treballs han suggerit que la BHE es forma abans de la generació dels astròcits i que, per tant, aquestes cèl·lules no intervenen en la inducció de la BHE (Daneman et al., 2010b). No obstant, la identificació de factors secretats per els astròcits com el TGF $\beta$  (de l'anglès "transforming growth factor- $\beta$ ") o el GDNF (de l'anglès "glial-derived neurotrophic factor") entre d'altres, que regulen les funcions de la BHE indiquen que els astròcits madurs modulen i mantenen les propietats de la barrera un cop està formada (Abbot et al., 2006). A part, els astròcits serveixen de pont cel·lular entre els circuits neuronals i els vasos sanguinis. Aquesta unió neurovascular permet als astròcits enviar senyals per regular el flux sanguini com a resposta a l'activitat neuronal, principalment controlant la contracció/dilatació de les cèl·lules musculars d'arterioles o els PCs dels capil·lars (Attwell et al., 2010).

#### *1.4.1.4 Membrana basal*

El tub vascular es troba recobert per dues MBs, la MB vascular interior i la MB parenquimàtica exterior (del Zoppo et al., 2006; Sorokin, 2010). La MB vascular és una MEC secretada per les CEs i els PCs, mentre que la parenquimàtica és bàsicament secretada per elongacions astrocítiques que s'estenen al llarg de la vasculatura. Aquestes MBs estan formades per diferents molècules secretades com els col·làgens de tipus IV, la laminina i altres glicoproteïnes, tot i que les dues MBs difereixen en la composició. Aquestes MBs serveixen de plataforma per molts processos de senyalització però també suposen una capa addicional a la barrera aportant més resistència i restringint el pas de cèl·lules i molècules. La disrupció d'aquestes MBs per mitjà de les MMPs és un dels principals causants de la

disfunció de la BHE (Veure apartat 1.4.3.3) i infiltració de leucòcits, processos observats en varis desordres neurològics (Daneman and Prat, 2015).

#### 1.4.2 Proteïnes expressades per les cèl·lules endotelials de la microvasculatura cerebral

Del conjunt de cèl·lules que constitueixen la BHE, les CEs són les encarregades de segellar tots els espais intercel·lulars i regular la permeabilitat de la BHE mitjançant la transcitosi. En aquest sentit, s'ha observat que l'alteració de la permeabilitat de les CEs afecta directament a la permeabilitat de la BHE demostrant clarament que aquestes cèl·lules juguen un paper central en la regulació de la BHE. Per aquest motiu, l'estudi de les molècules expressades per les CEs del SNC ha permès la identificació de components estructurals i de transport molt rellevants per la funcionalitat de la BHE (Daneman and Prat, 2015).

Actualment, la utilització d'aproximacions experimentals proteòmiques i genòmiques a gran escala han incrementat en gran mesura el detall i el coneixement de la biologia molecular de la BHE. L'ús de fragments microvasculars purificats, CEs purificades i CEs cultivades, en combinació amb la tecnologia de "microarrays", de seqüenciació d'àcid ribonucleic (ARN) i d'anàlisi proteòmic amb espectroscòpia de masses, ha permès comparar l'expressió gènica entre CEs del SNC i cèl·lules neurals, així com també amb CEs d'altres teixits. Més detalladament, l'anàlisi de les diferències moleculars entre les CEs del SNC i les CEs d'altres teixits no neurals ha desvelat que les CEs de la BHE presenten una composició molecular única (Li et al., 2001; Enerson and Drewes, 2006; Ohtsuki et al., 2014).

##### 1.4.2.1 Proteïnes d'unions estretes

Les CEs del SNC es troben unides mitjançant les UEs, les quals creen una barrera paracel·lular de gran resistència per a molècules i ions, polaritzant així, els compartiments interns i externs dels vasos. La majoria de coneixements sobre les UEs han estat obtinguts en treballs realitzats en CEs, on s'ha identificat que aquestes adhesions cel·lulars es formen a la part apical de la membrana lateral mitjançant interaccions entre unes molècules transmembrana unides al citoesquelet, i els corresponents adaptadors citoplasmàtics. La resistència de les unions varia en gran mesura en funció del teixit en el que es troben. En treballs amb cultius cel·lulars s'ha observat que aquestes unions presenten una permeabilitat selectiva depenent de mida per molècules sense càrrega de 4 nm com a màxim (Van Itallie and Anderson, 2006; Van Itallie et al., 2008).

Les proteïnes transmembrana anomenades anteriorment inclouen les claudines, les ocludines i les molècules adhesives d'unió (MAUs) (Furuse, 2010). Les claudines són una família amb més de 25 membres diferents que es caracteritzen per presentar un domini W-GLW-C-C en el primer bucle extracel·lular (Gupta and Ryan, 2010). Treballs *in vitro* suggereixen que les claudines són essencials per la formació de la barrera paracel·lular. L'expressió de claudines és suficient per generar UEs en fibroblasts, i la disrupció d'aquestes proteïnes disminueix les propietats de la barrera (Furuse et al., 1998; Van Itallie and Anderson, 2006). També s'ha descrit en treballs amb claudines quimèriques, que els residus dels aminoàcids presents al primer bucle extracel·lular defineixen la mida del porus i la càrrega que deixarà passar. Per tant, la composició de claudines d'una cèl·lula en particular pot determinar la permeabilitat de la barrera paracel·lular (Colegio et al., 2003). Els diversos membres de la família de les claudines s'expressen a les barreres epitelials de teixits diferents i s'ha observat que hi ha claudines específiques que són essencials per determinades barreres (Furuse et al., 2002; Miyamoto et al., 2005). Les CEs de la BHE expressen diverses claudines com la 12 o la 3 (Daneman et al., 2010a) però en petites quantitats en comparació amb la majoritària expressió de la Claudina-5, la qual és essencial perquè la BHE tingui la permeabilitat selectiva (Morita et al., 1999).

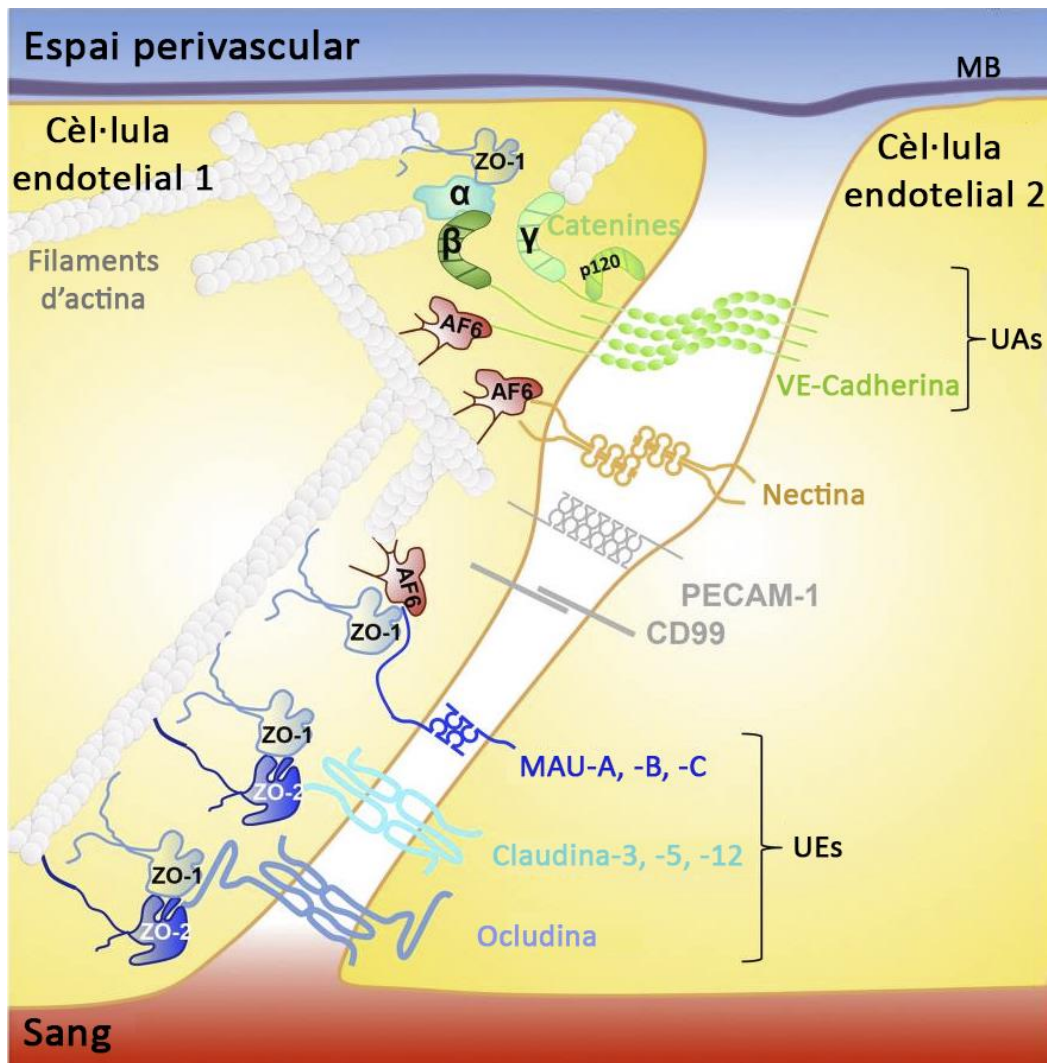
Igualment, l'expressió de les ocludines és fonamental per mantenir la funcionalitat de la BHE (Balda et al., 1996) i de forma similar a les claudines, les ocludines es troba molt més expressada a les CEs del SNC en comparació amb les CEs de la resta de teixits indicant que pot ser un component important de la BHE. No obstant, ratolins amb deficiència d'aquesta proteïna no presenten cap fet anormal pel que fa a la resistència d'aquesta barrera. Ara bé, sí que s'ha detectat un increment de calci al SNC d'aquests ratolins, suggerint que les ocludines podrien estar regulant el flux de calci a través de la BHE (Saitou et al., 2000).

Les MAUs formen part d'una subfamília d'immunoglobulines expressades per leucòcits i plaquetes així com, per cèl·lules epitelials i endotelials. Aquestes molècules es localitzen a les unions entre cèl·lules enriquint i ajudant a mantenir les UEs. La identificació de proteïnes que interaccionen amb les MAUs intra i extracel·lulars suggereix que les MAUs podrien estar actuant de dues formes. D'una banda, s'ha descrit que aquestes proteïnes s'associen mitjançant els seus dominis extracel·lulars amb integrines expressades per leucòcits,

involucrades en la regulació de les interaccions entre CEs i leucòcits. D'altra banda, els seus dominis citoplasmàtics els proporciona la capacitat d'interaccionar amb diverses proteïnes associades a UEs com per exemple la "zonula occludens 1" (ZO-1), l'afadina-6 (AF6), la MUPP1 (de l'anglès "multi-PDZ domain protein 1") i la PAR-3 (de l'anglès "partitioning-defective protein 3"). Per tant, les MAUs tant poden estar regulant les interaccions entre leucòcits, plaquetes i CEs, com la formació de UEs a cèl·lules epitelials i endotelials afavorint la polarització cel·lular (Martín-Padura et al., 1998; Johnson-Léger et al., 2002).

Els complexos d'adhesió transmembrana es troben units al citoesquelet mitjançant una sèrie d'adaptadors citoplasmàtics entre els quals s'hi pot trobar la ZO-1, la ZO-2, la cingulina, paracingulina, les MAGIs (de l'anglès "membrane associated guanylate kinase inverted") entre d'altres (Van Itallie and Anderson, 2013). A més, les UEs interaccionen amb les unions adherents (UAs) basals, les quals connecten totes les CEs a través de les cadherines i les catenines unides al citoesquelet. És interessant que moltes de les proteïnes identificades a les UEs com la Claudina-5, la 12 o les ZO-1 i 2, siguin expressades per CEs de tots els teixits, i que en canvi, només es formi aquesta barrera tant selectiva al SNC. L'anàlisi transcripcional comparant les CEs del SNC amb altres CEs perifèriques suggereix que són tots aquests adaptadors citoplasmàtics que s'han comentat, els que enriquint les UEs, desenvolupen un paper essencial en la formació de la BHE (Daneman and Prat, 2015) (Figura 1.5).





**Figura 1.5| Representació esquemàtica de les diferents unions entre les CE de la BHE.** Les unions adherents (UAs) de la BHE estan basades en la interacció de dímers de cadherina endotelial vascular (VE-cadherina) que alhora també es troben unides al citoesquelet d'Actina mitjançant altres proteïnes com les p120, les catenines i les afadines 6 (AF6). Les nectines són unes proteïnes transmembrana que contribueixen a la formació de les UAs. Les unions estretes (UEs) de la BHE estan formades per molècules adhesives d'unió (MAU) A, B i C, Claudina-3, 5 i 12 i Ocludina. Aquestes proteïnes interaccionen amb les ZO-1 i 2, les quals medien la unió al citoesquelet d'Actina. A part també s'han detectat altres proteïnes que contribueixen a la formació d'aquestes unions com les PECAM-1 i les CD99. Adaptació de Tietz and Engelhardt, 2015.

#### 1.4.2.2 Transportadors

La baixa permeabilitat de les unions paracel·lulars provoca que el transport de ions i molècules entre la sang i el teixit depengui exclusivament de les propietats de cada cèl·lula. Com ja s'ha comentat anteriorment, les CE del SNC expressen majoritàriament dos tipus de

transportadors: els transportadors exportadors i els transportadors de nutrients. Actualment l'interès per dilucidar tota la gamma de transportadors i els seus corresponents substrats ha augmentat considerablement ja que ajudaria en gran mesura a descriure els requisits externs per al correcte metabolisme i funcionament cerebral, i a identificar possibles dianes per millorar diversos tractaments farmacològics que necessiten creuar la BHE per ser efectius. Els transportadors exportadors utilitzen l'energia de la hidròlisi de l'ATP per transportar els seus substrats en contra del gradient (Ha et al., 2007) i la majoria es troben localitzats a la superfície luminal on evoquen una àmplia gamma de substrats a la sang. S'ha de tenir en compte però que la informació que es coneix sobre les molècules endògenes exportades per aquests transportadors i la seva implicació en el SNC és molt limitada, i que per tant, la manipulació externa dels transportadors podria alterar la regulació de les funcions cerebrals (Löscher and Potschka, 2005).

Els transportadors de nutrients faciliten el moviment de nutrients específics aprofitant el seu gradient de concentració. Les CE del SNC expressen una gran varietat d'aquests transportadors fet que els permet subministrar nutrients molt específics al parènquima del SNC. La majoria d'aquestes proteïnes transportadores pertanyen a la família dels transportadors de difusió facilitada, és a dir que no hi ha un requeriment energètic per dur a terme el transport (Morris et al., 2017). El transportador SLC2A1 (de l'anglès "Solute Carrier Family 2 Member 1"), també conegut com GLUT1 (de l'anglès "Glucose transporter 1"), és l'encarregat de proporcionar glucosa al SNC i és per aquest motiu que l'expressió d'aquesta proteïna és troba altament incrementada a les CE del SNC en comparació amb les CE de la resta de teixits no neurals (Cornford et al., 1994). D'altra banda, les CE del SNC també expressen proteïnes relacionades amb diversos sistemes de transport dependents de receptor, com el receptor de transferrina (transferrina/ferro), l'Ager (amiloide) i les lipoproteïnes relacionades amb receptors de baixa densitat (LRP1/LRP8, de l'anglès "low-density lipoprotein receptor-related protein"). Tot i que la majoria d'aquests transportadors importen nutrients de la sang cap al teixit, també n'hi ha d'importants que s'encarreguen d'eliminar els residus cel·lulars del teixit. Una caracterització completa dels transportadors de la BHE, dels seus substrats, i de les direccions de transport, és essencial per determinar quins són els requeriments externs del SNC i com la BHE regula la interacció entre la sang i el SNC (Mittapalli et al., 2010).

#### 1.4.2.3 Molècules d'adhesió a leucòcits

El SNC presenta uns nivells d'activació del sistema immunitari extremadament baixos, amb una absència pràcticament total de neutròfils i limfòcits dins el parènquima. La infiltració de leucòcits de la sang cap al teixit és un procés amb múltiples passos que inclou l'adhesió de rodament, l'adhesió ferma a les CEs i la posterior extravasació. Aquest procés requereix que les CEs expressin una sèrie de molècules d'adhesió a leucòcits com les selectines (selectina E i P) per l'adhesió de rodament i diverses immunoglobulines per l'adhesió ferma (Huang et al., 2006). L'expressió d'aquestes proteïnes és significativament inferior en les CEs del SNC que en les CEs d'altres teixits perifèrics però aquesta expressió es dispara durant malalties que impliquin una neuroinflamació com la isquèmia cerebral o l'esclerosi múltiple (Huang et al., 2006; Engelhardt, 2008). Cal destacar, que s'han observat infiltracions de diferents grups de cèl·lules inflamatòries en funció de la malaltia. Per exemple, en el cas de la isquèmia cerebral s'ha descrit una infiltració de neutròfils i macròfags però no de limfòcits (Engelhardt, 2008).

#### 1.4.2.4 Altres molècules de la BHE

Les aproximacions genòmiques i proteòmiques a gran escala han permès la identificació de cascades de senyalització que es produeixen en les CEs del SNC. Més concretament, s'ha observat que les vies "Wnt/b-catenin" i "Sonic hedgehog" juguen un paper clau regulant la formació i el funcionament de la BHE (Liebner et al., 2008; Stenman et al., 2008; Alvarez et al., 2011). D'altra banda, el metabolisme vascular també es troba implicat en la regulació de les propietats de barrera dels vasos del SNC metabolitzant toxines o alterant les propietats de diverses molècules. En aquest sentit, s'han identificat enzims específics com l'anhidrasa carbònica IV i la transpeptidasa  $\gamma$ -glutamil, que es troben enriquits en la vasculatura del SNC (Orlowski et al., 1974; Ghandour et al., 1992).

#### 1.4.3 Mecanismes de disrupció de la BHE

La disrupció de la BHE té lloc ràpidament després d'un dany cerebral isquèmic (Yang and Rosenberg, 2011). Dues hores després de l'insult isquèmic s'ha observat una aparent degradació de la MB que continua amb la posterior reperfusió (Hamann et al., 2004). De fet, amb només 10 minuts de reperfusió s'han trobat evidències d'alteracions a la MB (Yepes et al., 2000) i de disrupció de la BHE (Jickling et al., 2014). En humans, s'ha descrit que

l'obertura de la barrera es pot donar entre 2 i 6 h després de l'inici de la isquèmia (Latour et al., 2004; Warach and Latour, 2004). Ara bé, aquesta disrupció no sempre es produeix uniformement al llarg del temps ja que s'ha observat una fluctuació en els pics de màxima permeabilitat entre les 4 i les 8 h i entre les 12 i les 16 h (Klohs et al., 2009), i una posterior obertura després de 72 h (Sandoval and Witt, 2008). Aquestes fluctuacions poden venir donades per els diferents aspectes de l'infart que constantment està evolucionant i per l'estat de perfusió (hiperèmia o hipoperfusió) (Sandoval and Witt, 2008).

A continuació es descriuen els mecanismes implicats en la disrupció de la BHE. Cal destacar, que el fet de descriure els mecanismes per separat, és simplement per facilitar l'explicació, ja que aquests mecanismes estan estretament relacionats i tenen lloc en paral·lel.

#### 1.4.3.1 Disrupció per estrès oxidatiu

Com s'ha descrit anteriorment, les ROS són generades ràpidament durant la isquèmia però sobretot durant la reperfusió, via NOX, XO, mitocondris i mediadors inflamatoris entre d'altres (Gürsoy-Özdemir et al., 2004; Fraser, 2011). L'associació de l'increment de ROS amb la disrupció de la BHE està àmpliament descrita ja que s'ha vist que tant els nivells de ions  $O_2^-$  com els de  $ONOO^-$  es troben incrementats a la microvasculatura i als PAs després d'una isquèmia/reperfusió en un model *in vivo* amb rates. En aquest model, la disrupció de la BHE va correlacionar amb els nivells de ROS i es va arribar a prevenir mitjançant la inhibició de l'NO (Gürsoy-Özdemir et al., 2004). En aquest sentit, la deficiència o inhibició de NOX també fa disminuir la disrupció de la BHE (Tang et al., 2011), la neutralització de les ROS redueix l'aparició d'hemorràgies espontànies (Lapchak et al., 2001) o induïdes per t-PA (Asahi et al., 2000) en models trombòtics i el bloqueig de l'enzim XO i la reducció dels nivells de  $O_2^-$  disminueixen la migració de monòcits a través d'una monocapa de CEs cerebrals de rata (Van der Goes et al., 2001).

Els mecanismes moleculars subjacents per els quals les ROS contribueixen a la disrupció de la BHE estan d'una banda estretament coordinats amb el procés inflamatori induint la secreció i activació de citocines i proteases que propaguen el dany per la vasculatura i d'altra banda, relacionats amb l'activació de cascades de senyalització que involucren les proteïnes RhoA, PI3K i PKB (de l'anglès "Ras homolog A", "phosphoinositide 3-kinase" i "protein kinase B" respectivament). Aquest fet acaba incrementant la migració de monòcits

a través de la BHE provocant alhora, una alteració del citoesquelet d'Actina i una redistribució i desaparició d'occludina i Claudina-5 de les CEs (Schreibelt et al., 2007). De forma similar, l'activació deguda a les ROS, de la maquinària contràctil de les CEs, acaba induint una desregulació de l'occludina i la subseqüent obertura de la BHE (Huppert et al., 2010). Així mateix, s'ha descrit que l'estrès oxidatiu pot alterar l'expressió dels TLRs a les CEs que condueix a una reducció i deslocalització d'occludina i Claudina-5 (Nagyoszi et al., 2010). Per últim, s'ha vist que les ROS també són capaces d'induir i activar per S-nitrosilació algunes MMPs com la MMP-9 (Gu et al., 2002; Haorah et al., 2007).

#### *1.4.3.2 Disrupció per neuroinflamació*

La resposta inflamatòria incrementa els nivells de citocines que alhora indueixen l'expressió de CAMs a l'endoteli cerebral com la CAM intracel·lular 1 (ICAM-1) o les selectines P i E, promovent així el reclutament de cèl·lules immunitàries al focus de la lesió (Yilmaz and Granger, 2008). Els neutròfils i monòcits s'adhereixen a les parets vasculars i s'extravasen, contribuint de forma important al dany a la BHE i a la desregulació de les UEs ja que secreten diverses molècules durant el procés com proteases, prostaglandines i ROS, que poden danyar directament l'endoteli i altres components de la BHE augmentant així el risc de TH (Bolton et al., 1998). A més, sembla que durant la infiltració d'aquestes cèl·lules es produeixen algun tipus d'interaccions amb les MAUs de les UEs fet que també aniria a favor de la disrupció de la BHE (Weber et al., 2007).

Les dues principals citocines inflamatòries que s'alliberen com a resposta a la isquèmia, IL-1 $\beta$  i TNF- $\alpha$ , poden afectar directament a la BHE induint MMPs i la formació de ROS (Lakhan et al., 2009). De forma similar, semblaria que algunes quimiocines, fonamentalment la MCP-1 (de l'anglès "monocyte chemoattractant protein-1"), també pot actuar directament sobre la BHE regulant les proteïnes de les UEs: occludina, claudina i ZO-1 i 2 (Stamatovic, 2003; Yao and Tsirka, 2014).

#### *1.4.3.3 Disrupció per proteòlisi*

La proteòlisi extracel·lular és un mecanisme àmpliament utilitzat a les cèl·lules per regular la funció i el destí de les proteïnes. A diferència de les modificacions post-traduccionals (fosforilació, nitrosació, etc.) que es donen de forma reversible, la proteòlisi és definitiva ja que un cop la proteïna és hidrolitzada, cal sintetitzar-la de nou per tenir la molècula intacta.

Degut a la gran influència en les funcions cel·lulars i al seu caràcter irreversible, les proteases extracel·lulars presenten uns sistemes reguladors molt precisos que mantenen la homeòstasi proteolítica (Lo et al., 2002; Garcia-Touchard et al., 2005). Ara bé, en condicions d'isquèmia aquesta regulació pot veure's alterada induint la proteòlisi de proteïnes cel·lulars, d'unió entre cèl·lules i de la MEC. Aquestes proteïnes són essencials per el correcte funcionament de la BHE i d'aquí sorgeix la hipòtesi que la desregulació de la proteòlisi extracel·lular representa un factor patològic determinant dins el procés de disrupció de la BHE i la conseqüent TH després d'un ictus isquèmic (Wang and Lo, 2003; Lee et al., 2004; Wang et al., 2004). Les proteases extracel·lulars implicades en la disrupció de la BHE es poden classificar en tres grups segons el tipus: les proteases serines, les MMPs i les proteases cisteïnes, tot i que aquestes últimes no desenvolupen rols tant importants com les altres (Garcia-Touchard et al., 2005).

#### 1.4.3.3.1 Proteases serines

Les proteases serines són un grup heterogeni d'enzims on la majoria són de gran importància dins la biologia vascular, incloent factors fibrinolítics com l'activador del plasminogen de tipus urocinasa, el t-PA o la plasmina (Sheehan and Tzirka, 2005). En alguns casos també s'inclouen els factors de coagulació com la trombina, la proteïna C i els factors VII, IX, X i XII (Garcia-Touchard et al., 2005). De forma general, a banda de la seva funció proteolítica, el t-PA, la trombina i la plasmina poden iniciar l'activació de la micròglia i alterar la supervivència tant de neurones com de macròfags, a més d'interaccionar també amb el receptor d'activació per proteasa 1 (PAR1, de l'anglès "protease-activated receptor 1") que contribueix al dany isquèmic. Aquestes tres proteases poden provocar efectes severs al cervell i tenen la capacitat d'alterar el desenvolupament i el grau d'afectació del dany isquèmic contribuint a la mort cel·lular, l'edema i la disfunció de la BHE (Sheehan and Tzirka, 2005; Gravanis and Tzirka, 2008). Paral·lelament, després del tractament trombolític, l'rt-PA exogen pot interaccionar amb aquestes proteases serines endògenes contribuint a la desregulació de la proteòlisi extracel·lular (Gravanis and Tzirka, 2008). La trombina d'altra banda, a part del seu rol dins la cascada de coagulació, també pot provocar efectes neurodegeneratius ja que s'ha descrit que el bloqueig d'aquesta proteïna en determinats estadis redueix notablement l'edema i el volum d'infart després d'una isquèmia (LaMonte, 2002). No obstant, no totes les proteases extracel·lulars desenvolupen un paper perjudicial

en la isquèmia. S'ha demostrat que l'activació de la proteïna activada C (APC, de l'anglès "activated protein C"), una proteasa serina que es troba al torrent sanguini, li confereix una activitat anticoagulant, antiinflamatòria, citoprotectora i antiapoptòtica (Mosnier et al., 2007).

#### 1.4.3.3.2 Metal·loproteases de matriu

Les MMPs són una família d'endopeptidases dependents de zinc d'entre les quals destaquen les MMP-9, 2 (col·lagenases) i 3 (degrada laminina). S'ha demostrat sobradament que diverses MMPs entre les quals les MMP-2, 3, 7 o 9 es troben incrementades i sobreactivades després d'un ictus isquèmic (Heo et al., 1999; Rosell et al., 2006; Suzuki et al., 2007) i es creu que tant poden provocar efectes perjudicials com beneficiosos. Durant les primeres hores i dies després d'un ictus isquèmic agut, les MMPs poden trencar la BHE degradant les proteïnes d'UEs (ex. Ocludina i Claudina-5) i les proteïnes de la MB (ex. fibronectina, laminina, col·lagen, proteoglicans, entre altres) i per tant incrementar la infiltració de leucòcits, l'edema cerebral i l'hemorràgia (Cunningham et al., 2005; Muralikrishna Adibhatta and Hatcher, 2008). Paradoxalment, aquestes degradacions dutes a terme per les MMPs també són necessàries per modular la remodelació neurovascular i potenciar la recuperació post isquèmia (Cunningham et al., 2005). Al cervell, les MMPs són sintetitzades en una forma inactiva per pràcticament totes les cèl·lules (endotelials, micròglia, neurones i astròcits) però les dades experimentals obtingudes suggereixen que les CEs microvasculars i els leucòcits infiltrats són la font cel·lular principal de MMP-9 (si més no, les primeres 24 h) després d'una isquèmia focal (Justicia et al., 2003; Jin et al., 2010c). Precisament, la MMP-9 és la principal proteasa responsable de la disrupció de la BHE tant en models animals (Rosenberg and Yang, 2007; Yang et al., 2007) com en pacients (Montaner et al., 2003; Rosell et al., 2008), mentre que el rol de les MMP-2 i 3 també estaria relacionat amb l'obertura de la BHE però de forma més secundària.

#### 1.4.3.4 Alteració de la transcitosi

La transcitosi o transport transcel·lular engloba un conjunt de processos que permeten el pas de macromolècules a través de les cèl·lules mitjançant la formació de vesícules. A les CEs del SNC, el procés de transcitosi es troba molt menys actiu en comparació amb les CEs dels altres teixits no neurals, i per tant, la seva sobre activació deguda a un dany o malaltia,

representa un factor crític que pot acabar provocant la disfunció de la BHE. La transcitosi a través de les CEs es porta a terme mitjançant el trànsit d'unes vesícules anomenades caveoles formades bàsicament per caveolines (Veure apartat 1.5). La Caveolina-1 (Cav-1) és una proteïna expressada per totes les CEs i curiosament varis treballs han descrit una sobreexpressió d'aquesta proteïna a les CEs de la BHE després d'haver patit un dany o isquèmia cerebral (Nag et al., 2007; Chen et al., 2018), mentre que altres han observat tot el contrari (Shen et al., 2006; Gu et al., 2012). L'expressió de la proteïna associada a vesícules del plasmalemma (PLVAP de l'anglès "plasmalemma vesicle-associated protein") es troba incrementada a les CEs perifèriques en comparació amb les CEs del SNC, i ha estat implicada en el trànsit vesicular, en la formació de fenestres i en l'extravasació de leucòcits. S'ha observat també en diverses malalties amb disfunció de la BHE, un increment en l'expressió d'aquesta proteïna (Shue et al., 2008). Per tant, el fet que proteïnes directament relacionades amb el procés de transcitosi resultin afectades quan es dona una disfunció de la BHE, suggereix que la transcitosi pot estar jugant un paper clau en la regulació de la integritat i permeabilitat de la BHE.

#### *1.4.3.5 Disrupció associada al t-PA*

El paper que juga el t-PA en condicions isquèmiques va més enllà de la seva activitat proteolítica ja que pot intervenir directament en els diferents mecanismes descrits anteriorment. Per una banda, s'ha descrit que l'excés de t-PA activat pot provocar efectes neurotòxics provocant en última instància la mort neuronal. Es considera que principalment hi ha dues vies per les quals el t-PA pot esdevenir neurotòxic: La via de la proteïna LRP1, i la que es creu que és la principal, la del receptor NMDA.

La LRP1 és una proteïna que forma part de la família de receptors de lipoproteïnes de baixa densitat que s'uneixen a diversos lligands, incloent el t-PA (Herz and Strickland, 2001). Al torrent sanguini, el t-PA és eliminat gràcies a l'acció de la LRP1 present a les cèl·lules endotelials, que permet la seva internalització i degradació als lisosomes. Al cervell, la LRP1 es troba a neurones i a astròcits perivasculars, i s'ha descrit que la seva interacció amb el t-PA desencadena una senyal intracel·lular involucrant la síntesi de NO que regula el to cerebrovascular i la permeabilitat de la BHE. De fet, en condicions isquèmiques, s'ha associat la interacció t-PA-LRP amb un increment de l'expressió de la NOS induïble (iNOS) en



astròcits fet que contribueix a l'increment d'estrès oxidatiu i al dany a la BHE (Polavarapu et al., 2007).

El receptor NMDA és un receptor de glutamat, i com s'ha comentat anteriorment, el glutamat és el neurotransmissor excitador principal al cervell i els seus nivells augmenten dràsticament durant la isquèmia, fet que pot provocar encara més danys al cervell. El t-PA està reconegut com a modulador de la neurotransmissió glutamatèrgica. La primera evidència d'aquesta connexió va ser publicada per Tsrka et al. al 1995, els quals van descriure una disminució de la mort cel·lular en ratolins deficients de t-PA en comparació amb els salvatges (Tsrka et al., 1995). Posteriorment, Wang et al. van mostrar que ratolins deficients de t-PA també presentaven una resistència similar als danys després d'una isquèmia cerebral (Wang et al., 1998). Després d'aquests estudis, diversos treballs han subratllat el paper del t-PA en la regulació dels receptors NMDA. S'ha descrit que el t-PA pot hidrolitzar directament la subunitat GluN1 resultant en un increment de la permeabilitat al  $\text{Ca}^{2+}$  d'aquests receptors (Nicole et al., 2001; Benchenane et al., 2007). No obstant, Samson et al. van proposar que el t-PA no actua de forma directa sobre el receptor de NMDA, sinó que potencia el flux de  $\text{Ca}^{2+}$  indirectament, modulant els receptors NMDA via activació de la plasmina, i via col·laboració amb les LRPs (Samson et al., 2008). A més, el t-PA pot incrementar la mort neuronal excitotòxica a través de la degradació de la laminina interneuronal i de la disrupció de la senyalització de supervivència present entre les cèl·lules i la MEC (Indyk et al., 2003).

D'altra banda, s'ha vist que pot activar la micròglia actuant de forma similar a una citocina, independentment de la seva activitat proteolítica, i per tant induir la resposta inflamatòria, indicant que el t-PA pot actuar com a lligand i promoure vies de senyalització intracel·lulars (Rogove et al., 1999). Inversament, alguns estudis han suggerit que el t-PA pot jugar un paper neuroprotector prevenint la toxicitat deguda al zinc, interaccionant amb altres dianes cel·lulars com el factor d'hipòxia induïble 1 (HIF-1, de l'anglès "hypoxia-inducible factor") i promovent la captació de glucosa a través del transportador GLUT3 (Haile et al., 2012; Wu et al., 2012, 2013). S'ha descrit també un efecte neuroprotector del t-PA i de l'rt-PA en condicions isquèmiques a través de la inducció del TNF- $\alpha$ , i de la interacció amb els receptors de NMDA (Haile et al., 2012; Wu et al., 2013). La literatura argumenta que

possiblement la utilització d'aproximacions i de concentracions de t-PA diferents pot explicar la controvèrsia neurotòxica/neuroprotectora del t-PA, perquè els efectes neuroprotectors s'han descrit a dosis molt baixes, mentre que els efectes nocius s'han observat a concentracions més altes. No obstant, l'evidència inicial on ratolins amb deficiència de t-PA estaven més protegits del dany excitotòxic assenyalat directament a la capacitat neurotòxica del t-PA (Wang et al., 1998). En aquest sentit, utilitzant un model isquèmic murí, s'ha descrit que el bloqueig de la interacció entre el t-PA i els receptors NMDA té efectes beneficiosos reduint la neurotoxicitat (MacRez et al., 2010), fet que també donaria suport al rol perjudicial del t-PA.

Finalment, també s'ha descrit una connexió entre el t-PA i les MMPs que deriva d'un conjunt d'estudis farmacològics, genètics i clínics. En models animals, s'ha vist que l'activitat del t-PA endogen cerebral s'indueix ràpidament (1 h) després d'una isquèmia focal, precedint a qualsevol canvi en les MMPs i en la integritat de la BHE (Yepes et al., 2003; Tsuji et al., 2005). La deficiència genètica de t-PA o la inhibició de la seva activitat mitjançant la neuroserpina disminueix la disrupció de la BHE, l'edema, la mort neuronal i el volum d'infart després d'una isquèmia cerebral (Wang et al., 1998; Tsuji et al., 2005). Així mateix, s'ha descrit que l'addició d'inhibidors de MMPs redueix significativament la incidència (Lapchak et al., 2000) i la gravetat (Sumii and Lo, 2002) de les hemorràgies cerebrals associades al t-PA en models animals. A més, s'ha vist que l'administració d'rt-PA exogen indueix un fort increment dels nivells cerebrals de MMP-9 en rates hipertenses després d'una isquèmia cerebral focal (Aoki et al., 2002; Sumii and Lo, 2002). En aquest sentit, s'ha descrit que ratolins deficients de t-PA presenten nivells més reduïts de MMP-9 al cervell després d'una isquèmia en comparació amb els seus controls (Wang et al., 2003) i a més, l'administració intravenosa d'rt-PA exogen pot recuperar aquests nivells de MMP-9 i tornar-los a nivells similars als controls (Wang et al., 1998; Tsuji et al., 2005). Estudis clínics han mostrat un increment dels nivells sèrics i cerebrals de MMP-9 en pacients amb un ictus isquèmic agut i han demostrat que l'administració tardana d'rt-PA (>3 h de l'inici de la isquèmia) provoca un increment encara major dels nivells sèrics d'aquesta proteasa (Castellanos et al., 2003, 2007; Barr et al., 2010). En conjunt, aquestes evidències permeten hipotetitzar que el t-PA actua com a principal modulador de la inducció de la MMP-9 durant un ictus isquèmic, especialment quan el t-PA és administrat de forma exògena. La Claudina-5 i l'Ocludina,

proteïnes principals de les UEs, presenten regions de tall específiques per a MMPs i per tant són un substrat directe d'aquestes proteases (Yang et al., 2007). Com que la disrupció de les interaccions entre l'Ocludina i els filaments d'Actina pot acabar provocant alteracions en la permeabilitat paracel·lular, la degradació de l'Ocludina per mitjà de les MMPs probablement implica també alteracions d'aquesta permeabilitat (Suzuki et al., 2016). A part, les MMPs també poden degradar components de la MB contribuint així a la disrupció de la BHE i a la formació d'edema i TH (Rosell et al., 2008). A més, s'ha demostrat que l'rt-PA pot induir un increment del factor de creixement endotelial vascular (VEGF, de l'anglès "vascular endothelial growth factor"), una proteïna amb capacitat d'estimular els processos d'endocitosi i transcitosi, afavorint també, l'augment de la permeabilitat de la BHE (Horowitz and Seerapu, 2012; Suzuki et al., 2016).

### 1.5 Caveolines

Les caveoles són una forma especialitzada de bales lipídiques o "lipid rafts" que formen microinvaginacions (50-100 nm) a la membrana plasmàtica i d'aquesta manera faciliten la interacció entre lligands i receptors participant en la regulació de varies funcions cel·lulars. Aquestes estructures són riques en esfingolípid, colesterol i altres proteïnes lipídiques i es poden trobar en la majoria de tipus cel·lulars, tot i que particularment abunden en cèl·lules endotelials, musculars i adipòcits. Inicialment, les caveoles es van relacionar en processos com la incorporació de colesterol, potocitosi i endocitosi, i posteriorment, altres estudis les han implicat en processos com "mechanosensing", transducció del senyal i transport macromolecular (Parton and Simons, 2007). Gràcies al descobriment de la composició molecular de les caveoles, es va poder determinar que els responsables essencials de la seva formació són dos grups de proteïnes: les caveolines i les cavines (Hansen and Nichols, 2010). Recentment han aparegut diverses evidències que suggereixen que les caveoles, i sobretot les caveolines, poden jugar un paper beneficiós en un context d'isquèmia cerebral (Xu et al., 2015).

Les caveolines són proteïnes d'entre 22 i 24 kDa i la seva família es classifica en tres grups: Cav-1, 2 i 3. Cav-1 i Cav-2 s'expressen generalment a cèl·lules de múscul llis, cèl·lules endotelials, mioblasts de l'esquelet, fibroblasts i adipòcits, mentre que la Cav-3 ho fa bàsicament a cèl·lules de múscul estriat (esquelètic i cardíac) (Anderson, 1998). La Cav-1 va

ser la primera proteïna identificada com una proteïna essencial per la formació de les caveoles (Rothberg et al., 1992) i s'ha observat que la inhibició genètica d'aquesta proteïna causa una disminució de caveoles en teixits no musculars (Drab et al., 2001), mentre que la seva re-expressió en cèl·lules deficientes de Cav-1 induïx la formació *de novo* de caveoles (Fra et al., 1995). Tot i això, la sobreexpressió d'aquesta proteïna en cèl·lules endotelials, que ja de per sí són riques en Cav-1, no incrementa el nombre de caveoles (Bauer et al., 2005). L'"splicing" alternatiu de l'ARN missatger genera dues isoformes: una Cav-1 $\alpha$  de 24 kDa i una Cav-1 $\beta$  de 21 kDa. Aquestes dues isoformes difereixen en 31 aminoàcids addicionals que es troben presents a l'isoforma  $\alpha$ . La funció d'aquestes dues isoformes encara es desconeix però es creu que presenten diferències en la capacitat de formar caveoles (Fujimoto et al., 2000).

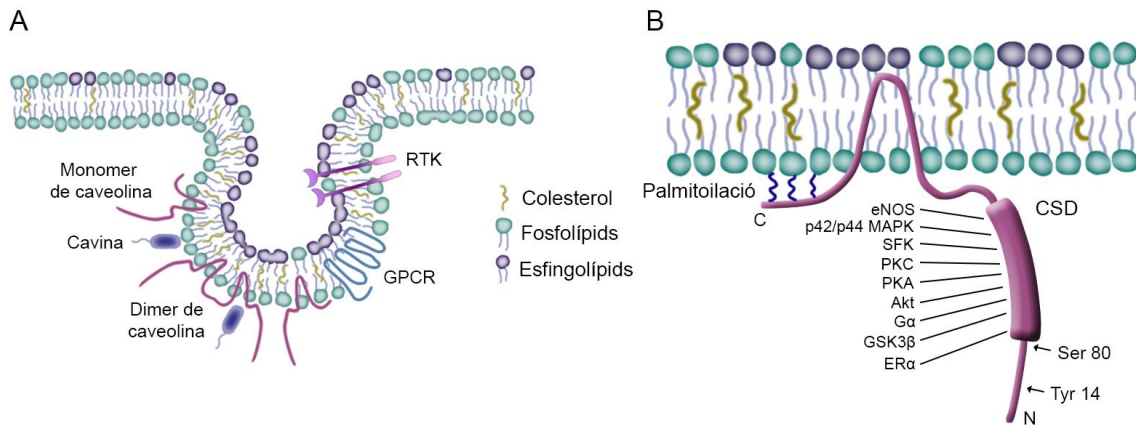
La Cav-2 actua com a complement de la Cav-1 i forma hetero-oligòmers en la majoria de cèl·lules. La seva expressió està subjecta a la Cav-1 ja que s'ha demostrat, que en absència de Cav-1, Cav-2 és degradada via proteosoma (Mora et al., 1999). També s'ha vist que en ratolins deficientes d'aquesta proteïna l'expressió de Cav-1 es troba reduïda, però la formació de caveoles continua intacta, indicant que la Cav-2 no és essencial per la seva formació (Razani et al., 2002). Ara bé, l'expressió conjunta de Cav-1 i Cav-2 resulta en una formació més intensa i més abundant de caveoles (Li et al., 1998), suggerint per tant, que la presència de Cav-2 intervé d'alguna manera reforçant aquesta formació.

La Cav-3 està generalment reconeguda com a Caveolina específica de múscul. Tot i això, també ha estat detectada en astròcits, neurones i cèl·lules de la microglia (Nishiyama et al., 1999; Shin et al., 2005; Niesman et al., 2013). La seva estructura i funcions són similars a les de la Cav-1 amb la diferència que, mentre la Cav-1 i 2 formen oligòmers heterogenis, la Cav-3 pot formar complexos homogenis de gran pes molecular. A més, s'ha demostrat que en cèl·lules musculars de ratolins deficientes de Cav-3, l'estructura caveolar desapareixia (Galbiati et al., 2001). De forma similar a la Cav-1, Cav-3 pot dirigir la formació de vesícules, i en absència de Cav-1, és capaç per ella sola de generar caveoles (Parat, 2009).

En el sistema nerviós central, inicialment es creia que les caveoles i caveolines es trobaven únicament a les cèl·lules endotelials i de la glia (Ikezu et al., 1998) però estudis posteriors van revelar l'existència d'estructures semblants a les caveoles en cèl·lules neuronals i van

detectar expressió dels tres tipus de caveolines en neurones (Bu et al., 2003; Boulware et al., 2007). S'ha demostrat que ratolins amb deficiència de Cav-1 presenten fenotips neuronals complexos, incloent alteracions emocionals, defectes en la memòria espacial i hipofunció colinèrgica (Trushina et al., 2006).

Les caveolines poden interaccionar físicament amb una gran quantitat de proteïnes gràcies a la presència d'un domini anomenat en anglès "caveolin scaffolding domain" (CSD) (Rothberg et al., 1992). Aquest domini confereix a les caveolines la possibilitat d'unir-se a altres proteïnes com per exemple les NOS, MMPs o receptors de factors de creixement entre d'altres. Per tant, les caveolines poden regular aquestes proteïnes i per tant participar en múltiples activitats cel·lulars incloent la senyalització mitògena (Thyberg, 2003), l'apoptosi (Peterson et al., 2003), el transport de colesterol (Fielding and Fielding, 2001), processos tumorals (Goetz et al., 2008) i patologies vasculars (Frank et al., 2007) (Figura 1.6). Actualment, un dels principals focus d'estudi en aquest àmbit està posat sobre la Cav-1 ja que s'ha suggerit que aquesta proteïna pot estar jugant un paper crític en la regulació de la permeabilitat de la BHE en un context d'isquèmia/reperfusió cerebral.



**Figura 1.6| Representació esquemàtica d'una caveola i de la Caveolina.** A) Les caveoles estan formades bàsicament per oligòmers de caveolina, cavines i colesterol a la membrana plasmàtica, a més de poder contenir diferents receptors de senyalització com els GPCR (de l'anglès "G protein-coupled receptors") o els RTK (de l'anglès "receptor tyrosine kinases"). B) El domini CSD (de l'anglès "caveolin scaffolding domain") dels monòmers de caveolina els permet interaccionar amb una gran varietat de proteïnes. eNOS: de l'anglès "endothelial nitric oxide synthase"; MAPK: de l'anglès "mitogen-activated protein kinases"; SFK: de l'anglès "Src family kinase"; PKC, A: de l'anglès "protein kinase C, A"; Akt: "protein kinase B"; Gα: subunitat α de la proteïna G; GSK3β: de l'anglès "Glycogen synthase kinase 3 beta"; ERα: de l'anglès "estrogen receptor α".

### 1.5.1 Cav-1 i la isquèmia cerebral

S'ha demostrat sobradament que la Cav-1 en condicions isquèmiques té un caràcter altament pleiotròpic ja que s'ha vist implicada en diversos processos incloent l'angiogènesi, la resposta inflamatòria, l'apoptosi, i la regulació de la permeabilitat de la BHE entre d'altres. Concretament, s'ha descrit que la Cav-1 és essencial per la inducció de l'angiogènesi ja que la seva inhibició en condicions isquèmiques provoca una disminució del factor VEGF, una de les principals proteïnes reguladores de l'angiogènesi (Gao et al., 2014). De forma similar, s'ha suggerit que la Cav-1 pot promoure la neurogènesi i la neuroplasticitat (Mandyam et al., 2017; Pang et al., 2017; Egawa et al., 2018). D'altra banda, la Cav-1 també sembla estar regulant la inflamació ja que s'ha observat que pèptids derivats de la Cav-1 com la Cavtratina o el CSD poden reduir la inflamació i la infiltració de leucòcits (Bucci et al., 2000; Argaw et al., 2012; Jiang et al., 2017). Inversament, a l'endoteli i en leucòcits polimorfonuclears, s'ha demostrat que la Cav-1 promou la inflamació a través dels TLR4 i induint l'activació, l'adhesió i la migració de leucòcits i limfòcits T (Hu et al., 2007;

Oakley et al., 2009; Jiao et al., 2013). S'ha suggerit també que la Cav-1 juga un paper antiapoptòtic en condicions isquèmiques ja que ratolins amb absència d'aquesta proteïna presenten un increment de la mort cel·lular per apoptosi (Jasmin et al., 2007).

No obstant, tot i l'àmplia bibliografia descrita, el seu rol durant l'insult isquèmic és complicat de determinar i presenta algunes controvèrsies entre els diferents treballs que l'analitzen. Alguns estudis suggereixen que la Cav-1 pot actuar d'una forma protectora inhibint l'activitat de MMP-9 i regulant l'angiogènesi postisquèmica (Jasmin et al., 2007; Gu et al., 2012; Choi et al., 2016), mentre que d'altres li atorguen un rol més aviat perjudicial relacionant-la amb el deteriorament de les proteïnes de les UEs i amb l'increment de la permeabilitat de la BHE (Nag et al., 2007, 2009; Song et al., 2016). Una part d'aquesta tesi es centra precisament en aquesta relació entre la Cav-1 i la permeabilitat de la BHE, la qual es detallarà en el següent apartat.

#### *1.5.1.1 Cav-1 i la BHE*

L'estreta relació entre la Cav-1 i la permeabilitat de la BHE en un context isquèmic està ben establerta tot i que encara no es coneixen amb detall tots els mecanismes implicats. S'ha observat en models experimentals d'isquèmia cerebral que la disminució de Cav-1 resulta en un increment de la permeabilitat de la BHE (Gu et al., 2012). La Cav-1 pot regular la permeabilitat de la BHE principalment a través de les rutes trans i paracel·lulars. En aquest sentit, com s'ha comentat a l'apartat 1.4.3.4, es considera que la Cav-1 pot incrementar la permeabilitat de la BHE mitjançant l'augment del nombre de caveoles (Feng et al., 1999; Knowland et al., 2014). La fosforilació de la Cav-1, portada a terme per la proteïna Src, representa un dels punts claus en la regulació d'aquest transport. Aquesta fosforilació inicia el procés de fissió de les caveoles i permet el transport vesicular transendotelial (Xu et al., 2015).

D'altra banda, la Cav-1 també pot afectar a la permeabilitat paracel·lular ja que té la capacitat de regular les MMPs. S'ha descrit que les MMPs de ratolins amb deficiència de Cav-1 tenen més activitat proteolítica i per tant presenten més degradació d'UEs que els seus controls respectius (Choi et al., 2016). De forma similar, s'ha demostrat que la disminució dels nivells de Cav-1 acaba provocant una reducció de l'expressió d'UEs i la seva proteòlisi, mentre que la sobreexpressió de Cav-1 restaura aquests efectes (Li et al., 2015).

Aquest fet podria ser degut a la capacitat de la Cav-1 per disminuir els nivells de NO i en conseqüència reduir la subseqüent activació de MMPs (Gu et al., 2012). La Cav-1 també ha estat relacionada amb la redistribució de les proteïnes de les UEs ja que s'ha descrit en condicions de privació d'oxigen i glucosa (POG) (Veure apartat 1.6.2), que la Cav-1 sembla regular la redistribució de la Claudina-5, que amb la col·laboració de l'NO, acaba sent portada i degradada als autofagosomes (Liu et al., 2012a, 2016a). A més, la Cav-1 també pot modular la inflamació regulant l'enzim COX-2, el qual juga un paper crític en el dany postisquèmic incrementant el dany a la BHE i augmentant la infiltració de leucòcits i la formació d'edema (Candelario-Jalil et al., 2007).

No obstant, el paper que juga la Cav-1 en condicions isquèmiques sobre la BHE no està clar, fins al punt que varis articles, lluny de donar suport al rol suposadament neuroprotector, suggereixen que la Cav-1 podria perjudicar directament la BHE. Utilitzant diferents models animals (Veure apartat 1.6.1) incloent el d'oclusió de l'arteria cerebral mitja (MCAO, de l'anglès "middle cerebral artery occlusion), tractament amb lipopolisacàrids i dany per fred, es va observar una reducció dels nivells de Claudina-5 i cadherina endotelial vascular (VE-cadherina, de l'anglès "vascular endothelial-cadherin") mentre que els nivells de Cav-1 estaven augmentats (Liu et al., 2015). A més, van demostrar que disminuint l'expressió de Cav-1 i inhibint la seva fosforilació es prevenia en gran mesura la degradació de les proteïnes d'UEs i per tant la disrupció de la BHE (Zou et al., 2015; Xie and Lu, 2018). Aquestes discrepàncies entre els diferents estudis poden ser degudes a diferències entre els models utilitzats o entre els dissenys experimentals com per exemple el temps o reversibilitat de la isquèmia, el tractament de les mostres, etc. En definitiva, amb les dades obtingudes fins al moment, la Cav-1 tant pot incrementar la permeabilitat de la BHE a través de la regulació de l'endocitosis i la translocació de proteïnes d'UEs, com pot protegir la integritat de la barrera regulant l'activitat de les MMPs.

#### 1.5.1.2 Cav-1 i l'rt-PA

Tot i que alguns estudis han analitzat la relació entre la Cav-1 i l'rt-PA, els mecanismes moleculars implicats en aquestes possibles interaccions encara són pràcticament desconeguts. Mitjançant la utilització de cultius cel·lulars *in vitro* s'ha demostrat que la Cav-1 sembla intervenir d'alguna forma en l'activació i la secreció de la MMP-9 induïda per l'rt-



PA en condicions isquèmiques i per tant, en l'increment del volum de l'infart i el risc de TH (Jin et al., 2015; Song et al., 2016). En aquest sentit, un estudi clínic ha revelat que els nivells de Cav-1 en el sèrum de pacients amb ictus presenten una bona fiabilitat a l'hora de predir la possible aparició de TH després de l'administració d'rt-PA (Castellanos et al., 2018). A més, s'ha suggerit que un dels mecanismes per els quals l'rt-PA pot incrementar la transcitosi és a través de la modulació de Cav-1 i per tant de caveoles, ja que la seva addició en un model murí d'isquèmia amb MCAO indueix un increment de Cav-1 (Chen et al., 2018). Per tant, tot i la poca bibliografia al respecte, sembla clar que la Cav-1 i l'rt-PA presenten alguna connexió ja sigui directe o a través d'intermediaris, que seria de gran rellevància conèixer en detall per continuar ampliant el coneixement dels mecanismes associats a l'rt-PA i als seus efectes.

### 1.6 Models experimentals d'isquèmia cerebral

Els models experimentals d'isquèmia cerebral han sigut i encara són, fonamentals per continuar avançant cap a la plena comprensió dels mecanismes fisiopatològics i el seu perfil temporal, de la isquèmia cerebral. Els coneixements obtinguts són imprescindibles per poder identificar noves dianes terapèutiques que permetin desenvolupar i millorar els tractaments per l'ictus isquèmic.

Els models es poden classificar en dos grups anomenant-se *in vivo* quan s'utilitzen animals vius i *in vitro* quan es treballa directament sobre cultius cel·lulars. Per considerar que un model experimental és d'utilitat, aquest ha de ser fiable, fàcil de realitzar i reproduir, tenir una variabilitat baixa entre rèpliques i investigadors i reflectir el màxim possible les condicions clíniques que s'intenten imitar. S'han desenvolupat diversos models experimentals d'isquèmia cerebral essent els rosegadors els animals més utilitzats per els models *in vivo*. Aquests animals sovint presenten mides petites, un fàcil maneig, una anatomia cranial i circulatòria similar a la humana i l'opció de controlar fàcilment la gravetat, duració i localització de l'oclusió del vas. Així mateix, els models d'isquèmia focal són els que reproduïen millor l'ictus humà i per tant, són els més utilitzats juntament amb els models *in vitro* en cultius cel·lulars primaris (Prieto-Arribas et al., 2008; Woodruff et al., 2011).

### 1.6.1 Models d'isquèmia cerebral focal *in vivo*

Com s'ha comentat anteriorment, l'ACM i les seves ramificacions són els vasos més freqüentment implicats en l'ictus isquèmic. És per això que la majoria de models d'isquèmia focal es basen en l'oclusió d'una d'aquestes artèries cerebrals. Aquest tipus de model provoca un gradient isquèmic des del nucli de la lesió cap als teixits circumdants, fet que genera diferents condicions metabòliques en funció de la zona analitzada. És degut a aquesta heterogeneïtat que les isquèmies focals sovint són complexes d'analitzar però al mateix temps, són els models més realistes a l'hora d'estudiar la isquèmia en humans i és per això que són els més utilitzats (Woodruff et al., 2011).

Els models focals es poden classificar en dos grups. Es parla d'isquèmia focal transitòria quan l'oclusió del vas en qüestió no sobrepassa les 3 h i va seguida d'una reperfusió prolongada, mentre que en el cas de la isquèmia focal permanent, l'oclusió del vas es manté al llarg de l'experiment que solen durar de un a varis dies. La isquèmia focal es pot produir de múltiples formes com, per exemple, introduint un fil de niló i ocluint l'origen de la ACM i/o alguna altra ramificació (model de filament intraluminal), lligant-la directament amb un fil (model de lligadura), electrocoagulant-la (model d'electrocoagulació) o provocant un coàgul mitjançant fototrombosi (model fototrombòtic) o l'addició de trombina (model tromboembòlic). Es creu que els models més realistes són precisament els tromboembòlics que utilitzen la trombina per generar un coàgul i provocar la isquèmia (Woodruff et al., 2011).

#### 1.6.1.1 Models d'isquèmia focal tromboembòlics

El primer model que utilitzava coàguls de sang per simular una isquèmia cerebral es va descriure al 1955 aconseguint un 80% d'èxit en la inducció dels infarts però amb una gran variabilitat en la mida de la lesió (Hill et al., 1995). Des de llavors s'han aplicat millores amb l'objectiu de disminuir aquesta variabilitat (Overgaard et al., 1992). Segons l'origen de la sang utilitzada per generar els coàguls introduïts, es parla de models heteròlegs quan la sang és humana, o autòlegs quan la sang és del mateix animal utilitzat. El coàgul preformat s'introdueix a través de la caròtida externa i la interna fins a deixar-lo a la base de l'ACM. La reperfusió es pot produir de forma espontània o bé gràcies a l'administració d'rt-PA, aconseguint d'aquesta forma, una bona simulació de la situació clínica especialment dels

ictus cardioembòlics, on el coàgul d'origen cardíac és expulsat i acaba obstruint la ACM. A més, aquest model no requereix cirurgia cerebral, fet que facilita l'estudi de la lesió ja que s'eviten hemorràgies degudes a la manipulació. Una posterior modificació d'aquest model va permetre desenvolupar el model tromboembòlic *in situ* (Prieto-Arribas et al., 2008).

El model tromboembòlic *in situ* es va descriure al 2007 i consisteix en injectar trombina directament a una ramificació de l'ACM per tal de generar el coàgul i induir la isquèmia. Aquest grup d'investigadors van demostrar que el model presentava una reperfusió espontània en el 15% dels casos i que l'administració d'rt-PA aconseguia recanalitzar l'artèria i rescatar part del teixit compromès, obtenint així, una bona simulació clínica (Cyrille et al., 2007). A part, com que el model és exclusivament d'infart cortical, la supervivència és més elevada que en el model anterior (Fluri et al., 2015). En aquesta tesi s'ha utilitzat un model tromboembòlic *in situ* amb reperfusió tardana amb rt-PA (García-Yébenes et al., 2011).

#### 1.6.2 Models d'isquèmia cerebral *in vitro*

Tot i que els cultius *in vitro* de línies cel·lulars o fragments de teixit cerebral estan molt lluny de poder simular l'enorme complexitat de la situació isquèmica, permeten la investigació de mecanismes bioquímics i moleculars bàsics però específics que es desenvolupen en condicions de deficiència energètica similars als d'una isquèmia. D'altra banda, també permeten analitzar punts de control i vies moleculars relacionades amb la mort cel·lular per necrosi, apoptosi i/o autofàgia (Holloway and Gavins, 2016). Un altre gran avantatge que donen els cultius *in vitro* és la possibilitat de testar nous fàrmacs potencialment neuroprotectors abans de passar a l'estudi *in vivo*.

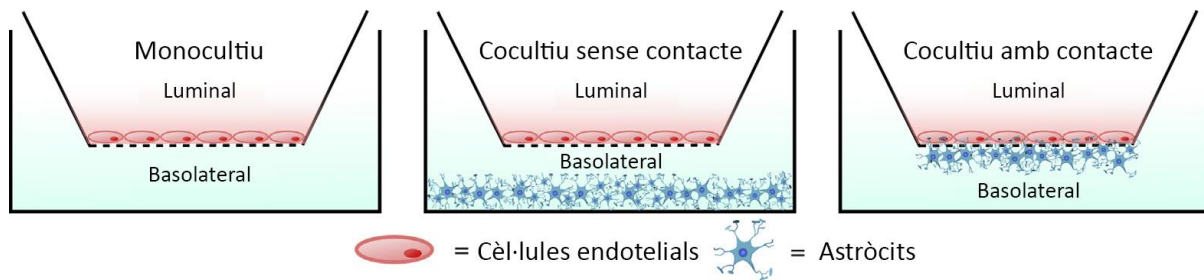
Principalment hi ha dues formes d'induir unes condicions d'isquèmia simulades *in vitro*: mitjançant la POG, que és el model més utilitzat, o el bloqueig químic o enzimàtic del metabolisme cel·lular. Per tal de sotmetre les cèl·lules a una POG, normalment es canvia el seu medi per un sense glucosa i s'introdueixen a una cambra hipòxica on l'atmosfera normal de O<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> es substitueix per una barreja de N<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub>. També hi ha la opció de mantenir la glucosa al medi passant a ser simplement condicions hipòxiques, tot i que no és el més adequat ja que la isquèmia sempre va acompanyada d'una dràstica disminució del

subministrament de nutrients. D'altra banda, per tal de simular la reperfusió es poden tornar els cultius a les condicions inicials (Sommer, 2017).

La utilització de cultius primaris de neurones i de cèl·lules de la glia ha permès estudiar les respostes específiques a un estrès com la POG i analitzar els seus rols dins de la fisiopatologia de la isquèmia cerebral. Aquests estudis representen un component important de la recerca preclínica però per aproximar-se més a la realitat de la isquèmia humana és imprescindible la seva combinació amb estudis *in vivo*. D'altra banda, la utilització de models que simulen la BHE és un altre factor important per continuar estudiant el paper crític que juga aquesta estructura durant una isquèmia (Sommer, 2017).

#### 1.6.2.1 Models *in vitro* de BHE

Els models *in vitro* de BHE tenen un cost relativament baix, una bona capacitat de replicació i representen una bona opció per analitzar la regulació de mecanismes a nivell molecular, tot i la major permeabilitat en comparació amb les condicions *in vivo*. Els assajos amb inserts (també anomenats "transwells" en anglès) són els més utilitzats a l'hora de desenvolupar aquests models de BHE *in vitro* ja sigui per testar nous fàrmacs o per estudiar la fisiopatologia de determinades malalties (O. Ogunshola, 2012). En aquests assajos, la monocapa de CEs es forma sobre una membrana porosa que divideix el pou simulant una cara luminal i una basolateral. D'altra banda la utilització dels inserts permet tant el cultiu amb una única línia cel·lular, anomenat monocultiu, com amb varies alhora, anomenat cocultiu. El cocultiu s'aconsegueix amb l'addició d'astròcits, PCs o neurones a la part basolateral de l'insert o al fons del pou, millorant així la simulació de BHE (Nakagawa et al., 2009) (Figura 1.7). Finalment, el fet que la membrana sigui porosa permet el pas de molècules de la cara luminal a la basolateral, podent determinar la permeabilitat, els mecanismes de transport, etc. (Romeo Cecchelli et al., 2007).



**Figura 1.7| Configuracions comunament utilitzades en els models de BHE *in vitro*.** Les CE es sembren a la part luminal dels inserts que es troben dins dels pous de cultiu. En el cas dels cocultius, les cèl·lules, en aquest cas astròcits, es poden sembrar directament al fons del pou (cocultiu sense contacte) o a la cara basolateral de l'insert (cocultiu amb contacte). Adaptació de Tornabene and Brodin, 2016.

Les cèl·lules utilitzades en aquests models *in vitro* de BHE es poden obtenir tant de cultius primaris com de línies cel·lulars immortalitzades. Els cultius primaris de CE obtingudes de capil·lars del parènquima cerebral (BMECs, de l'anglès "brain microvascular endothelial cells") exhibeixen unes característiques de BHE excel·lents durant els primers passatges (Nicolazzo et al., 2006). No obstant, presenten com a desavantatges una alta dificultat i consum de temps a l'hora d'obtenir-les i mantenir-les, a banda de ser fàcilment contaminables per altres tipus cel·lulars de la UNV i perdre les característiques de BHE al llarg del temps de cultiu (Brown et al., 2007). D'altra banda, tot i que les CE immortalitzades sovint presenten unes característiques de BHE més limitades que les CE primàries, tenen una major estabilitat al llarg dels passatges i són molt més fàcils d'obtenir i mantenir (Jamieson et al., 2017). Una tercera opció que s'està estudiant recentment és la utilització de cèl·lules mare pluripotents humanes per obtenir el tipus cel·lular desitjat, com per exemple BMECs, de forma il·limitada. Addicionalment, es poden generar astròcits i perícits a partir de les mateixes cèl·lules per aconseguir un model de BHE molt més similar i sinèrgic que el dels models *in vivo*. Els principals inconvenients d'aquestes cèl·lules mare pluripotents són la necessitat d'induir la seva diferenciació i la posterior caracterització de les cèl·lules obtingudes amb l'alta dificultat associada a aquests processos (Canfield et al., 2017).

#### 1.6.2.2 Línia bEnd.3: POG i rt-PA

Actualment existeixen una gran varietat de línies cel·lulars endotelials que mimetitzen les CE de la BHE incloent diverses línies cel·lulars endotelials de capil·lars cerebrals de rata com

les RBE4, RBEC1 o les rBCEC4, d'altres com les BMEC immortalitzades d'origen humà (hBMEC), i també les bEnd.3, una línia endotelial microvascular de ratolí (Jamieson et al., 2017), la qual s'ha utilitzat en aquesta tesi.

Les cèl·lules bEnd.3 són originàries de ratolins BALB/c i van ser transformades amb el vector retroviral NTKmT que expressava l'antigen T mitjà del Poliomavirus. Amb els cultius posteriors es va confirmar la seva naturalesa endotelial tant pel que fa a la morfologia formant monocapes com per l'expressió del factor de von Willebrand, un marcador típic de CEs (Montesano et al., 1990), motiu per el qual la utilització d'aquesta línia immortalitzada està àmpliament acceptada per realitzar estudis sobre la BHE en condicions de POG (Brown et al., 2007; Ku et al., 2016). Fins al moment, s'han realitzat varis estudis analitzant l'efecte de l'rt-PA sobre CEs de microvasculatura cerebral (Freeman et al., 2014; Won et al., 2014; Suzuki et al., 2015; Garraud et al., 2016; Song et al., 2016; Kim et al., 2017) i en diversos casos s'ha utilitzat la línia bEnd.3, tot i que el temps analitzat no sobrepassa les 6 h de reoxigenació després de la POG (Won et al., 2014; Suzuki et al., 2015; Song et al., 2016; Kim et al., 2017) (Taula 1.2). Com s'ha comentat, els mecanismes implicats en la disfunció de la BHE després d'una isquèmia són dinàmics i varien al llarg del temps (Sandoval and Witt, 2008) i és per aquest motiu que es fa necessària una ampliació del curs temporal analitzat que determini els efectes de l'rt-PA a llarg termini.

**Taula 1.2| Les cèl·lules bEnd.3 com a model d'isquèmia.** Estudis publicats que utilitzen la línia cel·lular endotelial bEnd.3 en condicions de POG i /o tractament amb rt-PA.

Temps de POG	Reoxigenació	Tractament amb rt-PA	Referències
2 h	-	-	Liu et al., 2012a
5 h	-	-	Panickar et al., 2014
1, 3 o 6 h	-	-	Zhang et al., 2016
2 o 4 h	-	-	Liu et al., 2016a
6 h	-	-	Liu et al., 2016b
3, 6 o 9 h	24 h totals de tractament	-	Luo et al., 2016
4, 6 o 12 h	24 h	-	Yang et al., 2019
2 h	24 h	-	Feng et al., 2019
2 h	6 h	+	Song et al., 2016
6 h	3 h	+	Won et al., 2014
6 h	3 h	+	Kim et al., 2017
4 h	2 o 5 h	+	Suzuki et al., 2015
Sense POG	24 h	+	Jin et al., 2015

### 1.7 Estudi de l'expressió de proteïnes mitjançant "Western blot"

La tècnica de "Western blot" és una tècnica àmpliament utilitzada per identificar, quantificar i/o determinar el pes molecular de proteïnes específiques. Aquesta tècnica va evolucionar a partir de dues tècniques anomenades "Southern blot" i "Northern blot" les quals s'utilitzen per detectar seqüències específiques d'ADN i ARN respectivament. Al 1979, Towbid et al. va aconseguir separar proteïnes per electroforesi utilitzant un gel de poliacrilamida i urea i transferir-les a una membrana de nitrocel·lulosa (Towbin et al., 1979) i posteriorment, Burnette va millorar el procediment utilitzant gels de poliacrilamida i dodecilsulfat sòdic, moment en qual es va etiquetar la tècnica com a "Western blot" (Burnette, 1981). Aquesta tècnica també es coneix com "protein blotting" o "immunoblotting" i ha esdevingut una eina molt important per l'estudi de proteïnes. El fet de poder transferir les proteïnes separades del gel a una membrana presenta diversos avantatges com una millor manipulació, accessibilitat de les proteïnes als anticossos corresponents per la seva posterior detecció, emmagatzematge més prolongat i una possible reutilització de les membranes. L'evolució constant de la tècnica des de la seva implementació ha portat a desenvolupar múltiples procediments per tal de millorar el procés d'electroforesi i transferència de proteïnes, tanmateix la sensibilitat de la tècnica

depèn bàsicament de l'eficiència de la transferència i de l'especificitat dels antígens i sistema de detecció i amplificació utilitzats. Els resultats poden quedar compromesos si hi ha deficiències en algun d'aquests aspectes (Kurien and Hal Scofield, 2015).

#### 1.7.1 Normalització mitjançant controls endògens

A l'hora d'analitzar els resultats és imprescindible dur a terme una normalització de les mostres per contrarestar els possibles errors durant la seva preparació i/o la càrrega del gel. Per fer-ho, normalment s'utilitza la normalització segons els nivells d'unes proteïnes anomenades constitutives que es caracteritzen per mantenir una expressió abundant i constant sense, teòricament, veure's afectada per les condicions experimentals. Les més àmpliament utilitzades inclouen la  $\beta$ -Actina, l' $\alpha$ -Tubulina, el GAPDH i l'"Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase" (HPRT) entre d'altres. Ara bé, diversos articles han posat en dubte la fiabilitat de les proteïnes constitutives utilitzades com a controls de càrrega en els anàlisis de "Western Blot" ja que en determinades condicions han demostrat presentar una variabilitat experimental important, ja sigui degut a les pròpies condicions experimentals, a la sobresaturació del marcatge, a un soroll de fons massa elevat o a una pèrdua de linealitat (McDonough et al., 2014). Per tant, és necessari un testatge previ d'aquestes proteïnes en les condicions experimentals utilitzades (Aldridge et al., 2008; Eaton et al., 2013; Gilda and Gomes, 2013; Goasdoue et al., 2016). En aquest sentit, el marcatge de tota la proteïna carregada al gel (proteïna total) està emergint com una alternativa fiable per tal de normalitzar els resultats obtinguts per "Western Blot" a més de permetre comprovar la validesa de proteïnes potencialment constitutives (Gilda and Gomes, 2013; Rivero-Gutiérrez et al., 2014).

#### 1.7.2 Normalització mitjançant proteïna total: Gels "stain-free"

El marcatge de la proteïna total ofereix certs avantatges en comparació a les proteïnes constitutives, dels quals el més important és que la normalització no depèn de l'expressió d'una sola proteïna, disminuint així la variabilitat experimental. La detecció de la proteïna total es pot dur a terme utilitzant diferents colorants per tenyir la membrana com el de Ponceau S o el blau de Coomassie, o una tecnologia desenvolupada més recentment anomenada "stain-free" (Zeng et al., 2013; Gilda and Gomes, 2014). Els gels "stain-free" contenen uns compostos "trihalo" que reaccionen amb els residus de triptòfan dels



aminoàcids que un cop exposats a llum ultraviolada, produeixen una fluorescència quantificable que permet mesurar els nivells relatius de la proteïna carregada (Posch et al., 2013). Diversos estudis han confirmat la fiabilitat d'aquest mètode com a control de càrrega amb l'avantatge afegit de poder avaluar la qualitat de la separació de les proteïnes i de la transferència abans de continuar amb el procés de "Western blot" (Gilda and Gomes, 2014).

## 2. HIPÒTESIS I OBJECTIUS

En aquesta tesi s'han plantejat les hipòtesis següents:

- I. L'rt-PA en condicions isquèmiques induirà canvis en la funcionalitat de barrera (viabilitat, activitat metabòlica i permeabilitat cel·lular) de la línia bEnd.3 més enllà de les 24 hores de cultiu.
- II. Les condicions isquèmiques i/o el tractament amb rt-PA poden modificar els nivells d'expressió de proteïnes potencialment constitutives i de proteïnes implicades en la regulació de permeabilitat de la línia bEnd.3.
- III. Els nivells de la proteïna Caveolina-1 de la zona cerebral infartada i del sèrum es modificaran en el model tromboembòlic *in situ* amb administració tardana d'rt-PA.

En base a les hipòtesis plantejades, els objectius de la tesi han estat els següents:

- I. Avaluat l'efecte a llarg termini de l'administració d'rt-PA en condicions d'isquèmia sobre la funcionalitat de barrera en un model *in vitro* mitjançant la utilització de la línia cel·lular endotelial de microvasculatura cerebral de ratolí anomenada bEnd.3.
  - I.1. Optimitzar les condicions de cultiu i establir un protocol de privació d'oxigen i glucosa en la línia bEnd.3.
  - I.2. Analitzar els paràmetres de viabilitat, activitat metabòlica i permeabilitat de les cèl·lules bEnd.3 en condicions de privació d'oxigen i glucosa i posterior reperfusió amb rt-PA fins a les 72 hores de cultiu.

- II. Avaluar l'efecte a llarg termini de l'administració d'rt-PA en condicions d'isquèmia sobre els nivells de proteïnes associades amb la regulació de la permeabilitat de la línia cel·lular endotelial de microvasculatura cerebral de ratolí anomenada bEnd.3.
  - II.1. Determinar l'estabilitat de l'expressió de les proteïnes  $\beta$ -Actina, l' $\alpha$ -Tubulina, GAPDH i HPRT com a controls de càrrega per "Western blot" en condicions de privació d'oxigen i glucosa i tractament amb rt-PA fins a les 72 hores de cultiu.
  - II.2. Analitzar l'efecte de la privació d'oxigen i glucosa i del tractament amb rt-PA sobre els nivells de les proteïnes d'unions estretes Claudina-5 i ZO-1 en les cèl·lules bEnd.3 fins a les 72 hores de cultiu.
  - II.3. Analitzar l'efecte de la privació d'oxigen i glucosa i del tractament amb rt-PA sobre els nivells de Caveolina-1 i la seva forma fosforilada en les cèl·lules bEnd.3 fins a les 72 hores de cultiu.
  
- III. Analitzar l'efecte de l'rt-PA sobre els nivells de Caveolina-1 sèrics i tissulars en un model murí isquèmic tromboembòlic *in situ* amb administració tardana del fàrmac.
  - III.1. Analitzar els paràmetres de dany (volum d'infart, volum d'hemorràgia i edema) en el model tromboembòlic *in situ* amb o sense administració tardana d'rt-PA.
  - III.2. Analitzar els nivells de Caveolina-1 sèrics i tissulars a l'àrea isquèmica dels ratolins sotmesos al model tromboembòlic *in situ* amb o sense administració tardana d'rt-PA.
  - III.3. Determinar correlacions entre els paràmetres de dany i els nivells sèrics i tissulars de Caveolina-1 en el model tromboembòlic *in situ* amb o sense administració tardana d'rt-PA.



## 4. MATERIAL I MÈTODES

## 4.1 Model *in vitro* de BHE

### 4.1.1 Cultiu de la línia cel·lular de ratolí bEnd.3

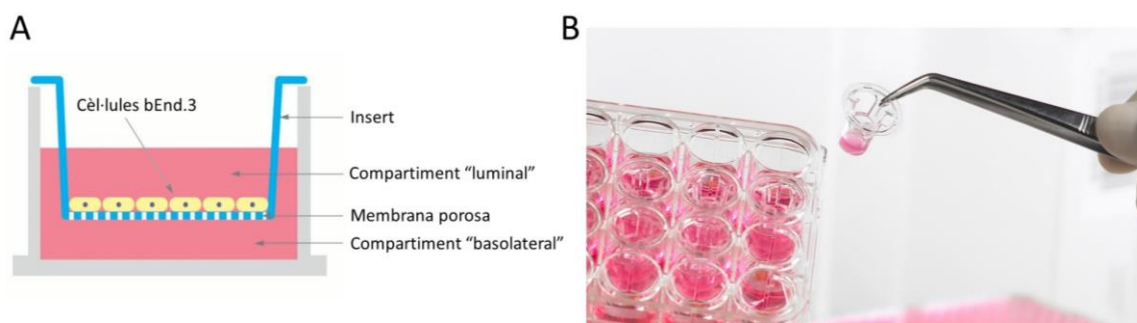
Les CEs immortalitzades originàries de la microvasculatura cerebral de ratolí anomenades bEnd.3 es van adquirir a “American Type Culture Collection” (ATCC) (CRL-2299). Aquestes, es van sembrar i cultivar fins a formar una monocapa en el medi de creixement “High glucose Dulbecco's Modified Eagle's medium” (DMEM HG) amb un 1% de glutamina (Gibco, EE.UU.), un 10% de sèrum fetal boví (FBS) (Gibco, EE.UU.) i un 1% de solució antibiòtica (100 U/mL penicil·lina i 100 µg/mL estreptomicina) (HyClone Laboratories, EE.UU.), en un incubador a 37 °C amb humidificació, 5% de CO<sub>2</sub> i 95% d'aire. Per tots els experiments les cèl·lules es van utilitzar entre els passes 25 i 30, ja que s'ha demostrat que a partir d'aquest moment les bEnd.3 poden començar a perdre la seves característiques de BHE (Brown et al., 2007). Per tal d'analitzar les característiques fisiològiques, com les permeabilitats iònica i transcel·lular, es van sembrar un total de  $1,7 \times 10^4$  cèl·lules a dins de cada insert (recipient amb una membrana porosa a la base que es col·loca a dins els pous de les plaques) (0,3 cm<sup>2</sup> de superfície, porus de 0,4 µm, membrana de PET, BD Falcon, EE.UU.). Prèviament també es van testar inserts amb les mateixes característiques de les cases comercials Corning (#3470, Corning, EE.UU.) i Millipore (#MCHT24H48, Millipore, Alemanya) (Figura 4.1). Per els anàlisis de “Western blot”, es van sembrar  $1,19 \times 10^6$  cèl·lules en plaques de cultiu de 60 mm de diàmetre (21 cm<sup>2</sup> de superfície, Corning, EE.UU.) ja que es requerien més cèl·lules per tenir suficient quantitat de proteïna. En canvi, com en el cas dels inserts, per els anàlisis d'immunofluorescència es van sembrar  $1,7 \times 10^4$  cèl·lules a cada un dels 96 pous de plaques de cultiu dissenyades especialment per aquesta tècnica, amb una base transparent permeten així l'observació al microscopi (0.3 cm<sup>2</sup> de superfície, Becton-Dickinson Biosciences, Irlanda). Llavors les cèl·lules es van deixar créixer fins a assolir la confluència, normalment dia *in vitro* 4 (DIV4), moment en que es van sotmetre a la isquèmia experimental (Veure apartat 4.1.2). Es van obtenir imatges del cultiu i de cada condició experimental (Veure apartat 4.1.3) amb una càmera digital Olympus acoblada al microscopi Axiovert 40 CFL (Zeiss, Alemanya).

#### 4.1.1.1 Descongelació i sembra de les cèl·lules bEnd.3

El criotub amb les cèl·lules bEnd.3 es va descongelar ràpidament utilitzant un bany a 37 °C i es va transferir tot el seu contingut (1 ml) a un tub de centrifuga amb 9 ml de medi DMEM HG complet fred per tal de, seguidament, centrifugar-lo durant 5 min a 1500 rpm. A continuació, es va eliminar amb cura el sobrenedant i es va resuspendre el precipitat cel·lular en 15 ml de medi DMEM HG complet, que finalment, es va sembrar en un flascó T75 i es va incubar a 37 °C i 5% CO<sub>2</sub>.

#### 4.1.1.2 Manteniment del cultiu i subcultiu

Per tal de mantenir els cultius cel·lulars en les condicions òptimes es va canviar el medi dels flascons cada 2-3 dies. Una vegada les cèl·lules estaven confluents, es van subcultivar a les diferents plaques i/o flascons per tal preparar els experiments en qüestió i/o expandir el nombre de cèl·lules. El protocol consistia en aspirar el medi de cultiu del flascó T75 confluent i netejar ràpidament les cèl·lules amb 10 ml tampó fosfat (PBS, de l'anglès "phosphate buffered saline", Invitrogen, EE.UU.) per tal d'eliminar les restes de medi. Seguidament, es van afegir 3 ml de Tripsina-EDTA (Gibco, EE.UU.) i es va incubar durant 5 minuts a l'incubador a 37 °C. A continuació, es va aturar ràpidament l'activitat de la Tripsina afegint 10 ml de medi DMEM HG al flascó, i es van traspasar les cèl·lules a un tub de centrifuga. Finalment, es va centrifugar el tub a 1500 rpm durant 5 min obtenint així un precipitat cel·lular, el qual es va resuspendre en 3 ml/T75 i es va recomptar amb una càmera de Neubauer, per acabar sembrant la densitat cel·lular apropiada segons el tipus de flascó o placa.



**Figura 4.1| Inserts semipermeables.** A) Representació esquemàtica d'un insert. B) Imatge d'una placa de cultiu de 24 pous amb inserts. Adaptació de © 1994-2019 Corning Incorporated All Rights Reserved. [www.corning.com](http://www.corning.com)



#### 4.1.2 Privació d'oxigen i glucosa (POG) i tractament amb rt-PA

Per tal de mimetitzar les condicions d'isquèmia, les cèl·lules bEnd.3 es van exposar a 2,5 h de POG tal com s'explica a continuació. Després de deprivar les cèl·lules una nit (Dia *in vitro* 3 o DIV3) en medi DMEM HG amb un 1% de FBS, es va dur a terme un rentat amb tampó fosfat (PBS, de l'anglès "phosphate buffered saline", Invitrogen, EE.UU.) i es va afegir un medi d'isquèmia sense glucosa ni FBS el qual va ser prèviament bombollejat amb N<sub>2</sub> durant 3 min per tal de desplaçar l'oxigen (Taula 4.1). Seguidament les cèl·lules es van introduir a una cambra d'anòxia (Forma Scientific, Hucoa Erloss, Espanya) a 37 °C on un flux constant de N<sub>2</sub> de 1 L/min mantenia les condicions hipòxiques durant 2,5 h. Les cèl·lules control (CTR) van incubar-se aquest mateix temps amb medi d'isquèmia suplementat amb 5,5 mM glucosa en un incubador amb condicions normals (5% CO<sub>2</sub> i 95% d'aire). Una vegada finalitzat el període de POG es va afegir ràpidament medi DMEM HG per aturar la privació i es va procedir a la reoxigenació de les cèl·lules substituint el medi d'isquèmia per el medi de creixement DMEM HG amb o sense presència d'rt-PA (20 µg/ml) (Genentech, EE.UU.), i retornant totes les plaques a l'incubador normòxic. Tal com s'ha descrit en publicacions prèvies, es va utilitzar una concentració de 20 µg/ml basant-nos en el suggeriment que és una concentració similar a la detectada en sang durant la trombòlisi (Godfrey et al., 1998).

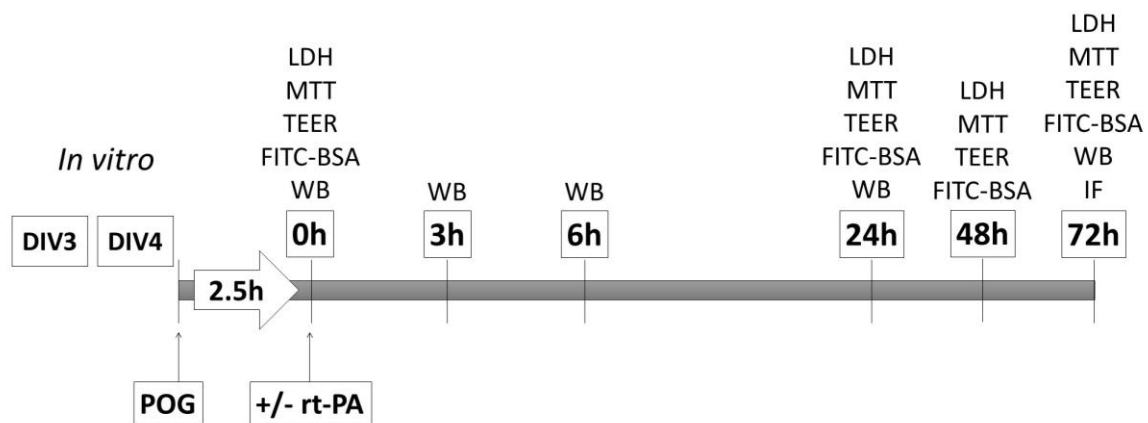
**Taula 4.1| Volums utilitzats durant el protocol de POG en les diferents plaques de cultiu.**

	Plaques de 96 pous	Plaques de 24 pous amb inserts (TW)	Plaques de 60 mm
Deprivació	200 µl/pou	200 µl a TW / 700 µl al pou	5 ml
Rentats amb PBS	100 µl/pou	100 µl a TW / 700 µl al pou	1,5 ml/placa
Volum per aturar la POG	100 µl/pou	100 µl a TW / 430 µl al pou	2 ml/placa
POG/Reoxigenació	150 µl/pou	150 µl a TW / 650 µl al pou	3,75 ml/placa

#### 4.1.3 Grups experimentals i recollida de mostres *in vitro*

Els grups experimentals establerts van ser CTR, on les cèl·lules s'incubaven en condicions de normòxia; POG, on les cèl·lules s'incubaven en absència d'oxigen i glucosa; CTR + rt-PA, on les cèl·lules s'incubaven en condicions de normòxia i es tractaven amb 20 µg/ml d'rt-PA durant la reoxigenació; i POG + rt-PA, on les cèl·lules s'incubaven en condicions de POG i es tractaven amb 20 µg/ml d'rt-PA durant la reoxigenació.

La recollida de mostres i el punt temporal en el qual es duia a terme variava en funció de la determinació a realitzar. Per els anàlisis de viabilitat cel·lular (lactat deshidrogenasa, LDH) (Veure apartat 4.1.4.1), activitat metabòlica (MTT) (Veure apartat 4.1.4.2), permeabilitat iònica (TEER, de l'anglès "transendothelial electrical resistance") (Veure apartat 4.1.5.1) i permeabilitat transcel·lular (FITC-BSA, Sigma-Aldrich, EE.UU.) (Veure apartat 4.1.5.2) es van recollir mostres immediatament després de la POG (0 h) i després de 24, 48 i 72 h de reoxigenació. A més, a les 0, 3, 6, 24 i 72 h de reoxigenació es van recollir les cèl·lules per posteriorment extreure el contingut proteic i analitzar-lo per "Western blot" (Veure apartat 4.1.6). Addicionalment, a les 72 h de reoxigenació també es van realitzar els anàlisis d'immunocitofluorescència (Veure apartat 4.1.7) (Figura 4.2).



**Figura 4.2| Disseny experimental *in vitro*.** Representació esquemàtica dels diferents anàlisis fets després de sotmetre les cèl·lules bEnd.3 a 2,5 h d'isquèmia experimental *in vitro*. La barra gris indica el temps de recollida de les mostres després de la reoxigenació amb o sense rt-PA. DIV3-4: dia *in vitro* 3-4; POG: privació d'oxigen i glucosa; rt-PA: activador recombinant del plasminogen tissular (de l'anglès "recombinant tissue plasminogen activator"); LDH: lactat deshidrogenasa; MTT: nom del compost "3-(4,5-dimethylthiazol)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide"; TEER: resistència elèctrica transendotelial (de l'anglès "transendothelial electrical resistance"); FITC-BSA: compost format per el "fluorescein isothiocyanate" unit a albúmina sèrica bovina (BSA, de l'anglès "bovine serum albumin"); WB: "Western blot"; IF: immunofluorescència.

#### 4.1.4 Anàlisi de la viabilitat i de l'activitat metabòlica cel·lular

L'anàlisi de la viabilitat i l'activitat metabòlica cel·lular es va portar a terme mitjançant la determinació dels nivells de la lactat deshidrogenasa (LDH) i el compost "(3-(4,5-

dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide” conegut com a MTT (Sigma) respectivament.

#### *4.1.4.1 Assaig de LDH*

L'LDH és un enzim soluble present al citosol de la majoria de cèl·lules eucariotes que s'allibera al medi de cultiu quan la cèl·lula mor i es trenca la membrana plasmàtica. L'increment de l'activitat de l'LDH al sobrenedant del cultiu és proporcional al nombre de cèl·lules lisades i per tant és àmpliament utilitzat com a marcador de viabilitat cel·lular i citotoxicitat. En aquest treball es va utilitzar el kit de “CytoTox 96 non-radioactive cytotoxicity” (Promega, EE.UU.) el qual aprofita la capacitat de l'LDH per reduir el NAD<sup>+</sup> a NADH i la posterior reducció de la salt INT a un compost de color vermellós/porpra anomenat formazan. Finalment la intensitat del color es pot mesurar a una longitud d'ona de 490 nm amb un espectrofotòmetre quantificant així els nivells d'LDH alliberat. Breument, el protocol seguit va ser el següent:

Es van traspasar 120 µl/pou de sobrenedant com a mínim de 4 pous de cada condició experimental a una nova placa de 96 i es va centrifugar 4 min a 250 g. Seguidament, es van traspasar 50 µl/pou de sobrenedant, per duplicat, a una placa nova on posteriorment es van afegir 50 µl/pou del substrat subministrat pel kit i es va incubar 30 min a temperatura ambient protegint de la llum. Finalment, es van afegir 50 µl/pou de la solució “stop” subministrada per el kit i es va mesurar l'absorbància a 490 nm amb l'espectrofotòmetre “SpectraMax 340PC384 Microplate Reader” (Molecular Devices, EE.UU.).

Els resultats obtinguts es van normalitzar respecte els valors de LDH totals obtinguts mitjançant la lisi de totes les cèl·lules d'un pou de cada grup experimental, per així minimitzar les diferències en el nombre total de cèl·lules ocasionades per el tractament experimental. Els resultats es van expressar com a percentatge obtingut a partir dels valors del grup CTR.

#### *4.1.4.2 Assaig de MTT*

L'assaig amb MTT és un dels més utilitzats per mesurar l'activitat metabòlica cel·lular com a indicador de la viabilitat cel·lular, la proliferació i la citotoxicitat. Aquest assaig es basa en la reducció de la sal MTT, que inicialment presenta un to grogós, a cristalls de formazan, que

com s'ha comentat, són de color vermellós/porpra, mitjançant l'activitat metabòlica de les cèl·lules. Bàsicament, les cèl·lules contenen enzims oxidoreductors dependents de NAD(P)H els quals redueixen l'MTT a cristalls insolubles de formazan, que un cop dissolts, permeten la quantificació del color generat i per tant de l'activitat metabòlica cel·lular.

Per la determinació de l'activitat metabòlica amb MTT, el medi de cultiu es va substituir per 150 µl/pou de medi DMEM HG amb una concentració de MTT de 5 mg/ml. Després d'una incubació de 2 h a 37 °C es va aspirar el medi amb compte i es van afegir 110 µl/pou de DMSO per tal de dissoldre els cristalls de formazan formats. Finalment, es van traspasar 50 µl/pou, per duplicat, a una placa de 96 i com en el cas de LDH, es va mesurar l'absorbància mitjançant l'espectrofotòmetre "SpectraMax 340PC384 Microplate Reader" llegint a una longitud d'ona de 570 nm. Els resultats es van expressar com a percentatge obtingut a partir dels valors del grup CTR.

#### 4.1.5 Anàlisi de les permeabilitats iònica i transcel·lular

La permeabilitat de les cèl·lules bEnd.3 en els diferents grups experimentals es va avaluar mitjançant la mesura de la TEER com a indicador de la permeabilitat iònica, i del pas a través de la monocapa d'un compost format per la unió de l'albumina sèrica de vaca amb el "fluorescein isothiocyanate" conegut com FITC-BSA per mesurar la permeabilitat transcel·lular.

##### 4.1.5.1 TEER

La TEER es va mesurar utilitzant un aparell amb dos elèctrodes que s'introduïen simultàniament a l'interior i exterior de l'insert analitzant així la resistència de la monocapa (Epithelial Voltmeter, EVOM2, World Precision Instruments, EE.UU.). El valor de resistència del blanc, obtingut amb un insert sense cèl·lules, es va restar a la resta de valors i seguidament es van multiplicar per l'àrea de la membrana obtenint així els resultats en  $\text{cm}^2$ . Tret del testatge dels inserts de les diferents cases comercials on les dades es van expressar en  $\Omega \cdot \text{cm}^2$ , els resultats es van expressar com a percentatge obtingut a partir dels valors del grup CTR.

#### 4.1.5.2 FITC-BSA

Per l'anàlisi del pas de FITC-BSA a través de les cèl·lules, indicador de permeabilitat transcel·lular, es va seguir el protocol prèviament descrit (Niego et al., 2012). Breument, es van transferir els inserts a noves plaques que contenien 750 µl/pou de medi DMEM F12 (Gibco, EE.UU.) fresc sense FBS i es va substituir el medi del seu interior per 150 µl/pou de medi DMEM HG amb 0,35 mg/mL de FITC-BSA. Després de 1 h d'incubació, el medi de la part abluminal, és a dir el del pou de la placa, es va resuspendre i es van traspasar 200 µl/pou, per duplicat, a unes plaques optimitzades per a la lectura de fluorescència (Thermo Fisher Scientific, EE.UU.). A continuació, es va mesurar la fluorescència a 485 nm amb el Cytation™ 5 Cell Imaging Multi-Mode Reader (Biotek). Els canvis en la permeabilitat es van mesurar tenint en compte els valors dels inserts sense cèl·lules (blancs) amb els quals es va obtenir el valor màxim de permeabilitat, mitjançant la fórmula següent: permeabilitat (% vs màxim) = ((valor FITC dels inserts experimentals – mitjana de fluorescència del medi sol) / (valor FITC dels blancs – mitjana de fluorescència del medi sol)) x100. Els resultats es van expressar com a percentatge obtingut a partir del grup CTR.

#### 4.1.6 “Western blot”

Com s'ha comentat a l'apartat 1.7, aquesta tècnica és àmpliament utilitzada per identificar, quantificar i/o determinar el pes molecular de proteïnes específiques. Bàsicament, la tècnica de “Western blot” consisteix en primerament separar les proteïnes en un gel d'electroforesi en funció del seu pes molecular, i posteriorment transferir-les a una membrana per poder marcar-les mitjançant anticossos específics per les proteïnes d'interès.

##### 4.1.6.1 Extracció i quantificació de proteïna

Una vegada finalitzats els diferents períodes de reoxigenació (Figura 4.2), les plaques de cultiu es van posar sobre gel per reduir el metabolisme i evitar els canvis cel·lulars deguts al pas del temps i al canvi de condicions durant la recollida de les mostres. El procediment va ser el següent. Primerament, es van aspirar els medis de cultiu i les cèl·lules es van rentar amb 1 ml/placa de PBS fred. A continuació, es van afegir 150 µl/placa de tampó de lisi fred (Cell Signaling, The Netherlands) amb “phenylmethylsulfonyl fluoride” (PMSF, Sigma) (1%), un inhibidor de proteases, i es van recollir les cèl·lules utilitzant uns rascadors o “scrapers” que permetien desenganxar les cèl·lules de les plaques. Finalment, les cèl·lules es van lisar

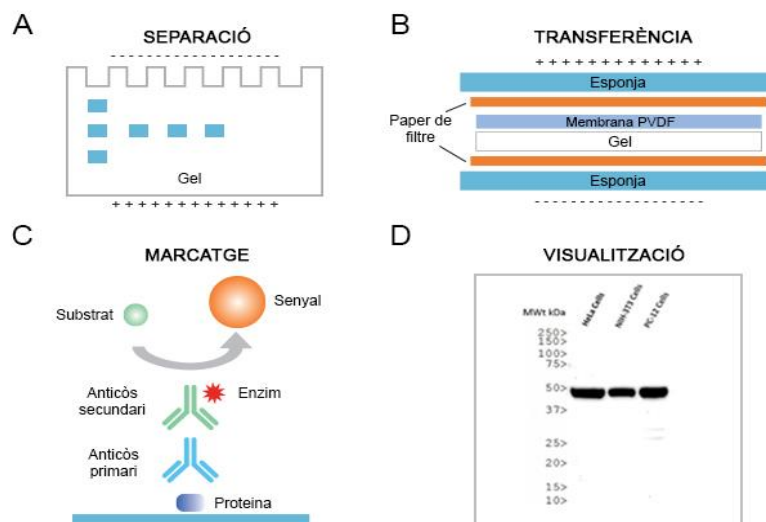
amb una xeringa fent-les passar unes 40 vegades per una agulla de 0,5 mm de diàmetre (calibre 21), es van centrifugar 10 min a 14.000 g a 4 °C per així eliminar les restes cel·lulars i es va quantificar el contingut proteic mitjançant un kit de BCA (Thermo Fisher Scientific, EE.UU.). Breument, el protocol de quantificació va ser el següent: es van carregar 10 µl/pou per duplicat, de cada mostra i dels estàndards de la recta patró, en una placa de 96. Seguidament, es van afegir 200 µl/pou d'una solució formada per dos reactius que subministrava el kit, es va agitar la placa uns 30 seg i es va posar a incubar a 37 °C i protegida de la llum durant 1 h. Finalment, es va mesurar l'absorbància a 562 nm i es va determinar la concentració de les diferents mostres interpolant els resultats a la recta patró.

#### *4.1.6.2 Procediment del "Western blot"*

Deu µg de cada mostra es van diluir en tampó de càrrega amb un 5% de β-mercaptoetanol i en aigua fins a un volum final de 30 µl. A continuació, es van incubar durant 5 min a 90 °C i es van carregar en un gel d'electroforesi "Criterion™ TGX Stain-Free™ PrecastGels" (Bio-Rad) el qual va córrer a 120 V durant 80-90 min, aconseguint la separació de les proteïnes en funció del seu pes molecular. Llavors aquestes es van transferir a una membrana de "polyvinylidene difluoride"(PVDF; EMD Millipore, USA) a 30 V i 4 °C durant 12 h. Després d'1 h de bloqueig amb 30 ml d'un tampó format per Tris, Tween-20 0,1% (TBST) i 5% BSA (EMD Millipore), les membranes es van incubar amb els anticossos primaris corresponents diluïts en 10 ml de TBST 3% BSA (Taula 4.2). Posteriorment, es van fer 3 rentats de 5 min amb aproximadament 30 ml de TBST per cada rentat i es van incubar les membranes amb els anticossos secundaris corresponents diluïts igualment en 10 ml de TBST 3% BSA (Taula 4.2). Finalment, després de 3 rentats més iguals que els anteriors, es van revelar les membranes amb el reactiu "Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate" (EMD Millipore) el qual reaccionava amb els anticossos secundaris generant una senyal lumínica, i es van quantificar les bandes obtingudes amb el programa Alpha Innotech (AlphaEaseFC™). Per tal de poder tornar a marcar les mateixes membranes amb altres anticossos i així detectar proteïnes diferents, es va portar a terme un procediment anomenat "Stripping" en la qual s'eliminaven els anticossos prèviament adherits. Bàsicament consistia en incubar les membranes en 30 ml de TBS amb 2% de SDS i 0,7% de β-mercaptoetanol a 50 °C durant 30 min, rentar-les amb TBST i tornar a fer tot el procés començant per el bloqueig de la membrana (Figura 4.3).

Taula 4.2| Anticossos utilitzats per “Western blot”.

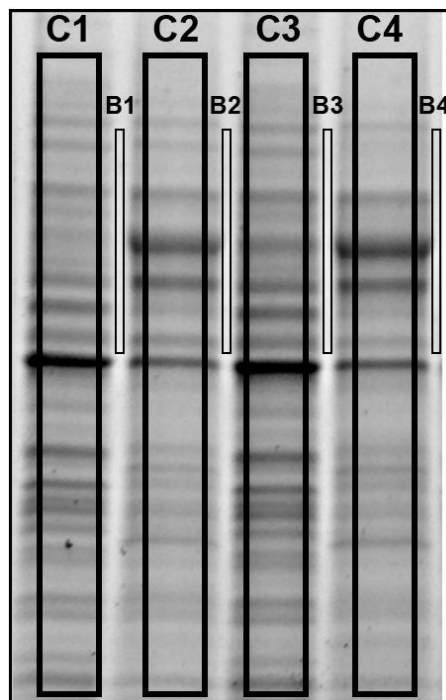
Nom i referència	Espècie hoste	Dilució	Incubació	Casa comercial
$\beta$ -Actina (sc-47778)	Ratolí	1:1000	1 h a 21 °C	Santa Cruz Biotechnology
$\alpha$ -Tubulina (sc-5286)	Ratolí	1:1000	1 h a 21 °C	Santa Cruz Biotechnology
GAPDH (MAB374)	Ratolí	1:20000	1 h a 21 °C	EMD Millipore
HPRT (sc-376938)	Ratolí	1:100	12 h a 4 °C	Santa Cruz Biotechnology
Claudina-5 (35-2500)	Ratolí	1:2000	12 h a 4 °C	Invitrogen
ZO-1 (61-7300)	Conill	1:1000	12 h a 4 °C	Invitrogen
Cav-1 (sc-894)	Conill	1:40000	1 h a 21 °C	Santa Cruz Biotechnology
pCav-1 (Tyr14)*	Conill	1:1000	12 h a 4 °C	Cell Signaling
2ari Ratolí (401215)	Cabra	1:10000	1 h a 21 °C	Calbiochem
2ari Conill (sc-2004)	Cabra	1:20000	1 h a 21 °C	Santa Cruz Biotechnology
2ari Conill (70745) *	Cabra	1:10000	1 h a 21 °C	Cell Signaling



**Figura 4.3| Representació esquemàtica de la tècnica “Western blot”.** A) Les proteïnes són separades mitjançant un gel de poliacrilamida i B) transferides a una membrana de PVDF. C) S’incuba la membrana amb un anticòs que reconeix específicament la proteïna diana seguit d’un segon anticòs específic per l’anticòs primari que porta conjugat un enzim, el qual reacciona amb el substrat produint una senyal lumínica D) que es pot capturar i quantificar amb un aparell de quimioluminescència. Adaptació de [www.novusbio.com/application/western-blotting](http://www.novusbio.com/application/western-blotting).

#### 4.1.6.3 Marcatge i quantificació de la proteïna total

Els gels “Criterion™ TGX Stain-Free™” van permetre, a més de separar les proteïnes, normalitzar els resultats obtinguts mitjançant la quantificació de la proteïna total carregada. Això va ser possible degut a que aquests gels porten incorporats uns compostos “trihalo” que quan interaccionen amb les proteïnes presents al gel generen una fluorescència fàcilment detectable. Finalitzada l’electroforesi, els gels es van posar a una placa transil·luminadora de l’aparell AlphaInnotech i es van exposar durant aproximadament 5 min a llum UV per tal d’activar la fluorescència. Seguidament, es va quantificar cada carril amb el mateix programa utilitzat per quantificar les bandes de “Western blot”, establint l’espai entre carrils com a “background” tal com havia descrit Aldridge GM et al. i com es mostra a la figura 4.4.



**Figura 4.4** | Imatge representativa de la quantificació de la proteïna total amb els gels “Criterion TGX Stain-Free™”. C1, 2, 3 i 4: carril 1, 2, 3 i 4 respectivament; B1, 2, 3 i 4: “background” del carril 1, 2, 3 i 4 respectivament.

#### 4.1.7 Immunocitofluorescència

Per tal d’estudiar la immunoreactivitat de la Claudina-5, la ZO-1 i la Cav-1 i determinar els seus nivells i localització cel·lular, les cèl·lules dels 4 grups experimentals es van rentar dues vegades amb 100 µl/pou de PBS i es van fixar amb 100 µl/pou d’una solució de PBS amb



3,7% de paraformaldehid (Sigma-Aldrich) durant 10 min. Seguidament, es van permeabilitzar amb 100 µl/pou de PBS més 0,25% de Tritó X-100 (Sigma-Aldrich) durant 10 min, es van fer 3 rentats de 5 min amb 100 µl/pou de PBS i es van bloquejar 30 min més amb 100 µl/pou de PBS amb 5% de BSA. A continuació, es van incubar amb els anticossos primaris corresponents (Taula 4.3) diluïts en 50 µl/pou de PBS amb 3% BSA. Després de fer 3 rentats de 5 min amb 100 µl/pou de PBS, les cèl·lules es van incubar en fosc amb els anticossos secundaris fluorescents corresponents (Taula 4.3) diluïts en 50 µl/pou de PBS amb 3% BSA. Un cop finalitzada la incubació, es van fer 3 rentats de 5 min amb 100 µl/pou també protegint la placa de la llum per no malmetre la fluorescència. Finalment es van marcar els nuclis amb DAPI (Invitrogen) durant 3 min aproximadament i es van capturar les imatges amb els diferents canals corresponents a les diferents fluorescències dels anticossos secundaris i del DAPI en el microscopi “BD Pathway 855 Bioimager System” (Becton–Dickinson Biosciences) seguint les especificacions del programa BD Attovision. Cal mencionar que les configuracions dels diferents canals van ser les mateixes en tot moment per així evitar errors en la interpretació de les dades. La quantificació de les intensitats es va realitzar amb el programa ImageJ 1.43 (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>; NIH, EE.UU.). En el cas de la claudina-5 i la ZO-1, es va quantificar la seva immunoreactivitat a la membrana plasmàtica i al citoplasma resseguint manualment els contorns amb el mateix ImageJ, i es van obtenir unes proporcions calculades cèl·lula a cèl·lula.

**Taula 4.3| Anticossos utilitzats per immunocitofluorescència.**

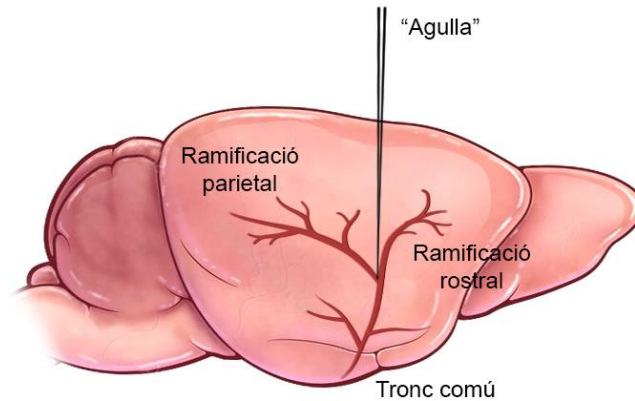
Nom i referència	Espècie hoste	Dilució	Incubació	Casa comercial
Claudina-5 (35-2500)	Ratolí	1:100	1 h a 21 °C	Invitrogen
ZO-1 (61-7300)	Conill	1:100	1 h a 21 °C	Invitrogen
Cav-1 (sc-894)	Conill	1:100	1 h a 21 °C	Santa Cruz Biotechnology
2ari Ratolí – 488	Cabra	1:200	1 h a 21 °C	Invitrogen
2ari Conill – 488	Cabra	1:200	1 h a 21 °C	Invitrogen

#### 4.2 Model d'isquèmia *in vivo* tromboembòlic *in situ* amb administració tardana d'rt-PA

Per tal d'estudiar l'efecte de l'rt-PA sobre els nivells sèric i tissulars de Cav-1 es va utilitzar un model tromboembòlic *in situ* amb administració tardana d'rt-PA (Cyrille et al., 2007; García-Yébenes et al., 2011). El model consisteix en la oclusió de l'ACM mitjançant una injecció de trombina, la qual promou la coagulació sanguínia, i la posterior recanalització utilitzant la capacitat trombolítica de l'rt-PA.

Els animals utilitzats en aquests experiments van ser ratolins mascles Swiss (Jackson Labs, Bar Harbor, Maine) i en tot moment es van seguir les indicacions del Comitè Ètic per l'Experimentació Animal de la Universidad Complutense de Madrid (UCM), que al mateix temps seguien les directrius de la Unió Europea 86/609/CEE i 2003/65/CE i el Reial Decret 1201/2005 sobre la protecció dels animals utilitzats per a l'experimentació.

Els protocols quirúrgics i l'obtenció de les mostres es van dur a terme tal com s'havien descrit prèviament (García-Yébenes et al., 2011). Breument, els ratolins van ser anestesiats en una cambra insuflada amb 2,5%, inicialment, i posteriorment amb 1,5-2% de isoflurà (IsoVet, Piramal Healthcare, Regne Unit) en una barreja de 30/70% d'O<sub>2</sub> i aire respectivament. La temperatura corporal va ser constantment controlada i mantinguda a 36,5-37 °C mitjançant l'ús d'una sonda rectal (HB 101/2, Harvard Apparatus, EE.UU) i d'una placa tèrmica. Per tal d'induir la oclusió de l'ACM es va injectar l' $\alpha$ -trombina de ratolí (2 UI) (Sigma-Aldrich, EE.UU.) directament a una ramificació de l'arteria, prèviament exposada, amb unes "agulles" elaborades a partir de capil·lars graduats (15 mm/ $\mu$ l) (Ref 555/5, Assistent Germany, Alemanya) als quals se'ls havia tallat la punta obtenint un diàmetre final de 50  $\mu$ m aproximadament (Figura 4.5). Aquesta mida era suficientment petita perquè el capil·lar penetrés causant els mínims danys possibles i suficientment gran per evitar la coagulació de la punta durant la injecció. L'"agulla" carregada es va introduir lentament a la llum del vas i es va injectar 1  $\mu$ l de trombina. Per tal de permetre l'estabilització del coàgul l'"agulla" es va retirar 10 min després de l'oclusió. El coàgul originat es va definir com a estable quan el flux mesurat per làser Doppler (418-1, Perimed AB, Suècia) mostrava una caiguda dràstica (reducció mitjana del 70 – 80%) que es mantenia constant durant 1 h.



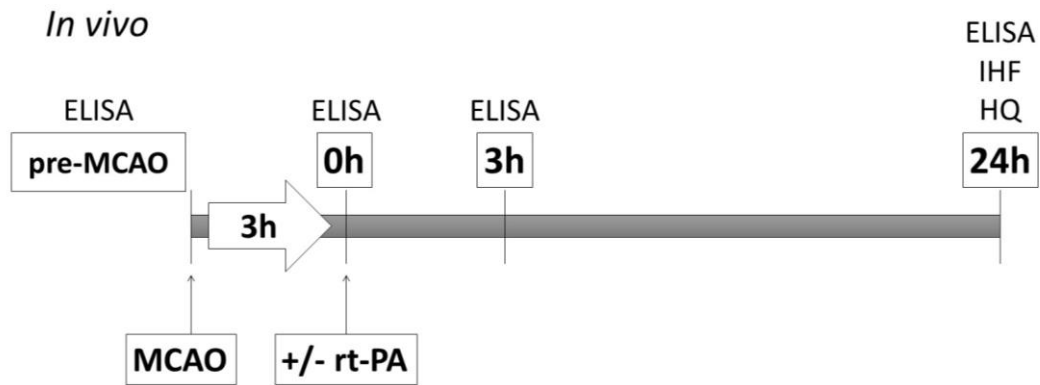
**Figura 4.5 | Imatge representativa de la injecció de trombina a l'arteria ACM.** L'"agulla" s'introdueix a la bifurcació de l'arteria i s'injecta la trombina, obstruint així el tronc comú.

Per a la reperfusió, l'rt-PA (10 mg/kg) (Actilyse, Boehringer Ingelheim, Alemanya) va ser administrat a través de la vena caudal a la base de la cua 3 h després de la injecció de trombina. Es va establir que la reperfusió era efectiva quan es restablia el flux sanguini (en un rang d'entre 60 i 100% del valors basals) i aquest restava estable durant la primera hora després de l'administració d'rt-PA, mesurat per làser Doppler. Els animals que van presentar una reperfusió espontània (sense rt-PA), hemorràgies extraparenquimals, o lesions a l'estriat es van excloure dels posteriors anàlisis. D'altra banda, no es va detectar mortalitat espontània deguda a l'MCAO ni a l'administració d'rt-PA.

#### 4.2.1 Grups experimentals i recollida de mostres *in vivo*

Un total de 32 animals van ser assignats de forma aleatòria als 3 grups experimentals següents: grup MCAO, en els quals l'ACM quedava permanentment obstruïda degut a la injecció *in situ* de trombina; grup MCAO + rt-PA, en els quals s'aconseguia la recanalització de l'arteria administrant rt-PA després de 3 h d'oclusió; i grup CTR on simplement s'exposava l'ACM quirúrgicament però no s'ocloïa.

De tots els animals d'aquests grups experimentals es van obtenir tant mostres sanguínies com de teixit per així determinar els nivells de Cav-1 i els paràmetres de dany (volum d'infart, volum hemorràgic i edema) i estudiar els possibles efectes de l'rt-PA (Figura 4.6).



**Figura 4.6| Disseny experimental *in vivo*.** Representació esquemàtica dels diferents anàlisis fets després de sotmetre els ratolins al model d'isquèmia tromboembòlic. La barra gris indica el temps de recollida de les mostres després de 3 h d'MCAO amb o sense administració d'rt-PA. MCAO: oclusió de l'arteria cerebral mitjana (de l'anglès "middle cerebral artery occlusion"); rt-PA: activador recombinant del plasminogen tissular (de l'anglès "recombinant tissue plasminogen activator"); ELISA: "enzyme-linked immunosorbent assay"; IHF: immunohistofluorescència; HQ: histoquímica.

#### 4.2.1.1 Obtenció de les mostres sanguínies

Amb l'objectiu d'elaborar un perfil temporal dels nivells sèrics de Cav-1, es va realitzar l'extracció de mostres sanguínies abans del procediment experimental i a diferents temps després de 3 h d'MCAO (Figura 4.6) per tal d'obtenir el sèrum i determinar els nivells proteics de Cav-1 mitjançant la tècnica d'ELISA (Veure apartat 4.2.2). Les mostres sanguínies es van extreure de la cua dels animals després d'anestesiar-los en els següent temps: abans de començar el procediment experimental ( $t = \text{pre-MCAO}$ ) i a les 0, 3 i 24 h després de l'MCAO (Figura 4.6). Una vegada extretes, les mostres es van deixar 1 h a temperatura ambient i unes 12 h més a 4 °C, permeten així la seva coagulació. A continuació, les mostres es van centrifugar a 1500 g a 4 °C durant 10 min, obtenint així el sèrum que va ser al·lquotat i conservat a -80 °C fins a la seva utilització.

#### 4.2.1.2 Obtenció de les mostres de teixit

Per tal de determinar els paràmetres de dany mitjançant tècniques histoquímiques i analitzar els nivells de Cav-1 mitjançant immunohistofluorescència (Veure apartat 4.2.3 i 4.2.4, respectivament), va ser necessari sacrificar els animals, rentar la sang intravascular per evitar la tinció de peroxidases endògenes i fixar el teixit amb paraformaldehid. Per fer-

ho, 24 h després de l'MCAO (Figura 4.6), els ratolins es van sacrificar i es van perfondre a través del cor amb PBS 0,1 M (pH 7,4) a un flux de 5 ml/min durant 5 min. A continuació es van passar uns 80 ml d'una solució de PBS freda amb 4% de paraformaldehid amb el mateix flux i, posteriorment, es van extreure els cervells i es van mantenir en PBS 4% paraformaldehid a 4 °C durant unes 12 h més per assegurar la seva fixació. Passat aquest temps, els cervells fixats es van passar a una solució de PBS amb 30% de sucrosa durant 2 dies fins que s'enfonsaven, el que indicava que estaven totalment saturats de sucrosa i deshidratats, un pas clau per criopreservar el teixit i reduir els danys deguts a la congelació. Finalment, els cervells es van congelar en isopentà i es van guardar a -80 °C fins a la seva utilització.

#### 4.2.2 ELISA

Amb l'objectiu de determinar la concentració sèrica de Cav-1 es va utilitzar la tècnica d'ELISA amb el kit específic (SEA214Mu, Cloud-Clone Corp., EE.UU.). Aquesta tècnica es basa en l'ús d'antígens o anticossos marcats amb un enzim obtenint així unes proteïnes conjugades amb activitat immunològica i enzimàtica. A part, és necessari que la proteïna d'interès o els anticossos es trobin adherides sobre una superfície immunoabsorbent per tal que la reacció antígen-anticòs quedi immobilitzada. D'aquesta manera es pot mesurar fàcilment la concentració de la proteïna analitzada ja que mitjançant la reacció entre l'enzim conjugat i el seu substrat, es produirà un color visible a simple vista i quantificable mitjançant l'ús d'un espectrofotòmetre.

L'anàlisi es va portar a terme seguint en tot moment les instruccions proporcionades per la casa comercial, treballant amb duplicats. Breument, es van preparar totes les solucions i es van carregar 100 µl/pou de les mostres i les dilucions per la recta patró. Després d'una incubació d'1 h a 37 °C, es van aspirar els pous, es va afegir 100 µl/pou de la solució anomenada "detection reagent A" subministrada per el kit i es va posar la placa a incubar 1 hora més a 37 °C. Seguidament es van realitzar 3 rentats de 350 µl/pou amb la solució de rentat i es van afegir 100 µl/pou de la solució "detection reagent B" subministrada per el kit. Després d'incubar la placa durant 30 min més a 37°C, es va rentar 5 vegades, es van afegir 90 µl/pou de la solució substrat i es va incubar la placa en fosc durant 20 min a 37 °C. Finalment, es van afegir 50 µl/pou de la solució "stop" i es va llegir la placa a 450 nm amb el

lector de plaques “SpectraMax 340PC384 Microplate Reader” i es van calcular les concentracions extrapolant amb una recta patró ajustada amb l’anàlisi “4-parameter logistic analysis”.

Les concentracions (ng/ml) obtingudes per cada una de les mostres es van dividir per els seus respectius valors pre-MCAO quedant representades com a percentatge per tal de reduir la variabilitat basal entre animals. El temps de 0 h post-MCAO es va anomenar “nivells basals” per així coincidir amb la nomenclatura clínica on els nivells basals són aquells que s’obtenen quan el pacient amb un ictus isquèmic arriba al servei d’urgències de l’hospital.

#### 4.2.3 Determinació dels paràmetres de dany

Per tal de quantificar els volums d’infart i d’hemorràgia i l’edema, es va utilitzar la tinció amb violeta de cresil, la qual marca els cossos de Nissl, i amb diaminobenzidina (DAB), permetent així la detecció dels eritròcits extravasats i per tant les zones hemorràgiques. Per poder realitzar les diferents determinacions els cervells fixats i criopreservats a -80 °C (Veure apartat 4.2.1.2) es van tallar en seccions de 15 µm (per volum d’infart, edema i immunohistofluorescència) i 30 µm (per volum d’hemorràgia) de gruix amb el criòstat (CM1950, Leica) a -23 °C. Es van obtenir un total de 21 seccions separades una de l’altra per 400 µm i des del bregma 3,2 mm fins al bregma -4,8 mm. Els talls es van muntar en portaobjectes SuperFrost/Plus (Menzel-Gläser, Braunschweig, Alemanya) i es van guardar de nou a -80 °C fins a la realització de cadascun dels protocols.

##### 4.2.3.1 Determinació del volum d’infart

Per l’anàlisi del volum d’infart es va utilitzar la tinció dels cossos de Nissl que es basa en la utilització d’un colorant acidòfil, el violeta de cresil, per tenyir el nucli, els nuclèols i el reticle endoplasmàtic rugós de les cèl·lules, proporcionant així, una panoràmica general de la distribució, mida i morfologia de les neurones, fet que permet identificar clarament el teixit infartat. El protocol es va realitzar tal com s’havia descrit prèviament (García-Yébenes et al., 2011). En primer lloc es van hidratar les seccions amb PBS, i seguidament es van incubar 1-2 min en una solució de violeta de cresil al 0,5% (Sigma-Aldrich, EE.UU.) i 1,5% d’àcid acètic. Posteriorment, es van deshidratar en una bateria d’alcohols amb una graduació creixent

(70%, 95% i 100%, 30 s cada un) i finalment, es van submergir en xilè durant 5 min. Finalment, els portaobjectes es van muntar amb medi de muntatge "Pertex" (Medite, EE.UU.) i es van col·locar sobre una plantilla mil·limetrada i es van fotografiar amb una càmera digital. Un cop obtingudes les imatges, es va utilitzar el programa ImageJ 1.43 (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>; NIH, EE.UU.) per mesurar les següents àrees de tots els talls: Àrea de l'hemisferi ipsilateral (Hipsi), àrea de l'hemisferi contralateral (Hcontra) i àrea infartada (Inf). Seguidament, es va corregir l'àrea infartada per l'índex d'edema, el qual es va obtenir dividint Hipsi per Hcontra, és a dir: Àrea infartada =  $\text{Inf}/(\text{Hipsi}/\text{Hcontra})$

Finalment, el càlcul del volum d'infart es va realitzar com la suma de les projeccions de les àrees Infartada sobre la distància d'un tall al següent i es va representar com a percentatge d'hemisferi infartat respecte a l'hemisferi sa.

#### *4.2.3.2 Determinació del volum d'hemorràgia*

Per l'anàlisi del volum d'hemorràgia es va utilitzar la tinció de les peroxidases endògenes, la qual marca els glòbul vermells per així mesurar l'àrea ocupada per els extravasats. Els glòbul vermells tenen un alt contingut de peroxidases, uns enzims que poden oxidar la DAB i generar un color marronós allà on són presents, fet que permet detectar directament els glòbul vermells i per tant la TH. Aquesta tinció es va portar a terme tal com s'havia descrit prèviament (García-Yébenes et al., 2011). Breument, es van hidratar 21 seccions coronals en PBS i es van incubar durant 20 min amb una solució de DAB preparada segons les indicacions proporcionades per el kit (peroxidase substrate kit, Vector Laboratories, EE.UU.). Seguidament, es van rentar amb PBS, es van deshidratar en una bateria d'alcohols amb una graduació creixent (70%, 95% i 100%, 30 s cada un) i finalment, es van submergir en xilè durant 5 min i es van muntar tal com s'ha descrit a la secció anterior.

Per la quantificació es va portar a terme un mètode estereològic que estimava el volum ocupat per glòbul vermells extravasats. Això es va realitzar amb un microscopi Olympus BX51 (Olympus, EE.UU.) amb un objectiu 10X, una videocàmera DP-70 (Olympus, EE.UU.) i utilitzant el programa Cast Grid (Visiopharm, Dinamarca). El volum d'hemorràgia es va calcular mitjançant el principi de Cavalieri, basat en el recompte de punts associats a una àrea que es localitzen a l'estructura que es vol quantificar, en aquest cas, les hemorràgies. El volum hemorràgic es va calcular amb la fórmula següent:  $\text{Volum} = a(p) \cdot d \cdot \Sigma P$

On,  $a(p)$  representa l'àrea associada al punt,  $d$  la distància entre dos seccions consecutives, i  $\Sigma P$  el sumatori dels punts.

#### 4.2.3.3 *Determinació de l'edema cerebral*

Com a mesura de l'edema es va utilitzar el percentatge d'augment del volum de l'hemisferi ipsilateral després del dany. Per fer-ho es va aplicar la següent fórmula aprofitant les dades obtingudes dels mateixos talls tenyits amb el violeta de cresil (Veure apartat 4.2.3.1):

Índex d'Edema:  $H_{ipsi}/H_{contra}$

#### 4.2.4 Immunohistofluorescència

Amb l'objectiu d'analitzar els efectes de la isquèmia i el tractament amb rt-PA sobre els nivells de Cav-1 es va portar a terme un assaig d'immunohistofluorescència en el qual es va marcar aquesta proteïna a les seccions de 15  $\mu\text{m}$  obtingudes prèviament (Veure apartat 4.2.3), així com també un marcatge de les IgG extravasades com a marcador de la zona isquèmica. Després de descongelar les seccions i deixar-les assecar a 37 °C durant 30 min, aquestes es van permeabilitzar amb TBS 0,5% de Tritó X-100 durant 10 min i seguidament es van bloquejar 30 min més amb TBST (TBS 0,1% Tritó X-100) 1% BSA. A continuació, les seccions es van incubar amb 500  $\mu\text{l}$ /portaobjectes (o un volum suficient per cobrir els talls) dels anticossos corresponents (Taula 4.4) diluïts en TBST 1% BSA en una cambra humida per tal d'evitar l'evaporació de la solució amb l'anticòs. Finalitzada la incubació, es van realitzar 3 rentats de 5 min amb TBST a tots els portaobjectes i es van incubar amb els anticossos secundaris fluorescents corresponents (Taula 4.4), diluïts igualment en TBST 1% BSA. A partir d'aquest moment totes les incubacions i rentats es van realitzar protegint les mostres de la llum per tal de no malmetre la fluorescència dels anticossos. Finalment, es van repetir els 3 rentats de 5 min amb TBST per eliminar l'excés d'anticòs, es va portar a terme un marcatge dels nuclis amb DAPI durant 3 min i després d'un rentat amb aigua es van muntar els portaobjectes amb medi de muntatge "Dako fluorescent mounting medium" (Dako North America Inc., EE.UU.) que optimitza la visualització la fluorescència al microscopi. Per tal de verificar que el marcatge observat no era inespecífic es van realitzar marcatges en paral·lel amb seccions que no contenien algun dels anticossos primaris o secundaris i es va determinar que el marcatge observat era específic de Cav-1 o de les IgG extravasades.



**Taula 4.4| Anticossos utilitzats per immunohistofluorescència.**

Nom i referència	Espècie hoste	Dilució	Incubació	Casa comercial
Cav-1 (sc-894)	Conill	1:200	3 h a 21 °C	Santa Cruz Biotechnology
2ari Conill – 488	Cabra	1:750	1 h a 21 °C	Invitrogen
2ari Ratolí – 594	Cabra	1:100	1 h a 21 °C	Invitrogen

Les imatges del marcatge es van obtenir amb una càmera Olympus DP70 digital camera (Japan) acoblada a un microscopi BX41 Olympus. L'anàlisi de les imatges es va portar a terme amb el programa ImageJ que permetia delimitar les zones amb marcatge i mesurar la seva intensitat. Finalment, els resultats es van normalitzar respecte els valors dels ratolins CTR.

#### 4.3 Anàlisi estadístic

Els resultats es van expressar com mitjana +/- desviació estàndard obtinguda a partir d'un mínim de 3 experiments independents (indicat als peus de figura).

L'anàlisi estadístic es va realitzar amb el programa SPSS (IBM SPSS Statistics 22). En primer lloc, es va determinar la normalitat i homogeneïtat de variància de les dades amb les proves de Shapiro-Wilk i Levene, respectivament, i es va procedir amb els testos corresponents. Per comparar els nivells de les proteïnes *in vitro* es va utilitzar el test de T-Student corregint la p obtinguda per el nombre de comparacions realitzades, és a dir:  $p \text{ ajustada} = 1 - (1 - p)^c$  on "p" és la significació obtinguda amb el test T-Student, i la "c" representa el nombre de comparacions entre grups. En el cas dels anàlisis d'immunofluorescència, els resultats es van comparar amb una Anova d'un factor seguida d'un anàlisi post-hoc de Bonferroni quan era necessari. Pel que fa a la significació dels nivells sèrics de Cav-1, es va realitzar un anàlisi de model lineal mix el qual tenia en compte dos factors, el Grup (CTR, MCAO i MCAO + rt-PA) i el Temps (0, 3 i 24 h post-tractament). Per comprovar les associacions es va utilitzar el rang de correlació Spearman ja que tot i tenir variables que complien amb la normalitat, la *n* era baixa. El nivell  $\alpha$  es va establir a 0,05 per a tots els anàlisis.

## 5. RESULTATS

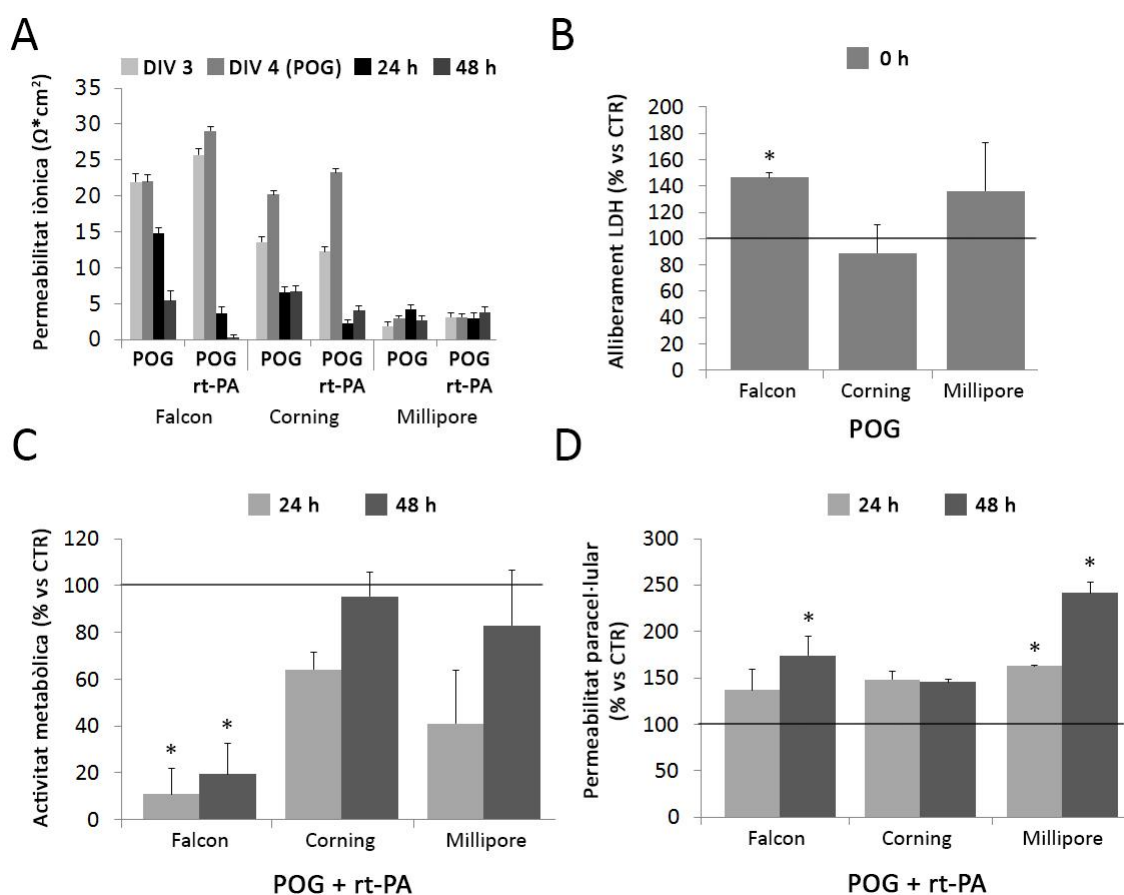
## 5.1 Anàlisi de l'efecte a llarg termini de l'rt-PA en un model *in vitro* de BHE i avaluació de proteïnes constitutives per la normalització de la tècnica de "Western blot"

Per tal d'establir les condicions òptimes de cultiu de la línia cel·lular bEnd.3 es van sembrar  $1,7 \times 10^4$  cèl·lules a la part luminal d'inserts de diferents cases comercials (Falcon, Corning i Millipore), es van cultivar durant 4 dies i es van sotmetre a 2,5 h de POG. Com es pot observar a la figura 5.1, les cèl·lules sembrades en els inserts Falcon van presentar nivells de TEER superiors als obtinguts amb els inserts Corning i Millipore. En el cas dels inserts Millipore, es van obtenir uns valors de TEER molt inferiors als obtinguts amb els altres inserts en els dies DIV3 i 4, on encara no s'havia sotmès les cèl·lules a POG (Fig 5.1 A). Així mateix, es va observar un increment dels nivells d'LDH al medi ( $p=0,002$  vs CTR) just al finalitzar les 2,5 h de POG i una disminució de l'activitat metabòlica després de 24 i 48 h de reoxigenació amb rt-PA ( $p<0,001$  vs CTR i  $p=0,003$  vs CTR, respectivament), en aquests mateixos inserts (Figura 5.1 B i C). D'altra banda, es va detectar un increment significatiu de la permeabilitat transcel·lular a les 48 h de reoxigenació amb rt-PA ( $p=0,037$  vs CTR) quan els inserts utilitzats eren Falcon, i a les 24 i 48 h ( $p<0,001$  vs CTR en els dos temps) quan eren Millipore, tot i que cal destacar, que en aquest últim cas les cèl·lules es van desadherir de la membrana causant l'increment de la permeabilitat observat (Figura 5.1 D). Davant d'aquests resultats, es van seleccionar els inserts de la casa comercial Falcon ja que les cèl·lules van formar millors monocapes (valors de TEER més elevats) i el tractament amb rt-PA en condicions isquèmiques va afectar la viabilitat i l'activitat cel·lular i la permeabilitat transcel·lular, requisit essencial per l'optimització del model.

### 5.1.1 Efecte de la POG i del tractament amb rt-PA sobre la viabilitat cel·lular i l'activitat metabòlica de les cèl·lules bEnd.3

Un cop establertes les condicions de cultiu, es va procedir amb l'anàlisi dels paràmetres de viabilitat, activitat metabòlica i permeabilitat de les cèl·lules bEnd.3 en condicions isquèmiques. L'exposició dels cultius a 2,5 h de POG va provocar un increment significatiu dels nivells d'LDH al medi fins a les 24 h post-reoxigenació, reflectint una disminució de la viabilitat cel·lular (0 i 24 h  $p<0,001$  vs CTR). Quan les cèl·lules sotmeses a POG es van tractar amb rt-PA durant la reoxigenació, aquest increment d'LDH es va mantenir significatiu de les

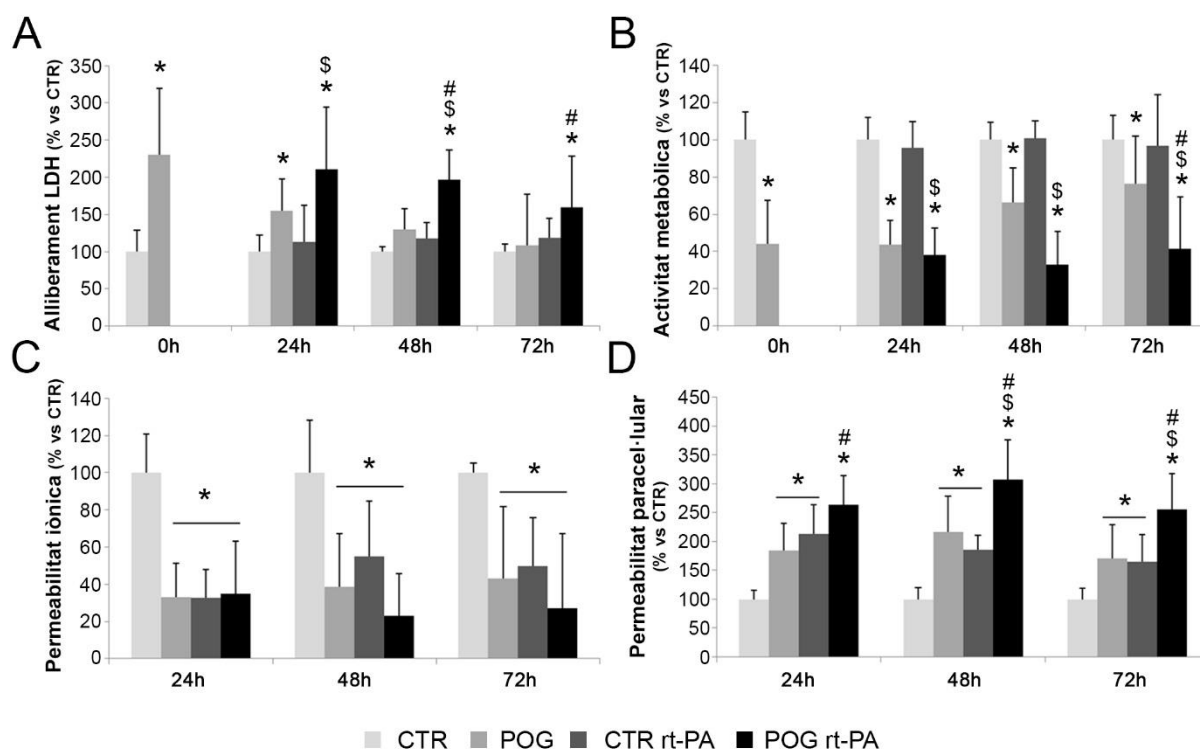
48 a les 72 h en comparació amb la condició POG (48 h  $p=0,035$ ; 72 h  $p=0,012$ ) i de les 24 a les 48 h en comparació amb el grup CTR + rt-PA (24 h  $p=0,003$ ; 48 h  $p=0,013$ ) (Figura 5.2 A). L'activitat metabòlica de les cèl·lules bEnd.3 va disminuir significativament des de les 0 fins a les 72 h post-reoxigenació (0 i 24 h  $p<0,001$ ; 48 h  $p=0,023$ ; 72 h  $p=0,014$ ) i l'administració d'rt-PA la va reduir de forma significativa en comparació amb el grup POG a les 72 h ( $p=0,005$ ) (Figura 5.2 B). L'administració d'rt-PA en condicions CTR no va afectar significativament a cap de les dues variables (Figura 5.2 A i B).



**Figura 5.1| Optimització del cultiu de bEnd.3.** Efecte de 2,5 h de POG i/o tractament amb rt-PA sobre les cèl·lules bEnd.3 sembrades en inserts de diferents cases comercials (Falcon, Corning i Millipore). (A) Anàlisi de la resistència iònica (TEER) al dia *in vitro* 3, 4 (DIV3, 4) i després de 24 i 48 h de reoxigenació. (B) Anàlisi de la viabilitat cel·lular (LDH) després de la POG. (C) Determinació de l'activitat metabòlica (MTT) i de (D) la permeabilitat transcel·lular després de la POG i 24 o 48 h de reoxigenació amb rt-PA. Les línies situades a 100 representen el valor de la condició CTR. Les dades representen la mitjana  $\pm$  la desviació estàndard de 3 experiments independents; \* $p<0,05$  vs CTR.

### 5.1.2 Efecte de la POG i del tractament amb rt-PA sobre la permeabilitat iònica i transcel·lular de les cèl·lules bEnd.3

La POG combinada amb el tractament amb rt-PA van afectar tant la permeabilitat iònica (TEER) com la transcel·lular (FITC-BSA) (Figura 5.2 C i D). D'una banda, les cèl·lules sotmeses a POG van patir una disminució significativa de la TEER des de les 24 fins a les 72 h de reoxigenació en comparació amb el grup CTR (24 h  $p < 0,001$ ; 48 h  $p < 0,001$ ; 72 h  $p = 0,023$ ). L'administració d'rt-PA en condicions CTR també va reduir significativament la TEER en comparació amb el grup CTR fins a les 72 h analitzades (24 h  $p < 0,001$ ; 48 h  $p = 0,008$ ; 72 h  $p = 0,027$ ). No obstant, no es van observar diferències significatives entre els grups POG i POG + rt-PA (Figura 5.2 C). D'altra banda, tant la POG com el tractament amb rt-PA van incrementar significativament la permeabilitat transcel·lular de les monocapes de cèl·lules bEnd.3 de les 24 a les 72 h post-reoxigenació (POG a 24 h  $p < 0,001$ , a 48 h  $p = 0,003$ ; a 72 h  $p = 0,003$ ; CTR + rt-PA a 24 h  $p < 0,001$ ; a 48 h  $p = 0,037$ ; a 72 h  $p < 0,001$ ). Tot i això, l'increment de la permeabilitat transcel·lular va ser significativament superior en el grup POG + rt-PA a les 48 i 72 h post-reoxigenació en comparació amb el grup CTR + rt-PA (48 h  $p = 0,002$ ; 72 h  $p < 0,001$ ), i de les 24 a les 72 h en comparació amb el grup POG (48 h  $p = 0,002$ ; 72 h  $p < 0,001$ ) (Figura 5.2 D).

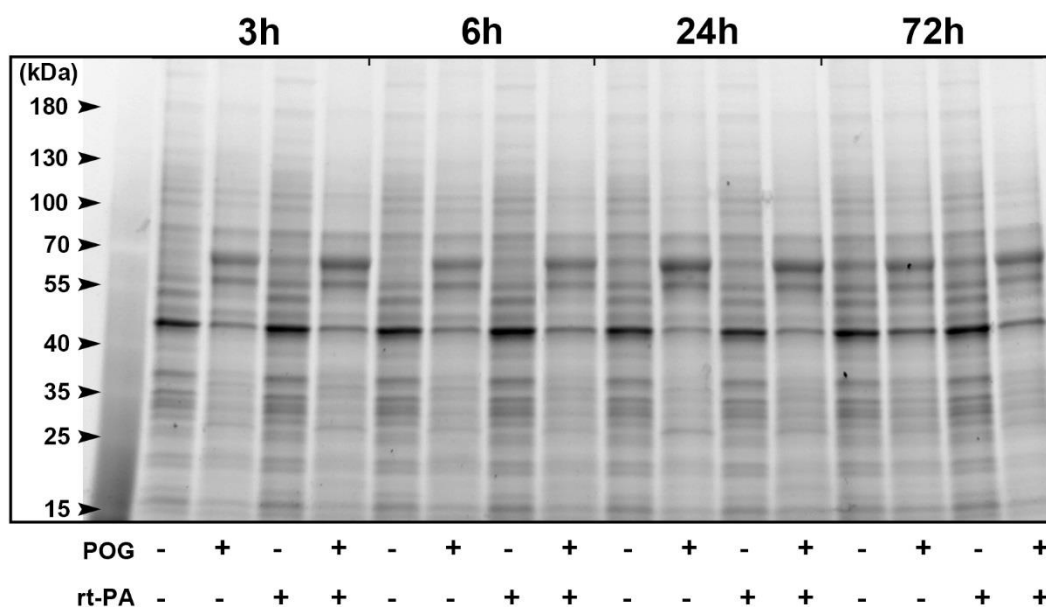


**Figura 5.2 | Efecte de 2,5 h de POG i/o tractament amb rt-PA sobre les cèl·lules bEnd.3.** L'anàlisi de (A) l'alliberament d'LDH i (B) de l'activitat metabòlica es va realitzar a les 0, 24, 48 i 72 h de reoxigenació, mentre que la determinació de la permeabilitat (C) iònica (TEER) i (D) transcel·lular (FITC-BSA) es va dur a terme a les 24, 48 i 72 h de reoxigenació. Les dades representen la mitjana  $\pm$  la desviació estàndard de 3-5 experiments independents; \* $p < 0,05$  vs CTR; \$  $p < 0,05$  vs CTR + rt-PA; #  $p < 0,05$  vs POG.

### 5.1.3 Efecte de la POG i del tractament amb rt-PA sobre els nivells de les proteïnes potencialment constitutives $\beta$ -Actina, $\alpha$ -Tubulina, GAPDH i HPRT en les cèl·lules bEnd.3

Abans de procedir amb l'anàlisi dels nivells de les proteïnes Claudina-5 i ZO-1, es van avaluar les proteïnes constitutives  $\beta$ -Actina,  $\alpha$ -Tubulina, GAPDH i HPRT per tal de valorar quina d'elles era la més estable en les nostres condicions experimentals i utilitzar-la per normalitzar els resultats de "Western blot". Per corregir les possibles diferències entre carrils es va utilitzar el marcatge de la proteïna total amb la tecnologia "stain-free" (Veure apartat 4.1.6.1)

Com es pot observar a la figura 5.3, el marcatge de la proteïna total obtinguda a partir de les cèl·lules bEnd.3 va mostrar diferents perfils proteics deguts al procés de POG i la subseqüent reoxigenació. Les diferències més remarcables es van observar entre les 3 i les 24 h post-reoxigenació mentre que a les 72 h els perfils dels grups CTR i POG van ser més similars. Pel que fa al tractament amb rt-PA, les possibles diferències entre els grups es trobaven molt més atenuades i no es van detectar a simple vista.

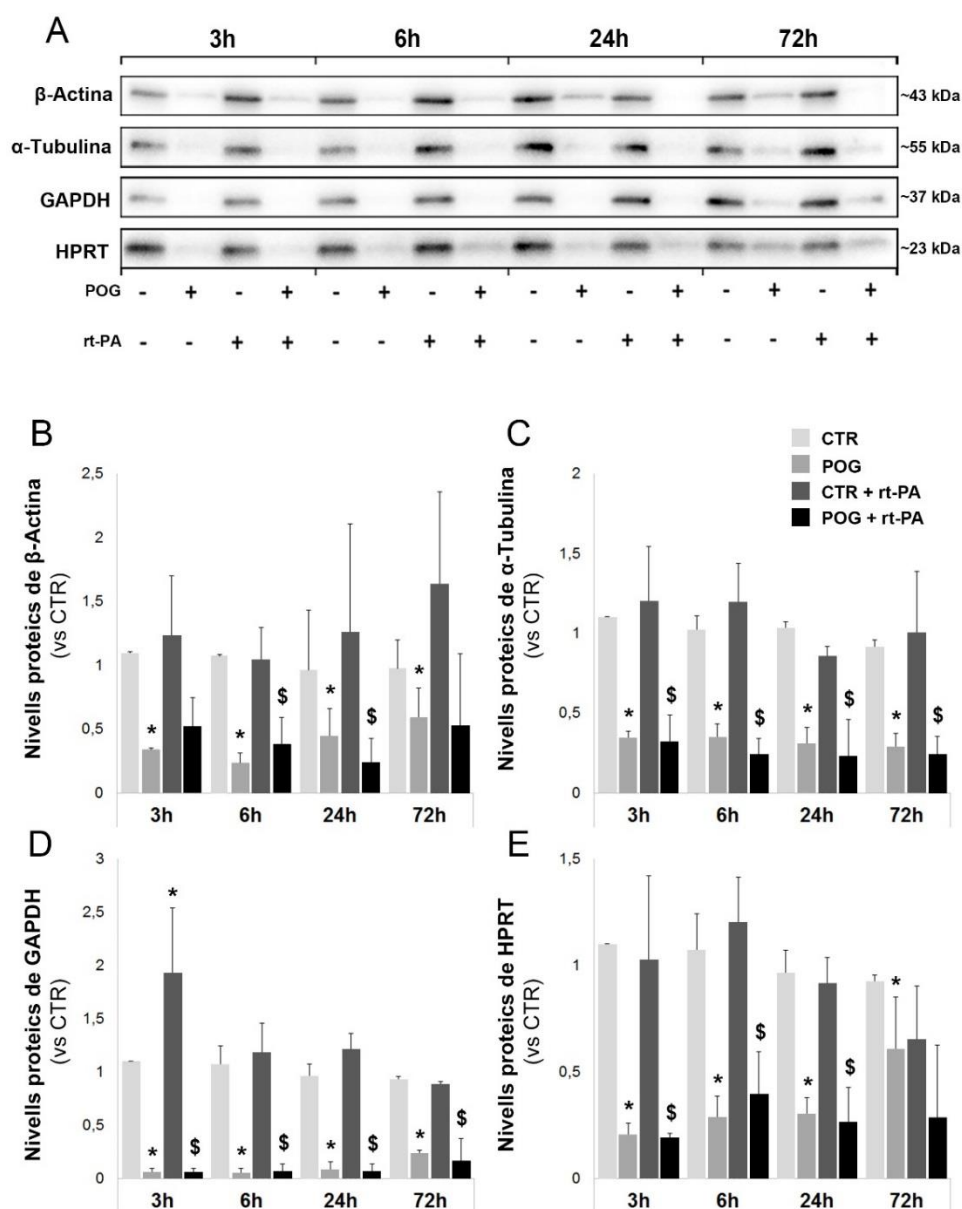


**Figura 5.3 | Imatge representativa de la proteïna total visualitzada amb la tecnologia "Stain-Free".**

Després de sotmetre les cèl·lules bEnd.3 a 2,5 h de POG i la subseqüent reoxigenació amb o sense rt-PA, es van carregar 10 µg de lisat cel·lular a cada carril. Les bandes de proteïna eren visibles ja que un compost "trihalo" present al gel generava una fluorescència fàcilment detectable.

Després de 2,5 h de POG i 3, 6, 24 i 72 h de reoxigenació, els nivells de  $\beta$ -Actina,  $\alpha$ -Tubulina, GAPDH i HPRT de les cèl·lules bEnd.3 van disminuir significativament en comparació amb els nivells de la condició CTR ( $\beta$ -Actina: 3 h  $p=0,05$ , 6 h  $p=0,05$ , 24 h  $p=0,05$ , 24 h  $p=0,034$ ;  $\alpha$ -Tubulina: 3 h  $p=0,05$ , 6 h  $p=0,05$ , 24 h  $p=0,043$ , 24 h  $p=0,021$ ; GAPDH: 3 h  $p=0,05$ , 6 h  $p=0,05$ , 24 h  $p=0,05$ , 24 h  $p=0,05$ ; HPRT: 3 h  $p=0,05$ , 6 h  $p=0,05$ , 24 h  $p=0,05$ , 24 h  $p=0,05$ ) (Figura 5.4). D'altra banda, el tractament amb rt-PA no va provocar diferències significatives en els nivells de  $\beta$ -Actina,  $\alpha$ -Tubulina i HPRT ni en la condició CTR ni en la POG a cap dels temps post-reoxigenació analitzats (Figura 5.4 B, C i E). En canvi, els nivells de GAPDH van

augmentar significativament amb l'addició de l'rt-PA en condicions CTR a les 3 h de reoxigenació ( $p=0,05$  vs CTR) (Figura 5.4 D).

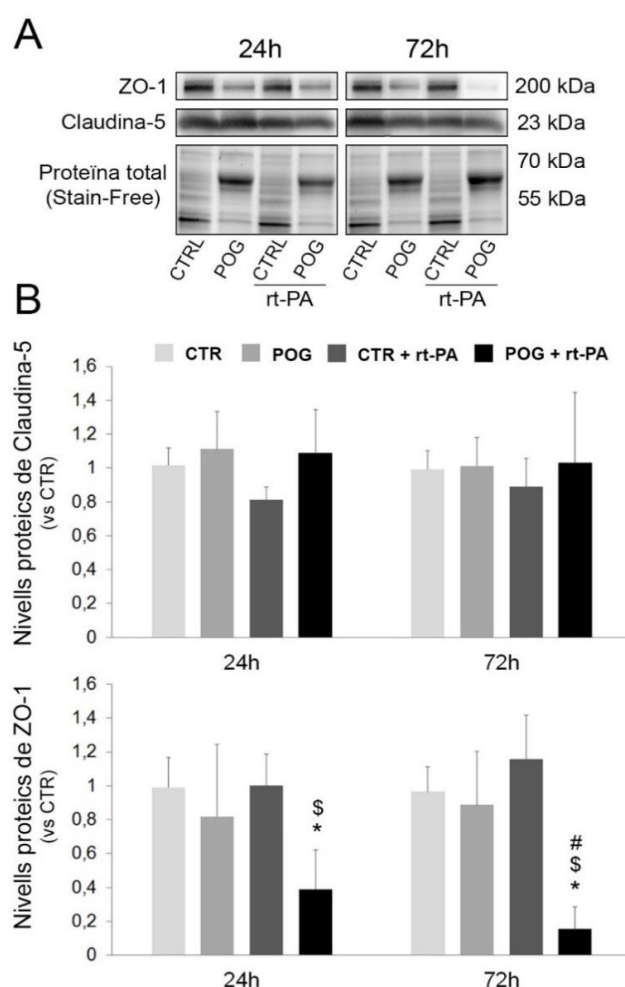


**Figura 5.4 | Nivells proteics de  $\beta$ -Actina,  $\alpha$ -Tubulina, GAPDH i HPRT en les cèl·lules bEnd.3 després de 2,5 h de POG i/o tractament amb rt-PA.** (A) Els extractes cel·lulars de les 4 condicions experimentals estudiades es van analitzar per "Western blot" obtenint els nivells de (B)  $\beta$ -Actina, (C)  $\alpha$ -Tubulina, (D) GAPDH i (E) HPRT a les 3, 6, 24 i 72 h post-reoxigenació. Posteriorment es van quantificar les bandes i es van normalitzar els resultats mitjançant el marcatge de la proteïna total. Les dades representen la mitjana  $\pm$  la desviació estàndard de 3-4 experiments independents. \* $p<0,05$  vs CTR; \$ $p<0,05$  vs CTR + rt-PA; # $p<0,05$  vs POG.



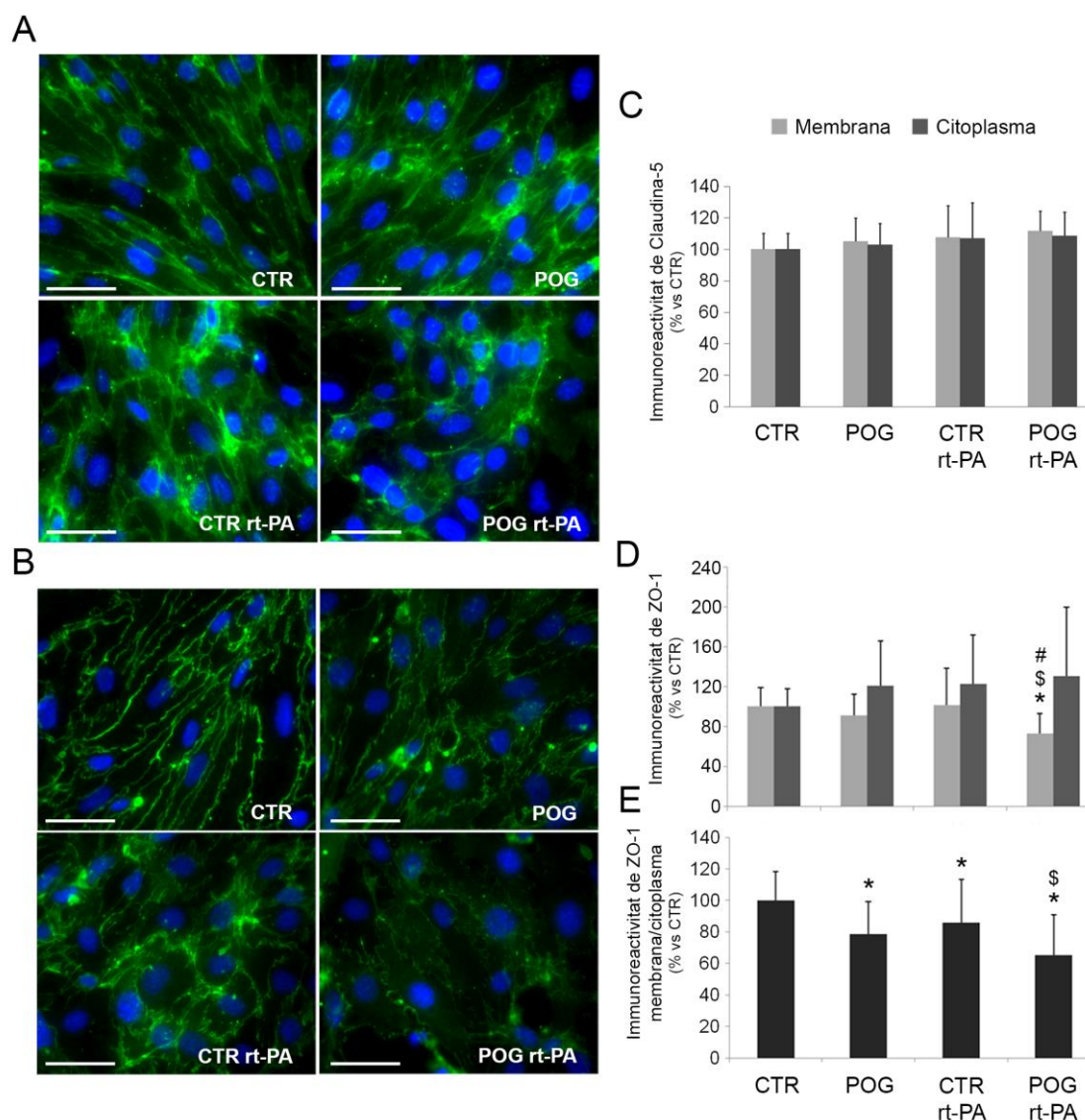
### 5.1.4 Efecte de la POG i del tractament amb rt-PA sobre els nivells de les proteïnes Claudina-5 i ZO-1 en les cèl·lules bEnd.3

Els nivells de Claudina-5 no es van veure alterats ni per la POG ni per la presència d'rt-PA a cap dels temps analitzats durant la reoxigenació, com tampoc ho van estar els nivells de ZO-1 24 i 72 h després de la POG en les cèl·lules bEnd.3. No obstant, a les 24 h post-reoxigenació es va detectar una tendència d'aquesta proteïna a disminuir quan les cèl·lules sotmeses a POG també eren tractades amb rt-PA ( $p=0,154$  vs CTR +rt-PA) arribant a ser una disminució significativa a les 72 h ( $p=0,012$  vs CTR + rt-PA;  $p=0,041$  vs POG) (Figura 5.5).



**Figura 5.5| Efecte de 2,5 h de POG i/o tractament amb rt-PA sobre els nivells de les proteïnes Claudina-5 i ZO-1 en les cèl·lules bEnd.3.** (A) Imatge representativa de les bandes de ZO-1 i Claudina-5 obtingudes per “Western blot” després de 24 i 72 h de reoxigenació. (B) Quantificació dels nivells de Claudina-5 i ZO-1 de les 4 condicions experimentals estudiades, normalitzats amb els nivells de proteïna total. Les dades representen la mitjana ± la desviació estàndard de 3-4 experiments independents. \* $p<0,05$  vs CTR; \$ $p<0,05$  vs CTR + rt-PA; # $p<0,05$  vs POG.

En l'anàlisi d'immunofluorescència dut a terme a les 72 h post-reoxigenació no es van detectar canvis significatius ni en els nivells ni en la distribució de Claudina-5 després de la POG i/o tractament amb rt-PA (Figura 5.6 A-B). En canvi, l'expressió de ZO-1 sí que va disminuir significativament a la membrana plasmàtica de les cèl·lules sotmeses a POG i tractades amb rt-PA després de 72 h de reoxigenació ( $p=0,08$  vs CTR +rt-PA;  $p=0,018$  vs POG). A més, es va observar una tendència d'aquesta proteïna a incrementar al citoplasma de les cèl·lules dels grups CTR + rt-PA, POG i POG + rt-PA (Figura 5.6 C-D) i es va detectar una disminució significativa de la proporció entre el marcatge d'aquesta proteïna a la membrana i al citoplasma a tots els grups experimentals en comparació amb el CTR (POG  $p<0,001$ ; CTR +rt-PA  $p=0,01$ ; POG +rt-PA  $p<0,001$ ) (Figura 5.6 E).



**Figura 5.6| Anàlisi d'immunofluorescència de Claudina-5 i ZO-1 a les 72 h de reoxigenació en les cèl·lules bEnd.3.** (A-B) Imatges representatives de la immunoreactivitat de la Claudina-5 i de la ZO-1 (verd) en les 4 condicions estudiades. Es va utilitzar DAPI per marcar els nuclis cel·lulars (blau). (C-D) Els nivells de la membrana i els citoplasmàtics de les dues proteïnes es van quantificar per separat. (E) Proporció entre els nivells de ZO-1 de la membrana i els citoplasmàtics. Escala: 20 µm; \*p<0,05 vs CTR; \$p<0,05 vs CTR + rt-PA; #p<0,05 vs POG.

5.2 Anàlisi dels nivells de Cav-1 en condicions d'isquèmia i tractament amb rt-PA en un model *in vitro* de BHE i en un model *in vivo* tromboembòlic

SUBMITTED PAPER. EMBARGO UNTIL PUBLICATION DATE

## 6. DISCUSSIÓ

L'rt-PA és l'únic fàrmac aprovat per al tractament de l'ictus isquèmic tot i la petita finestra terapèutica per aplicar el tractament, deguda al risc de TH associat al fàrmac, motiu per el qual només s'aplica a <5-7% dels pacients (Fredriksson et al., 2017). Tal com s'ha comentat, l'rt-PA pot afectar a la integritat de la BHE a través de diversos mecanismes com per exemple induint l'estrès oxidatiu i les MMPs (Suzuki et al., 2016) però tot i l'àmplia bibliografia descrita sobre aquests processos, els mecanismes moleculars implicats encara no es coneixen en detall. En aquest sentit, s'ha descrit que les UEs són les principals responsables de la integritat estructural de la BHE i diversos estudis han demostrat que la seva alteració contribueix a una pèrdua de funcionalitat de la BHE i al consegüent increment de la permeabilitat (Sandoval and Witt, 2008). Així mateix, la Cav-1, una de les principals proteïnes reguladores de la transcitosi, s'ha vist involucrada en l'efecte de la isquèmia i l'rt-PA sobre la BHE tot i que el seu paper en el procés és poc conegut i en alguns casos controvertit (Xu et al., 2015).

En aquesta tesi s'ha posat apunt un model *in vitro* de BHE per tal d'analitzar els efectes a llarg termini de l'rt-PA en condicions de POG sobre variables fisiològiques com la viabilitat cel·lular i la permeabilitat, i sobre les proteïnes d'UEs ZO-1 i Claudina-5. Per l'anàlisi dels canvis en els nivells de les proteïnes comentades, s'ha utilitzat la tècnica de "Western blot", una tècnica àmpliament utilitzada que requereix una normalització per tal de corregir les diferències experimentals com variacions en la concentració de les mostres o errors durant la càrrega del gel, i validar els resultats. Per aquest motiu, s'ha realitzat un testatge previ d'algunes de les proteïnes constitutives més utilitzades ( $\beta$ -Actina,  $\alpha$ -Tubulina, GAPDH i HPRT) en les nostres condicions experimentals i degut a que els seus nivells proteics han resultat no ser constants, s'ha utilitzat la proteïna total carregada com a mètode de normalització. Finalment, s'han analitzat els nivells de Cav-1 en un model *in vitro* de BHE en condicions isquèmiques i administració tardana d'rt-PA amb l'objectiu d'avaluar l'efecte a llarg termini de l'administració del fàrmac en condicions d'isquèmia sobre aquesta proteïna. Així mateix s'ha utilitzat un model murí *in vivo* d'isquèmia tromboembòlic *in situ* amb administració tardana d'rt-PA amb l'objectiu d'analitzar els efectes de l'administració d'rt-PA en condicions d'isquèmia sobre els nivells sèrics i tissulars de la Cav-1 i així aportar més informació sobre la possible interacció entre aquestes dues proteïnes en condicions isquèmiques.

### 6.1 Model de BHE *in vitro*: efecte a llarg termini de l'rt-PA i controls endògens per la normalització de "Western blot"

L'ictus isquèmic es pot considerar una condició patològica simple i ben definida basada en la interrupció del flux sanguini i el consegüent dany als teixits afectats. Alhora però, aquesta patologia també esdevé enormement complexa i heterogènia degut a la multitud de variables que influeixen durant el procés com la duració i la gravetat de la isquèmia, la presència o absència de flux colateral, l'estat de la pressió sanguínia, l'edat, el sexe, entre moltes d'altres (Sommer, 2017). René Descartes, un gran filòsof i matemàtic, va dir que la millor forma de resoldre un problema era dividir-lo en tantes parts com fos possible per simplificar-lo i solucionar-lo. En aquest sentit, la simulació d'una isquèmia cerebral en models *in vitro* permet obtenir aproximacions més simples i fàcils d'analitzar degut a un major control de variables com el tipus cel·lular analitzat, la durada de la isquèmia i els nivells d'oxigen i glucosa durant l'insult, entre d'altres. Aquestes característiques, juntament amb que sovint requereixen menys temps i recursos que els models en animals, atorguen als models *in vitro* unes bones prestacions a l'hora d'estudiar els mecanismes biològics associats a la isquèmia i realitzar proves preliminars de fàrmacs (Yang et al., 2012).

Treballs previs han descrit que el manteniment de l'estructura i la integritat de les cèl·lules endotelials de la microvasculatura cerebral durant la isquèmia semblen ser punts crítics en la funcionalitat de la BHE. És per això que s'ha establert la utilització d'aquest tipus cel·lular per analitzar l'afectació d'aquesta estructura en condicions isquèmiques (Naik and Cucullo, 2012). La utilització de línies endotelials immortalitzades respecte als cultius primaris de microvasculatura cerebral simplifica en gran mesura el desenvolupament dels models i particularment, la línia cel·lular bEnd.3 és una de les més utilitzades (Brown et al., 2007; Camós and Mallolas, 2010; Ku et al., 2016). Les cèl·lules bEnd.3 mantenen les propietats de BHE al llarg dels experiments generant monocapes amb permeabilitats baixes i amb l'expressió abundant de proteïnes de UEs a la membrana cel·lular (Brown et al., 2007; Li et al., 2010; Watanabe et al., 2013). És per això que es va decidir utilitzar aquesta línia cel·lular com a model per avaluar els efectes del tractament amb rt-PA sobre la BHE en condicions isquèmiques.

Fins a on sabem, aquesta tesi inclou el primer estudi que analitza els efectes de l'rt-PA en la línia cel·lular bEnd.3 més enllà de 6 h després de la POG. Tant la POG com el tractament amb 20 µg/ml d'rt-PA han afectat significativament a la morfologia de les cèl·lules bEnd.3, fet que ja ha estat descrit prèviament en la mateixa línia cel·lular (Garraud et al., 2016). De forma similar, l'administració d'rt-PA en condicions POG afecta la morfologia de la línia cel·lular humana HBMECs (Niego et al., 2012; Freeman et al., 2014).

Una de les principals diferències entre els estudis que analitzen els efectes de la POG en les cèl·lules bEnd.3 és la duració d'aquesta privació. Aquests períodes acostumen a ser des d'1 o 2 h, simulant un insult isquèmic breu (Hu et al., 2015; Zhang et al., 2016; Feng et al., 2019), a períodes de 4, 6 o més hores, representant un insult més llarg (Liu et al., 2016a; Luo et al., 2016; Song et al., 2016). El període escollit en aquest estudi va ser de 2,5 h de POG ja que aquest temps era suficient per causar una afectació a l'activitat metabòlica i a la viabilitat cel·lular però sense arribar a provocar una mort cel·lular massiva. D'altra banda, els valors de TEER obtinguts només van ser similars als publicats prèviament (entre 20 i 25 Ω·cm<sup>2</sup>) (Li et al., 2010) quan els inserts utilitzant eren de la casa comercial Falcon.

Aquest treball ha demostrat que l'efecte citotòxic de la POG sobre la viabilitat cel·lular es manté només fins a les 24 h de reoxigenació, a diferència de l'activitat metabòlica que si que resta disminuïda com a mínim fins a les 72 h de reoxigenació analitzades. Sorprenentment, no hi ha dades publicades referents als efectes de l'rt-PA sobre la viabilitat cel·lular en les cèl·lules bEnd.3 i pel que fa a l'activitat metabòlica, només un estudi descriu una reducció d'aquesta activitat després d'una POG més llarga que la utilitzada en el nostre treball, concretament 6 h de POG més 3 h de reoxigenació amb rt-PA (Kim et al., 2017). En aquesta tesi s'ha demostrat que l'rt-PA prolonga les disminucions de la viabilitat cel·lular i l'activitat metabòlica causades per una POG de 2,5 h fins a les 72 h de reoxigenació. D'altra banda, en condicions no isquèmiques, l'addició d'rt-PA no ha causat cap efecte significatiu sobre la viabilitat cel·lular ni tampoc sobre l'activitat metabòlica durant les 72 h de reoxigenació analitzades. Aquests resultats van en la línia del que s'ha publicat amb 24 h de reoxigenació (Suzuki et al., 2015; Garraud et al., 2016).

Pel que fa a la permeabilitat, els nostres resultats han demostrat que l'increment de la permeabilitat iònica després de 2 h de POG sense reoxigenació prèviament descrit (Cao et



al., 2016b) es manté fins les 72 h. En aquest cas, l'addició d'rt-PA ha augmentat la permeabilitat iònica de les cèl·lules en condicions CTR però no ha tingut efectes sobre la ja incrementada permeabilitat de les cèl·lules sotmeses a POG, a diferència del que s'ha descrit en altres articles on es realitzava una POG de 6 h (Hiu et al., 2008; Won et al., 2014). Probablement aquesta diferència en la duració de la POG és la causant de la divergència detectada. D'altra banda, s'ha detectat un increment significatiu de la permeabilitat transcel·lular després de les 2,5 h de POG, el qual s'ha accentuat significativament amb el tractament amb rt-PA. Pel que sabem, els efectes que provoca la POG i l'rt-PA sobre la permeabilitat transcel·lular de les cèl·lules bEnd.3 no s'han estudiat més enllà de 5 h post-reoxigenació (Suzuki et al., 2015). Suzuki et al. descriuen que l'addició de 10 µg/mL d'rt-PA després de la POG potencia l'increment de la permeabilitat transcel·lular, però en canvi, no observen diferències significatives d'aquesta permeabilitat en condicions CTR. En aquesta tesi s'ha demostrat que una concentració major d'rt-PA, concretament de 20 µg/mL, si que provoca un increment de la permeabilitat transcel·lular en condicions CTR durant les 72 h de reoxigenació estudiades, suggerint que són necessàries concentracions d'rt-PA més altes per provocar efectes en la permeabilitat de les cèl·lules bEnd.3 en condicions de normòxia. Així mateix, s'ha escollit la concentració de 20 µg/mL en base a les observacions de Godfrey et al. els quals descriuen concentracions similars d'rt-PA en sang durant el procés de trombòlisi (Godfrey et al., 1998).

Per tal de continuar amb l'estudi dels efectes de la POG i l'rt-PA sobre la barrera formada per les cèl·lules bEnd.3 era necessari analitzar el comportament de les principals proteïnes d'UEs en aquestes condicions experimentals. Com s'ha comentat a la introducció (Veure apartat 1.7), l'elecció de les proteïnes constitutives és un pas clau per obtenir uns resultats fiables ja que d'elles depèn corregir els possibles errors de càrrega i les variacions en la quantitat de mostra analitzada. En aquest sentit, la utilització del marcatge de la proteïna total per normalitzar els resultats representa un mètode de normalització alternatiu al mètode tradicional amb proteïnes constitutives. De fet, diversos estudis han demostrat que és una millor opció de normalització ja que presenta més sensibilitat, linearitat i evita la majoria de problemes associats al marcatge d'una sola proteïna, com la saturació de la senyal i la variabilitat deguda a les condicions experimentals (Aldridge et al., 2008; Eaton et al., 2013; Gilda and Gomes, 2013; Goasdoue et al., 2016).

Les proteïnes  $\beta$ -Actina,  $\alpha$ -Tubulina, GAPDH i HPRT són quatre de les proteïnes constitutives més utilitzades en diverses condicions experimentals (Gilda and Gomes, 2014; Hu et al., 2016), incloent condicions isquèmiques tant en models *in vivo* com *in vitro* (Mishiro et al., 2013; Won et al., 2014; Song et al., 2016; Pang et al., 2017). Tot i que diversos estudis les utilitzen en condicions isquèmiques sense presentar variacions, en aquesta tesi hem demostrat que aquestes 4 proteïnes no es mantenen estables en les nostres condicions experimentals ja que els seus nivells proteics es troben significativament disminuïts a les CEs bEnd.3 després de 2,5 h de POG en tot el període estudiat (des de les 3, 6, 24 fins les 72 h de reoxigenació). En concordança, altres treballs han observat que precisament la isquèmia produeix alteracions en l'expressió d'aquestes proteïnes (Tanaka et al., 2002; Brown and Davis, 2005; Ma et al., 2013). En relació a l'Actina, Maneen et al. descriuen una reducció dels seus nivells en un model de MCAO en rates i proposen que l'alteració és deguda a l'estrès oxidatiu (Maneen et al., 2006). De forma similar, es va detectar una disminució dels nivells d'Actina després de sotmetre CEs bovines de vasculatura cerebral a 6 h de POG suggerint que el manteniment del citoesquelet d'Actina és dependent d'energia i requereix un subministrament constant d'ATP (Brown and Davis, 2005).

Com en el cas de l'Actina, s'han descrit alteracions en l'expressió i la distribució de l' $\alpha$ - i la  $\beta$ -Tubulina, proteïnes estructurals importants del citoesquelet, després d'analitzar-les en condicions isquèmiques (Minoura, 2016). Concretament, Ma XL et al. demostren una disminució significativa de l'expressió d' $\alpha$ -Tubulina després d'1 h en condicions isquèmiques i 1 h més de reperfusió en un model de rata (Ma et al., 2013). A més, Kumar K et al. i Hatakeyama T et al. també observen una reducció significativa tant dels nivells de Tubulina com dels seus nivells d'ARNm després d'un període isquèmic de 10 minuts i una reperfusió de 6 i 48 h (Hatakeyama et al., 1988; Kumar et al., 1993).

Pel que fa al GAPDH, un enzim essencial involucrat en la glucòlisi i per tant en la producció energètica (Zhai et al., 2013), Tanaka R et al. descriuen que els nivells de GAPDH varien en funció de la zona i el temps post-isquèmic analitzats utilitzant un model *in vivo* d'isquèmia cerebral. Concretament demostren una acumulació nuclear de GAPDH a la zona del nucli isquèmic després de 2 h de MCAO que disminuïx a mesura que avançava el temps de reperfusió fins a les 48 h (Tanaka et al., 2002).

Finalment, l'HPRT és un enzim important relacionat en l'obtenció d'ATP a través d'una via d'emergència, i tot i que alguns articles han demostrat en un model *in vivo* de MCAO permanent que la seva expressió es manté constant i per tant, que es podria utilitzar com a control constitutiu per l'anàlisi de RT-PCR (Meldgaard et al., 2006; Gubern et al., 2009), altres estudis han detectat una disminució dels nivells d'ARNm d'aquesta proteïna en condicions isquèmiques (Iizuka, 1994).

Ara bé, contràriament als nostres resultats, alguns treballs portats a terme en la línia bEnd.3 presenten nivells inalterats de  $\beta$ -Actina i GAPDH després d'una POG. Ni Liu et al. i Song et al. exposant les cèl·lules a 2 h de POG sense o amb 6 h de reoxigenació, respectivament (Liu et al., 2012a; Song et al., 2016), ni Won et al. en un model de 6 h de POG i 3 de reoxigenació, detecten nivells de  $\beta$ -Actina afectats per les condicions experimentals (Won et al., 2014). Per altra banda, Liu et al., Yang et al. i Luo et al., mostren nivells inalterats de GAPDH després de 6, 9 i 12 h de POG sense o amb 15 i 24 h de reoxigenació respectivament (Liu et al., 2016b; Luo et al., 2016; Yang et al., 2019). És probable que aquestes discrepàncies puguin estar donades per les diferències metodològiques incloent els temps analitzats i el procediment a l'hora de realitzar la POG.

El marcatge de la proteïna total també ens ha permès detectar un canvi important del patró de bandes (perfil proteic) de les cèl·lules bEnd.3 degut a la POG, indicant una alteració en l'expressió de proteïnes. En aquest sentit, Andreev et al. descriuen que 1 h de POG altera la traducció d'aproximadament 3.000 gens en la línia cel·lular neural PC12 (Andreev et al., 2015). A més, s'ha demostrat que l'HIF-1 es troba incrementat a les cèl·lules bEnd.3 després de 6 h de POG i 18 de reoxigenació (Shin et al., 2016), fet que s'associa amb alteracions del perfil proteic com a resultat d'una inducció de gens involucrats en el metabolisme anaeròbic, en el transport d'oxigen i en l'angiogènesi (Jögi et al., 2002).

Tot i les nombroses limitacions, els models *in vitro* de POG reproduïxen part de la cascada d'esdeveniments moleculars que es desencadenen amb la isquèmia cerebral, subratllant la subseqüent fallada energètica i alteració metabòlica. Aquestes alteracions inclouen canvis en els nivells d'oxigen, en el metabolisme de la glucosa i la dràstica reducció de metabòlits energètics com l'ATP, el lactat i la fosfocreatina entre d'altres (Castellanos et al., 2016). Per tant, proteïnes involucrades en processos dependents d'energia com l'Actina i la Tubulina, o

relacionades amb determinades vies metabòliques per l'obtenció d'ATP com el GAPDH i l'HPRT, es veurien alterades tal i com hem demostrat en les nostres condicions experimentals. Per tant, es pot concloure que les proteïnes  $\beta$ -Actina,  $\alpha$ -Tubulina, GAPDH i HPRT no són adequades com a controls de càrrega en les nostres condicions experimentals, i tal com ja han descrit alguns estudis, la normalització amb la tecnologia "Stain-Free", la qual permet quantificar la proteïna total carregada a cada carril, representa una alternativa fiable per tal de normalitzar els resultats obtinguts per "Western Blot" a més de permetre comprovar la validesa de proteïnes potencialment constitutives (Gilda and Gomes, 2013; Rivero-Gutiérrez et al., 2014).

Així doncs, utilitzant la normalització per proteïna total s'han obtingut els nivells de les proteïnes d'UEs Claudina-5 i ZO-1 en els diferents grups experimentals. Els efectes de la POG i l'rt-PA sobre els nivells d'aquestes dues proteïnes ja han estat estudiats prèviament en les cèl·lules bEnd.3 però només fins a les 24 h post-reoxigenació. La idea inicial era establir un model *in vitro* que permetés el testatge de fàrmacs amb efectes més enllà de les 24 h de reoxigenació, i tenint en compte que els mecanismes implicats en la disrupció de la BHE després d'una isquèmia són processos dinàmics que varien al llarg del temps (Sandoval and Witt, 2008), es va decidir ampliar l'anàlisi dels efectes de la POG i de l'rt-PA de les 24 fins a les 72 h de reoxigenació.

S'ha descrit que 2 h de POG indueixen una ràpida translocació de la Claudina-5 cap al citoplasma que es recupera després de 24 h de reoxigenació (Liu et al., 2016a). En aquest sentit, els nostres resultats afegeixen que de les 24 a les 72 h de reoxigenació els nivells de Claudina-5 es mantenen inalterats. A més, s'ha observat que l'rt-PA tampoc afecta a aquesta proteïna ja que no s'han detectat canvis significatius deguts a la seva addició. De fet, només s'han detectat alteracions en els nivells de la Claudina-5 causats per l'rt-PA després d'un període de POG de 6 h (Won et al., 2014). Tot sembla indicar doncs, que es requereix una POG més llarga (si més no, més de 2,5 h) per tal de que l'rt-PA pugui provocar alguna afectació a la Claudina-5. De forma similar al treball de Luo et al., els quals no observen diferències en els nivells de ZO-1 després de 3 h de POG i 24 h de reoxigenació en bEnd.3 (Luo et al., 2016), s'ha observat que les nostres condicions de POG no produeixen cap alteració significativa als nivells de ZO-1. Com en el cas de la Claudina-5, només s'han descrit

canvis significatius de ZO-1 després de períodes de POG més llargs (d'entre 4 i 9 h) (Cao et al., 2016a, 2016b; Shin et al., 2016; Tan et al., 2017). Ara bé, quan les cèl·lules sotmeses a POG s'han tractat amb rt-PA, els nivells de ZO-1 han disminuït significativament després de 72 h de reoxigenació. Aquest fet no estava prèviament descrit en bEnd.3 però concorda amb un treball on observen un comportament similar en CEs humanes (Mishiro et al., 2012). Així doncs, a diferència del que s'ha descrit per la Claudina-5, 2,5 h de POG si que semblen ser suficients perquè l'rt-PA causi efectes sobre els nivells de ZO-1. Aquest fet apunta a que la hiperpermeabilitat detectada després de 72 h de reoxigenació amb rt-PA podria estar relacionada amb aquesta disminució dels nivells de ZO-1, la qual ha estat correlacionada amb una deficiència en les unions intercel·lulars de les CEs (Romero et al., 2003; Brown et al., 2007).

En conjunt, totes aquestes dades suggereixen que l'rt-PA modifica els paràmetres funcionals i els nivells de la proteïna ZO-1 a llarg termini després d'una reoxigenació en la línia bEnd.3, afectant en conseqüència a la permeabilitat de la monocapa. Per tant, aquests resultats reflecteixen la necessitat de realitzar anàlisis a llarg termini, si més no fins a les 72 h, per tal d'estudiar els mecanismes moleculars dependents del temps que es troben associats a la disrupció de la BHE, per així poder explorar noves dianes o agents terapèutics destinats a la protecció d'aquesta barrera després d'un ictus isquèmic i tractament amb rt-PA.

## 6.2 Cav-1 post-isquèmia i administració d'rt-PA *in vitro* i *in vivo*

Com s'ha comentat a l'apartat 1.5.1 de la introducció, s'ha demostrat sobradament que la Cav-1 juga papers importants relacionats amb el desenvolupament de la lesió després d'un insult isquèmic, i més concretament sobre la disfunció de la BHE. No obstant, els resultats obtinguts encara són insuficients i dispersos per poder construir una única hipòtesi sobre el seu rol durant la isquèmia ja que existeixen dades contradictòries que tant apunten a un paper més aviat protector com pel contrari, perjudicial. A més, els efectes que pot provocar l'rt-PA sobre aquesta proteïna en condicions isquèmiques encara són desconeguts.

Tot i aquesta evident connexió entre la Cav-1 i la isquèmia, ni Liu et al. ni Song et al. mostren alteracions dels seus nivells després de 2 h de POG i 2 h de POG i 6 h de reoxigenació, respectivament, en la línia bEnd.3 (Liu et al., 2012a; Song et al., 2016). En canvi, en aquest treball s'ha observat un increment significatiu dels nivells de Cav-1 a les cèl·lules bEnd.3

exposades a 2,5 h de POG des de les 0 fins a les 72 h post-POG analitzades. És probable que una de les causes d'aquestes discrepàncies sigui la utilització de protocols de POG diferents amb variacions en la concentració d'O<sub>2</sub> durant la POG, en la pressió aplicada a les cèl·lules, en el flux d'entrada i de sortida, o la utilització de diferents suports a l'hora de cultivar les cèl·lules, entre d'altres. De fet, d'acord amb els nostres resultats, s'ha descrit un increment de Cav-1 similar en BMECs humanes després de 24 h de POG (Yang et al., 2016).

En aquesta tesi també s'ha determinat que el tractament amb rt-PA sobre les cèl·lules bEnd.3 induïx una disminució significativa dels nivells de Cav-1 que prèviament havien augmentat per la POG. En aquest context, només hi ha un treball que hagi estudiat els efectes de l'rt-PA sobre CEs en condicions isquèmiques. En aquest estudi, Song et al. conclouen que l'rt-PA causa una reducció dels nivells de Cav-1 després de 2 h de POG i 6 h de reoxigenació, promovent la seva secreció al medi de cultiu (Song et al., 2016). D'acord amb això, els nostres resultats han mostrat una disminució significativa dels nivells de Cav-1 després de la POG i el tractament amb rt-PA des de les 3 fins a les 72 h de reoxigenació, que en canvi, no s'ha produït quan la POG o l'rt-PA s'han aplicat per separat a les cèl·lules.

Cal destacar també que aquesta tesi és el primer treball que analitza els efectes de la POG i l'rt-PA sobre la fosforilació de la Cav-1, mostrant alteracions significatives de la proporció entre la pCav-1 i la Cav-1 total. La fosforilació de la Cav-1 a la tirosina 14 modula la formació de les caveoles i el seu despreniment de la membrana plasmàtica, dos passos essencials per la transcitosi (Li et al., 1996; Lee et al., 2000; Zimnicka et al., 2016). En aquest sentit, Sun et al. descriuen que una inducció de la fosforilació de Cav-1 contribueix a la disrupció de la barrera endotelial, tot i que cal mencionar que utilitzen un model amb CEs de pulmó. En el nostre cas, l'increment significatiu de la proporció pCav-1/Cav-1 coincideix amb l'alta permeabilitat transcel·lular detectada a les cèl·lules sotmeses a POG i tractades amb rt-PA a les 72 h de reoxigenació, suggerint que els efectes de l'rt-PA en condicions isquèmiques poden ser mediat per la fosforilació de Cav-1.

El nivells de Cav-1 també s'han estudiat en models *in vivo* de dany cerebral i disfunció de la BHE però el seu rol encara no està clar. Alguns treballs descriuen que la deleció del gen de la Cav-1 causa un increment del dany isquèmic, donant suport a un possible rol protector d'aquesta proteïna en condicions isquèmiques (Sonveaux et al., 2004; Jasmin et al., 2007). A

més, s'ha vist que ratolins amb "knockout" de Cav-1 presenten una major activitat de MMPs, una disminució dels nivells de proteïnes d'UEs i una permeabilitat de la BHE alterada (Gu et al., 2012; Choi et al., 2016). Inversament, altres estudis mostren que la deleció de Cav-1 redueix el dany després d'una hemorràgia intracerebral, suggerint que aquesta proteïna podria estar empitjorant el desenvolupament post-hemorràgic (Chang et al., 2011). En aquesta línia, Nag et al. demostren que la sobreexpressió de Cav-1 es relaciona amb una degradació de les proteïnes d'UEs i amb la disrupció de la BHE en un model de rata amb dany per fred (Nag et al., 2007). En aquesta tesi s'ha utilitzat un model murí d'isquèmia tromboembòlic *in situ* i administració tardana d'rt-PA per tal d'analitzar l'efecte d'aquest fàrmac sobre els nivells de Caveolina-1 sèrics i tissulars. A més, tot i les diferències evidents entre les condicions *in vitro* i *in vivo*, el tractament amb rt-PA s'ha dut a terme a temps similars en els dos models experimental (2,5 i 3 h després de l'inici de la isquèmia, respectivament).

Els animals sotmesos al model d'MCAO han desenvolupat volums d'infart i hemorràgics similars als que s'havien publicat prèviament (Cyrille et al., 2007; García-Yébenes et al., 2011). L'anàlisi per immunohistofluorescència de la zona infartada ha permès detectar un increment significatiu dels nivells de Cav-1 en els ratolins amb MCAO no tractats amb rt-PA en comparació amb els CTR. Aquests resultats concorden amb altres estudis portats a terme en diferents models (lligadura, fototrombòtics i dany per fred) on també observen un increment de Cav-1 (Jasmin et al., 2007; Nag et al., 2007; Choi et al., 2016; Blochet et al., 2018), però difereixen dels publicats per Gu et al. i Shen et al. els quals detecten una subexpressió de Cav-1 en un model d'MCAO en rates (Shen et al., 2006; Gu et al., 2012). D'altra banda, també cal emfatitzar que els resultats del model *in vivo* concorden amb els obtinguts en el model *in vitro* en les cèl·lules bEnd.3 no tractades amb rt-PA. S'ha descrit que la Cav-1 s'expressa a diversos tipus cel·lulars presents a la BHE tot i que els nivells més alts de Cav-1 i de caveoles es troben a les CEs, constituint aproximadament un 30% de la superfície cel·lular endotelial dels capil·lars (Xu et al., 2015). En el present treball no podem descartar que el marcatge de Cav-1 detectat sigui exclusivament a CEs ja que no s'ha utilitzat cap marcador endotelial. No obstant, tenint en compte la bibliografia descrita (Jasmin et al., 2007) i el marcatge obtingut a nivell dels vasos en les microfotografies presentades, és altament probable que la Cav-1 marcada es trobi situada a CEs. En

condicions normals, les CEs i els PCs interaccionen amb la làmina basal i les UEs mantenen estable l'estructura, però després d'un insult isquèmic aquestes interaccions es desregulen, provocant un deteriorament de les CEs i una deformació dels PCs que acaba amb la separació d'aquestes cèl·lules. Els PCs poden regular la integritat de la BHE en part gràcies a un mecanisme inhibidor que redueix el nombre de caveoles i l'activitat de la transcitosi (Al Ahmad et al., 2009). Així doncs, s'ha suggerit que la separació dels PCs podria ser una de les causes de l'increment de caveoles i per tant de Cav-1 detectat després d'una isquèmia (Liu et al., 2012b). En aquest sentit, s'ha detectat que només els segments vasculars amb disfunció de la BHE presenten un increment en la densitat de caveoles (Nag et al., 2007), ja que com també es pot observar a les nostres imatges, els vasos de zones no isquèmiques mostren una intensitat de marcatge per Cav-1 molt reduïda. D'altra banda, l'increment de Cav-1 també podria estar relacionat amb una resposta per generar nous vasos tal com suggereixen Jasmin et al. i Blochet et al. tot i que cal tenir en compte que el procés d'angiogènesi no s'ha observat abans de les 48 h post-isquèmia i per tant, en el nostre cas amb només 24 h de reperfusió, és poc probable que l'increment de Cav-1 estigui relacionat amb aquest procés (Jasmin et al., 2007; Blochet et al., 2018). A part d'això, com s'ha descrit en l'apartat 1.5, la Cav-1 té la capacitat d'interaccionar físicament amb altres proteïnes com la NOS i les MMPs i regular-les gràcies al seu domini CSD. Alguns estudis descriuen que aquesta proteïna exerceix un rol protector inhibint la MMP-9 i disminuint la degradació de la MEC i de les UEs després d'un insult isquèmic (Song et al., 2007; Gu et al., 2012) i per tant suggerim que l'increment observat en aquest treball podria estar relacionat amb una resposta neuroprotectora vers l'insult isquèmic.

Respecte als efectes de l'rt-PA sobre els nivells de Cav-1 *in vivo*, només un estudi previ ha analitzat la immunoreactivitat d'aquesta proteïna en ratolins MCAO tractats amb el fàrmac. En aquest estudi descriuen un increment de Cav-1 similar a l'observat en animals MCAO sense rt-PA, el qual associen amb un augment de la transcitosi mediada per caveoles a les CEs (Chen et al., 2018). Les diferències evidents entre una línia cel·lular amb un únic tipus cel·lular, en aquest cas, endotelial, i la unitat neurovascular, un teixit complex format per diversos tipus cel·lulars entre els que s'inclouen a més dels endotelials, astròcits i perícits, seria la principal explicació a les diferències detectades entre els resultats *in vitro* i *in vivo* quan l'rt-PA és administrat. De fet, Blochet C. et al. han demostrat recentment que la MCAO



també indueix un increment de Cav-1 en astròcits reactius, reforçant la idea que la Cav-1 pot estar modulada en diversos tipus cel·lulars (Blochet et al., 2018).

Pel que fa als nivells sèrics de Cav-1 en models animals d'isquèmia, fins al moment no hi cap treball que els hagi estudiat. Un dels resultats més interessants d'aquesta tesi és la demostració d'una correlació positiva entre els nivells de Cav-1 a la zona infartada i al sèrum, després de 24 h post-MCAO. El fet que aquesta correlació es perdi en els ratolins MCAO tractats amb rt-PA, indica que el fàrmac podria estar alterant els nivells de Cav-1 tal com s'ha demostrat en el model *in vitro* tot i que no hem pogut demostrar diferències significatives en els nivells sèrics de Cav-1 entre els dos grups (MCAO vs MCAO + rt-PA).

A més, els nivells sèrics basals de Cav-1 després de la isquèmia es correlacionen positivament amb el volum d'infart en el grup MCAO, i per tant, una anàlisi precoç dels nivells de Cav-1 sèrics podria contribuir a una millor predicció del desenvolupament del dany isquèmic. De nou, aquesta associació desapareix quan els animals són tractats amb rt-PA, indicant que la presència del fàrmac podria tenir també efectes en els nivells sèrics de Cav-1. Convé ressaltar que tot i haver obtingut resultats molt interessants, aquest treball presenta algunes limitacions importants incloent una elevada dificultat de realització del model *in vivo* i consegüentment una n experimental petita que afebleix l'anàlisi estadístic, havent d'interpretar els resultats amb una precaució especial. És evident doncs, que caldria ampliar la n en futurs estudis per confirmar els resultats obtinguts.

Tot i aquestes limitacions, el nostre grup de recerca recentment ha publicat un estudi clínic que d'acord amb els nostres resultats, ha detectat un increment dels nivells sèrics de Cav-1 en pacients isquèmics respecte a controls sans. Curiosament, el subgrup de pacients isquèmics tractats amb rt-PA amb TH més severes són els que presenten els nivells basals (en el moment de l'ingrés) de Cav-1 significativament més baixos. Això podria suggerir que l'increment de Cav-1 com a resposta a la isquèmia juga un paper protector. Considerant que l'rt-PA altera aquesta resposta en el model *in vitro* i possiblement en el model *in vivo*, es podria hipotetitzar que els pacients amb menys capacitat de resposta de la Cav-1 vers una isquèmia, seran els més vulnerables als efectes de l'rt-PA. No cal dir però que es requereixen més treballs i més evidències per tal de confirmar aquesta hipòtesi i

comprendre, amb més profunditat, els mecanismes subjacents a la interacció entre l'rt-PA i la Cav-1 i els seus rols durant l'ictus isquèmic.

### 6.3 Discussió general

Tenint en compte l'alta complexitat dels múltiples processos involucrats en el dany de l'ictus isquèmic agut, i les limitacions que presenten les opcions terapèutiques disponibles, el principal repte es basa en desenvolupar noves estratègies terapèutiques per millorar el tractament i pronòstic dels pacients. Vist en perspectiva, tot fa pensar que és necessària una aproximació més pleiotròpica dirigida a diversos esdeveniments patològics, a múltiples tipus cel·lulars i que tingui en compte el curs temporal del procés isquèmic. En aquest sentit, hi ha molta informació publicada descrivint els processos moleculars que es desencadenen a les primeres 24 h després d'un insult isquèmic, no obstant, a partir d'aquest temps, la quantitat d'informació disminueix dràsticament. Així doncs, el desenvolupament de models experimentals que permetin l'anàlisi dels efectes de la isquèmia i del tractament amb rt-PA a més a llarg termini són imprescindibles per estudiar possibles millores del tractament de l'ictus isquèmic.

Durant els últims vint anys, l'evolució dels models isquèmics *in vitro* i *in vivo* ha suposat un gran avenç en la recerca d'aquesta patologia ja que ha permès endinsar-nos de forma molt més exhaustiva, en l'enorme complexitat que representa l'ictus isquèmic a nivell cel·lular i molecular. El model *in vitro* utilitzat en aquesta tesi ha permès obtenir uns resultats que confirmen la implicació de l'rt-PA en l'afectació a llarg termini de la integritat i permeabilitat de la BHE durant la simulació d'un ictus isquèmic i la posterior reoxigenació. Cal remarcar també que és de gran importància determinar prèviament els controls endògens en funció de les condicions experimentals analitzades ja que és un pas clau per a la posterior validació i interpretació dels resultats. Concretament, en aquest treball, utilitzant la proteïna total com a mètode de normalització, s'ha demostrat que proteïnes constitutives àmpliament utilitzades en molts treballs, no es mantenen constants en les condicions experimentals de POG i tractament amb rt-PA. Igualment, s'ha demostrat un increment de Cav-1 degut a la isquèmia tant *in vivo* com *in vitro*, on a més, en aquest últim model s'ha descrit que els nivells de Cav-1 disminueixen quan s'addiciona rt-PA durant la reoxigenació de les cèl·lules bEnd.3. En el model *in vivo*, s'ha detectat una correlació entre els nivells sèrics basals de

Cav-1 i el volum d'infart, suggerint un possible rol d'aquesta proteïna com a biomarcador de dany isquèmic. Així mateix, si bé no s'ha pogut demostrar un efecte significatiu de l'rt-PA sobre els nivells de Cav-1 en el teixit infartat ni en el sèrum, s'ha detectat una tendència a disminuir dels nivells de Cav-1 sèrics en els animals tractats amb rt-PA que, juntament amb el fet que les correlacions observades entre els nivells de Cav-1 sèrics i tissulars, i entre els nivells sèrics basals de Cav-1 i el volum d'infart, es perden, apuntaria a un efecte del fàrmac sobre aquesta proteïna. Resulta evident doncs, que la futura dilucidació dels efectes *in vivo* de l'rt-PA sobre la Cav-1, és essencial per aprofundir en seu el potencial com a biomarcador del dany isquèmic i com a diana terapèutica neuroprotectora o fins i tot neuroreparadora. Tot i això, s'ha de tenir en compte que la controvèrsia sobre aquesta proteïna en condicions isquèmiques no està resolta i encara no s'ha definit completament el seu rol, presentant discordances entre els que li atorguen un caràcter protector o perjudicial. Part d'aquesta controvèrsia podria derivar de les múltiples, i en ocasions oposades, funcions que juga aquesta proteïna. De fet, tot i que la Cav-1 pot inhibir l'activitat de diversos enzims, les caveoles poden actuar com a plataformes que faciliten la compartimentació de receptors de membrana amb els seus lligands corresponents, induint així l'activació i amplificació de cascades de senyalització (Van Deurs et al., 2003), procés conegut com "la paradoxa caveolar" (Feron and Kelly, 2001). Per tant, aquest caràcter pleiotròpic de la Cav-1 podria representar alhora un avantatge i un inconvenient durant el desenvolupament d'una hipotètica teràpia per la isquèmia. Per una banda, simplement amb la modulació de la Cav-1 s'estaria intervenint paral·lelament en diversos mecanismes moleculars, augmentant exponencialment, d'altra banda, la dificultat per controlar totes les alteracions ocasionades.

En conjunt, els resultats presentats en aquesta tesi confirmen i amplien el coneixement aportat per estudis publicats prèviament sobre els efectes de l'rt-PA en condicions isquèmiques, reforçant la idea que l'rt-PA és un fàrmac que pot intervenir en diversos processos cel·lulars i moleculars alterant així a una gran quantitat de proteïnes com és el cas de la ZO-1 i la Cav-1. Degut al potencial terapèutic que presenta la Cav-1, aquesta tesi obre una nova línia de recerca enfocada en descobrir i desenvolupar noves estratègies que permetin tant intervenir directament sobre la regulació de la Cav-1 per reduir els efectes nocius de la isquèmia i millorar el pronòstic dels pacients, com aprofitar el seu potencial

com a biomarcador per així aplicar un tractament més personalitzat en funció dels seus nivells.

## 7. CONCLUSIONS

Els resultats obtinguts en aquesta tesi han permès extreure les següents conclusions:

- 7.1 Dues hores i mitja de privació d'oxigen i glucosa són adequades per generar unes condicions isquèmiques a les cèl·lules bEnd.3 que, mitjançant la utilització d'inserts Falcon, han permès analitzar els efectes del tractament amb rt-PA fins a les 72 hores de reoxigenació.
- 7.2 La privació d'oxigen i glucosa ha provocat una alteració en els nivells de les proteïnes  $\beta$ -Actina,  $\alpha$ -Tubulina, GAPDH i HPRT en les cèl·lules bEnd.3, fet que indica que no són adequades com a controls de càrrega per realitzar la normalització dels nivells de les proteïnes d'interès obtinguts per la tècnica de "Western blot".
- 7.3 El tractament amb rt-PA ha causat una disminució dels nivells de la proteïna ZO-1 només a les cèl·lules bEnd.3 sotmeses a privació d'oxigen i glucosa i reoxigenades durant 72 hores. D'altra banda, no s'han detectat alteracions significatives sobre els nivells ni la localització cel·lular de la Claudina-5 indicant que possiblement sigui necessari un insult isquèmic superior a dues hores i mitja.
- 7.4 La privació d'oxigen i glucosa ha causat un increment significatiu dels nivells de la proteïna Caveolina-1 a les cèl·lules bEnd.3 des de les 0 fins a les 72 hores de reoxigenació mentre que el tractament amb rt-PA ha provocat una disminució dels nivells d'aquesta proteïna.
- 7.5 A les 72 hores de reoxigenació, la privació d'oxigen i glucosa ha disminuït la proporció de Caveolina-1 fosforilada respecte la Caveolina-1 total mentre que el tractament amb rt-PA ha incrementat aquesta proporció significativament. Aquest fet podria explicar l'increment de la permeabilitat detectat quan les cèl·lules són tractades amb rt-PA.
- 7.6 L'administració tardana de l'rt-PA no ha causat efectes sobre el volum d'infart i hemorràgic generat per l'oclusió de l'artèria cerebral mitjana en el model tromboembòlic *in situ* a les 24 hores post-oclusió. No obstant si que s'ha detectat un increment significatiu de l'edema degut al fàrmac.
- 7.7 L'oclusió de l'artèria cerebral mitjana ha provocat un increment dels nivells de Caveolina-1 al teixit infartat a les 24 hores però no s'han detectat efectes sobre els

nivells sèrics de la proteïna a les 0, 3 i 24 hores de reperfusió. D'altra banda, el tractament amb rt-PA no ha afectat significativament els nivells de Caveolina-1 del teixit infartat ni als nivells sèrics de la proteïna com a mínim fins a les 24 hores post-oclusió.

- 7.8 Els nivells proteics de Caveolina-1 en el teixit infartat han correlacionat positivament amb els nivells sèrics de la proteïna a les 24 hores post-oclusió de l'artèria cerebral mitjana en els animals no tractats amb rt-PA. D'altra banda, els nivells sèrics de Caveolina-1 després de 3 hores d'oclusió correlacionen positivament amb el volum d'infart dels animals no tractats amb rt-PA, suggerint la possibilitat d'utilitzar aquesta proteïna com a biomarcador de dany isquèmic.
- 7.9 Si bé no s'ha detectat que el tractament amb rt-PA provoqui diferències significatives sobre els nivells sèrics i tissulars de Caveolina-1, el fet que les correlacions esmentades es perdin en presència del fàrmac indica que possiblement l'rt-PA està interferint en els nivells de Caveolina-1 post-oclusió.





## 8. BIBLIOGRAFIA

- Aarts MM, Tymianski M (2005) TRPMs and neuronal cell death. *Pflugers Arch Eur J Physiol* 451:243–9.
- Abbot NJ, Rönnbäck L, Hansson E (2006) Astrocyte endothelial interactions at the blood brain barrier. *Nat Rev Neurosci* 7:41–53.
- Adibhatla RM, Hatcher JF (2010) Lipid Oxidation and Peroxidation in CNS Health and Disease: From Molecular Mechanisms to Therapeutic Opportunities. *Antioxid Redox Signal* 12:125–69.
- Aird WC (2007a) Phenotypic heterogeneity of the endothelium: I. Structure, function, and mechanisms. *Circ Res* 100:158–73.
- Aird WC (2007b) Phenotypic heterogeneity of the endothelium: II. Representative vascular beds. *Circ Res* 100:174–90.
- Al Ahmad A, Gassmann M, Ogunshola OO (2009) Maintaining blood-brain barrier integrity: Pericytes perform better than astrocytes during prolonged oxygen deprivation. *J Cell Physiol* 218:612–22.
- Aldridge GM, Podrebarac DM, Greenough WT, Weiler IJ (2008) The use of total protein stains as loading controls: An alternative to high-abundance single-protein controls in semi-quantitative immunoblotting. *J Neurosci Methods* 172:250–4.
- Allen CL, Bayraktutan U (2009) Oxidative stress and its role in the pathogenesis of ischaemic stroke. *Int J Stroke* 4:461–70.
- Alvarez JI, Dodelet-Devillers A, Kebir H, Ifergan I, Fabre PJ, Terouz S, Sabbagh M, Wosik K, Bourbonniere L, Bernard M, Van Horssen J, De Vries HE, Charron F, Prat A (2011) The hedgehog pathway promotes blood-brain barrier integrity and CNS immune quiescence. *Science* (80- ) 334:1727–31.
- Amantea D, Nappi G, Bernardi G, Bagetta G, Corasaniti MT (2009) Post-ischemic brain damage: Pathophysiology and role of inflammatory mediators. *FEBS J* 276:13–26.
- Anderson RGW (1998) THE CAVEOLAE MEMBRANE SYSTEM. *Annu Rev Biochem* 67:199–225.
- Andreev DE, O'Connor PBF, Zhdanov A V., Dmitriev RI, Shatsky IN, Papkovsky DB, Baranov P V. (2015) Oxygen and glucose deprivation induces widespread alterations in mRNA translation within 20 minutes. *Genome Biol* 16:90.
- Aoki T, Sumii T, Mori T, Wang X, Lo EH (2002) Blood-brain barrier disruption and matrix metalloproteinase-9 expression during reperfusion injury mechanical versus embolic focal ischemia in spontaneously hypertensive rats. *Stroke* 33:2711–7.
- Arai K, Jin G, Navaratna D, Lo EH (2009) Brain angiogenesis in developmental and pathological processes: Neurovascular injury and angiogenic recovery after stroke. *FEBS J* 276:4644–52.
- Argaw AT, Asp L, Zhang J, Navrazhina K, Pham T, Mariani JN, Mahase S, Dutta DJ, Seto J, Kramer EG, Ferrara N, Sofroniew M V., John GR (2012) Astrocyte-derived VEGF-A drives blood-brain barrier disruption in CNS inflammatory disease. *J Clin Invest* 122:2454–68.
- Armulik A, Genové G, Betsholtz C (2011) Pericytes: Developmental, Physiological, and Pathological Perspectives, Problems, and Promises. *Dev Cell* 21:193–215.
- Armulik A, Genové G, Mäe M, Nisancioglu MH, Wallgard E, Niaudet C, He L, Norlin J, Lindblom P, Strittmatter K, Johansson BR, Betsholtz C (2010) Pericytes regulate the blood-brain barrier. *Nature* 468:557–61.
- Arnould MC, Grandin CB, Peeters A, Cosnard G, Duprez TP (2004) Comparison of CT and three MR sequences for detecting and categorizing early (48 hours) hemorrhagic transformation in hyperacute ischemic stroke. *Am J Neuroradiol* 25:939–44.
- Arundine M, Tymianski M (2004) Molecular mechanisms of glutamate-dependent neurodegeneration in ischemia and traumatic brain injury. *Cell Mol Life Sci* 61:657–68.
- Asahi M, Asahi K, Wang X, Lo EH (2000) Reduction of tissue plasminogen activator-induced hemorrhage and brain injury by free radical spin trapping after embolic focal cerebral ischemia in rats. *J Cereb Blood Flow*

Metab 20:452–7.

- Attwell D, Buchan AM, Charpak S, Lauritzen M, Macvicar BA, Newman EA (2010) Glial and neuronal control of brain blood flow. *Nature* 468:232–43.
- Bacigaluppi M, Pluchino S, Jametti LP, Kilic E, Kilic Ü, Salani G, Brambilla E, West MJ, Comi G, Martino G, Hermann DM (2009) Delayed post-ischaemic neuroprotection following systemic neural stem cell transplantation involves multiple mechanisms. *Brain* 132:2239–51.
- Back T, Ginsberg MD, Dietrich WD, Watson BD (1996) Induction of spreading depression in the ischemic hemisphere following experimental middle cerebral artery occlusion: Effect on infarct morphology. *J Cereb Blood Flow Metab* 16:202–13.
- Balda MS, Whitney JA, Flores C, González S, Cereijido M, Matter K (1996) Functional dissociation of paracellular permeability and transepithelial electrical resistance and disruption of the apical-basolateral intramembrane diffusion barrier by expression of a mutant tight junction membrane protein. *J Cell Biol* 134:1031–49.
- Bang OY, Ovbiagele B, Kim JS (2015) Nontraditional risk factors for ischemic stroke: An update. *Stroke* 46:3571–8.
- Barr TL, Latour LL, Lee KY, Schaewe TJ, Luby M, Chang GS, El-Zammar Z, Alam S, Hallenbeck JM, Kidwell CS, Warach S (2010) Blood-brain barrier disruption in humans is independently associated with increased matrix metalloproteinase-9. *Stroke* 41(3):123-8.
- Bauer PM, Yu J, Chen Y, Hickey R, Bernatchez PN, Looft-Wilson R, Huang Y, Giordano F, Stan R V, Sessa WC (2005) Endothelial-specific expression of caveolin-1 impairs microvascular permeability and angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:204–9.
- Beckman KB, Ames BN (1998) Mitochondrial aging: Open questions. In: *Annals of the New York Academy of Sciences*, pp 118–27.
- Benchenane K, Berezowski V, Ali C, Fernández-Monreal M, López-Atalaya JP, Brillault J, Chuquet J, Nouvelot A, MacKenzie ET, Bu G, Cecchelli R, Touzani O, Vivien D (2005) Tissue-type plasminogen activator crosses the intact blood-brain barrier by low-density lipoprotein receptor-related protein-mediated transcytosis. *Circulation* 111:2241–9.
- Benchenane K, Castel H, Boulouard M, Bluthe R, Fernandez-Monreal M, Roussel BD, Lopez-Atalaya JP, Butt-Gueulle S, Agin V, Maubert E, Dantzer R, Touzani O, Dauphin F, Vivien D, Ali C (2007) Anti-NR1 N-terminal-domain vaccination unmasks the crucial action of tPA on NMDA-receptor-mediated toxicity and spatial memory. *J Cell Sci* 120:578–85.
- Blochet C, Buscemi L, Clément T, Gehri S, Badaut J, Hirt L (2018) Involvement of caveolin-1 in neurovascular unit remodeling after stroke: Effects on neovascularization and astrogliosis. *J Cereb Blood Flow Metab* 1-14.
- Boehme AK, Esenwa C, Elkind MSV (2017) Stroke Risk Factors, Genetics, and Prevention. *Circ Res* 120:472–95.
- Bogousslavsky J, Melle G Van, Regli F (1988) The lausanne stroke registry: Analysis of 1,000 consecutive patients with first stroke. *Stroke* 19:1083–92.
- Bolton SJ, Anthony DC, Perry VH (1998) Loss of the tight junction proteins occludin and zonula occludens-1 from cerebral vascular endothelium during neutrophil-induced blood-brain barrier breakdown *in vivo*. *Neuroscience* 86:1245–57.
- Boulware MI, Kordasiewicz H, Mermelstein PG (2007) Caveolin Proteins Are Essential for Distinct Effects of Membrane Estrogen Receptors in Neurons. *J Neurosci* 27:9941–50.
- Brightman MW, Reese TS (1969) Junctions between intimately apposed cell membranes in the vertebrate brain. *J Cell Biol* 40:648–77.
- Broughton BRS, Reutens DC, Sobey CG (2009) Apoptotic mechanisms after cerebral ischemia. *Stroke* 40:331–9.

- Brown RC, Davis TP (2005) Hypoxia/aglycemia alters expression of occludin and actin in brain endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 327:1114–23.
- Brown RC, Morris AP, O’Neil RG (2007) Tight junction protein expression and barrier properties of immortalized mouse brain microvessel endothelial cells. *Brain Res* 1130:17–30.
- Bu J, Bruckner SR, Sengoku T, Geddes JW, Estus S (2003) Glutamate regulates caveolin expression in rat hippocampal neurons. *J Neurosci Res* 72:185–90.
- Bucci M, Gratton JP, Rudic RD, Acevedo L, Roviezzo F, Cirino G, Sessa WC (2000) *In vivo* delivery of the caveolin-1 scaffolding domain inhibits nitric oxide synthesis and reduces inflammation. *Nat Med* 6:1362–7.
- Burnette WN (1981) “Western Blotting”: Electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal Biochem* 112:195–203.
- Camós S, Mallolas J (2010) Experimental models for assaying microvascular endothelial cell pathophysiology in stroke. *Molecules* 15:9104–34.
- Candelario-Jalil E, González-Falcón A, García-Cabrera M, León OS, Fiebich BL (2007) Post-ischaemic treatment with the cyclooxygenase-2 inhibitor nimesulide reduces blood-brain barrier disruption and leukocyte infiltration following transient focal cerebral ischaemia in rats. *J Neurochem* 100:1108–20.
- Canfield SG, Stebbins MJ, Morales BS, Asai SW, Vatine GD, Svendsen CN, Palecek SP, Shusta E V. (2017) An isogenic blood–brain barrier model comprising brain endothelial cells, astrocytes, and neurons derived from human induced pluripotent stem cells. *J Neurochem* 140:874–88.
- Cao G, Jiang N, Hu Y, Zhang Y, Wang G, Yin M, Ma X, Zhou K, Qi J, Yu B, Kou J (2016a) Ruscogenin attenuates cerebral ischemia-induced blood-brain barrier dysfunction by suppressing TXNIP/NLRP3 inflammasome activation and the MAPK pathway. *Int J Mol Sci* 17(9).
- Cao GS, Chen HL, Zhang YY, Li F, Liu CH, Xiang X, Qi J, Chai CZ, Kou JP, Yu BY (2016b) YiQiFuMai Powder Injection ameliorates the oxygen-glucose deprivation-induced brain microvascular endothelial barrier dysfunction associated with the NF- $\kappa$ B and ROCK1/MLC signaling pathways. *J Ethnopharmacol* 183:18–28.
- Carmeliet P, Tessier-Lavigne M (2005) Common mechanisms of nerve and blood vessel wiring. *Nature* 436:193–200.
- Castellanos M, Gubern C, Kadar E (2016) Chapter 7 – mTOR: Exploring a New Potential Therapeutic Target for Stroke. In: *Molecules to Medicine with mTOR* 105–22.
- Castellanos M, Leira R, Serena J, Pumar JM, Lizasoain I, Castillo J, Davalos A (2003) Plasma metalloproteinase-9 concentration predicts hemorrhagic transformation in acute ischemic stroke. *Stroke* 34:40–5.
- Castellanos M, Sobrino T, Millán M, García M, Arenillas J, Nombela F, Brea D, Perez De La Ossa N, Serena J, Vivancos J, Castillo J, Dávalos A (2007) Serum cellular fibronectin and matrix metalloproteinase-9 as screening biomarkers for the prediction of parenchymal hematoma after thrombolytic therapy in acute ischemic stroke: A multicenter confirmatory study. *Stroke* 38:1855–9.
- Castellanos M, van Eendenburg C, Gubern C, Kadar E, Huguet G, Puig J, Sobrino T, Blasco G, Serena J, Sanchez JM (2018) Low Levels of Caveolin-1 Predict Symptomatic Bleeding After Thrombolytic Therapy in Patients With Acute Ischemic Stroke. *Stroke* 49(6):1525-7.
- Castillo J, Alvarez-Sabin J, Dávalos A, Diez-Tejedor E, Lizasoain I, Martínez-Vila E, Vivancos J, Zarranz JJ (2003) [Consensus review. Pharmacological neuroprotection in cerebral ischemia: is it still a therapeutic option?]. *Neurol (Barcelona, Spain)* 18:368–84.
- Cesarman-Maus G, Hajjar KA (2005) Molecular mechanisms of fibrinolysis. *Br J Haematol* 129:307–21.
- Chamorro Á, Hallenbeck J (2006) The harms and benefits of inflammatory and immune responses in vascular

- disease. *Stroke* 37:291–3.
- Chang CF, Chen SF, Lee TS, Lee HF, Chen SF, Shyue SK (2011) Caveolin-1 deletion reduces early brain injury after experimental intracerebral hemorrhage. *Am J Pathol* 178:1749–61.
- Chen H, Epstein J, Stern E (2010) Neural plasticity after acquired brain injury: Evidence from functional neuroimaging. *PM R* 2(12 Suppl 2):S306-12.
- Chen S, Chen Z, Cui J, Mccrary ML, Song H, Mobashery S, Chang M, Gu Z (2018) Early Abrogation of Gelatinase Activity Extends the Time Window for tPA Thrombolysis after Embolic Focal Cerebral Ischemia in Mice. *eNeuro* 5:391–17.
- Cherubini A, Ruggiero C, Polidori MC, Mecocci P (2005) Potential markers of oxidative stress in stroke. *Free Radic Biol Med* 39:841–52.
- Choi KH, Kim HS, Park MS, Kim JT, Kim JH, Cho KA, Lee MC, Lee HJ, Cho KH (2016) Regulation of Caveolin-1 Expression Determines Early Brain Edema After Experimental Focal Cerebral Ischemia. *Stroke* 47:1336–43.
- Colegio OR, Itallie C V., Rahner C, Anderson JM (2003) Claudin extracellular domains determine paracellular charge selectivity and resistance but not tight junction fibril architecture. *AJP Cell Physiol* 284:1346–54.
- Coomer BL, Stewart PA (1985) Morphometric analysis of CNS microvascular endothelium. *Microvasc Res* 30:99–115.
- Cordon-Cardo C, O'Brien JP, Casals D, Rittman-Grauer L, Biedler JL, Melamed MR, Bertino JR (1989) Multidrug-resistance gene (P-glycoprotein) is expressed by endothelial cells at blood-brain barrier sites. *Proc Natl Acad Sci* 86:695–8.
- Cornford EM, Hyman S, Swartz BE (1994) The human brain GLUT1 glucose transporter: Ultrastructural localization to the blood-brain barrier endothelia. *J Cereb Blood Flow Metab* 14:106–12.
- Correa F, Gauberti M, Parcq J, Macrez R, Hommet Y, Obiang P, Hernangómez M, Montagne A, Liot G, Guaza C, Maubert E, Ali C, Vivien D, Docagne F (2011) Tissue plasminogen activator prevents white matter damage following stroke. *J Exp Med* 208:1229–42.
- Courties G, Moskowitz MA, Nahrendorf M (2014) The innate immune system after ischemic injury lessons to be learned from the heart and brain. *JAMA Neurol* 71:233–6.
- Courtoy PJ, Boyles J (1983) Fibronectin in the microvasculature: localization in the pericyte-endothelial interstitium. *J Ultrastructure Res* 83:258–73.
- Cuevas P, Gutierrez-Diaz JA, Reimers D, Dujovny M, Diaz FG, Ausman JI (1984) Pericyte endothelial gap junctions in human cerebral capillaries. *Anat Embryol (Berl)* 170:155–9.
- Cunningham LA, Wetzel M, Rosenberg GA (2005) Multiple roles for MMPs and TIMPs in cerebral ischemia. *Glia* 50:329–39.
- Cyrille O, Audrey LB, Anne-Laure B, Samaneh M, Denis V (2007) Mouse Model of In Situ Thromboembolic Stroke and Reperfusion. *Stroke* 38:2771–8.
- Daneman R (2012) The blood-brain barrier in health and disease. *Ann Neurol* 72:648–72.
- Daneman R, Prat A (2015) The blood–brain barrier. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 7(1):a020412.
- Daneman R, Zhou L, Agalliu D, Cahoy JD, Kaushal A, Barres BA (2010a) The mouse blood-brain barrier transcriptome: A new resource for understanding the development and function of brain endothelial cells. *PLoS One* 5(10):e13741.
- Daneman R, Zhou L, Kebede AA, Barres BA (2010b) Pericytes are required for blood brain barrier integrity during embryogenesis. *Nature* 468:562–6.
- del Zoppo GJ, Milner R, Mabuchi T, Hung S, Wang X, Koziol JA (2006) Vascular matrix adhesion and the blood–

- brain barrier: Table 1. *Biochem Soc Trans* 34:1261–6.
- Díaz-Flores L, Gutiérrez R, Madrid JF, Varela H, Valladares F, Acosta E, Martín-Vasallo P, Díaz-Flores J (2009) Pericytes. Morphofunction, interactions and pathology in a quiescent and activated mesenchymal cell niche. *Histol Histopathol* 24:909–69.
- Dohmen C, Sakowitz OW, Fabricius M, Bosche B, Reithmeier T, Ernestus RI, Brinker G, Dreier JP, Woitzik J, Strong AJ, Graf R (2008) Spreading depolarizations occur in human ischemic stroke with high incidence. *Ann Neurol* 63:720–8.
- Donnan GA, Fisher M, Macleod M, Davis SM (2008) Stroke. *Lancet* 371:1612–23.
- Drab M, Verkade P, Elger M, Kasper M, Lohn M, Lauterbach B, Menne J, Lindschau C, Mende F, Luft FC, Schedl A, Hailer H, Kurzchalia T V. (2001) Loss of caveolae, vascular dysfunction, and pulmonary defects in caveolin-1 gene-disrupted mice. *Science* (80- ) 293:2449–52.
- Durukan A, Tatlisumak T (2007) Acute ischemic stroke: Overview of major experimental rodent models, pathophysiology, and therapy of focal cerebral ischemia. *Pharmacol Biochem Behav* 87:179–97.
- Eaton SL, Roche SL, Llavero Hurtado M, Oldknow KJ, Farquharson C, Gillingwater TH, Wishart TM (2013) Total Protein Analysis as a Reliable Loading Control for Quantitative Fluorescent Western Blotting. *PLoS One* 8:1–7.
- Edvinsson L, Hamel E (2002) Cerebral Blood Flow and Metabolism. In: *Cereb Blood Flow Metab* 43–57.
- Egawa J, Zemljic-Harpf A, Mandyam CD, Niesman IR, Lysenko L V., Kleschevnikov AM, Roth DM, Patel HH, Patel PM, Head BP (2018) Neuron-targeted caveolin-1 promotes ultrastructural and functional hippocampal synaptic plasticity. *Cereb Cortex* 28:3255–66.
- Enerson BE, Drewes LR (2006) The rat blood-brain barrier transcriptome. *J Cereb Blood Flow Metab* 26:959–73.
- Engelhardt B (2008) Immune cell entry into the central nervous system: Involvement of adhesion molecules and chemokines. *J Neurol Sci* 274:23–6.
- Fan Y, Shen F, Frenzel T, Zhu W, Ye J, Liu J, Chen Y, Su H, Young WL, Yang GY (2010) Endothelial progenitor cell transplantation improves long-term stroke outcome in mice. *Ann Neurol* 67:488–97.
- Feigin VL, Norrving B, Mensah GA (2017) Global Burden of Stroke. *Circ Res Compend Stroke Am Hear Assoc Journals* 120:439–48.
- Feng S-Q, Zong S-Y, Liu J-X, Chen Y, Xu R, Yin X, Zhao R, Li Y, Luo T-T (2019) VEGF antagonism attenuates cerebral ischemia/reperfusion-induced injury via inhibiting endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis. *Biol Pharm Bull* 42(5):692-702.
- Feng Y, Venema VJ, Venema RC, Tsai N, Behzadian MA, Caldwell RB (1999) VEGF-induced permeability increase is mediated by caveolae. *Investig Ophthalmol Vis Sci* 40:157–67.
- Feron O, Kelly RA (2001) The caveolar paradox: Suppressing, inducing, and terminating eNOS signaling. *Circ Res* 88:129–31.
- Fielding CJ, Fielding PE (2001) Caveolae and intracellular trafficking of cholesterol. *Adv Drug Deliv Rev* 49:251–64.
- Fisher M, Bastan B (2012) Identifying and utilizing the ischemic penumbra. *Neurology* 79(13 Suppl 1):S79-85.
- Fluri F, Schuhmann MK, Kleinschnitz C (2015) Animal models of ischemic stroke and their application in clinical research. *Drug Des Devel Ther* 9:3445–54.
- Fra AM, Williamson E, Simons K, Parton RG (1995) De novo formation of caveolae in lymphocytes by expression of VIP21-caveolin. *Proc Natl Acad Sci* 92:8655–9.
- Frank PG, Hassan GS, Rodriguez-Feo J a, Lisanti MP (2007) Caveolae and caveolin-1: novel potential targets for the treatment of cardiovascular disease. *Curr Pharm Des* 13:1761–9.

- Fraser PA (2011) The role of free radical generation in increasing cerebrovascular permeability. *Free Radic Biol Med* 51:967–77.
- Fredriksson L, Lawrence DA, Medcalf RL (2017) tPA Modulation of the Blood-Brain Barrier: A Unifying Explanation for the Pleiotropic Effects of tPA in the CNS. *Semin Thromb Hemost* 43:154–68.
- Freeman R, Niego B, Croucher DR, Pedersen LO, Medcalf RL (2014) T-PA, but not desmoteplase, induces plasmin-dependent opening of a blood-brain barrier model under normoxic and ischaemic conditions. *Brain Res* 1565:63–73.
- Fujimoto T, Kogo H, Nomura R, Une T (2000) Isoforms of caveolin-1 and caveolar structure. *J Cell Sci* 113 Pt 19:3509–17.
- Furuse M (2010) Molecular basis of the core structure of tight junctions. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2:a002907.
- Furuse M, Hata M, Furuse K, Yoshida Y, Haratake A, Sugitani Y, Noda T, Kubo A, Tsukita S (2002) Claudin-based tight junctions are crucial for the mammalian epidermal barrier: A lesson from claudin-1-deficient mice. *J Cell Biol* 156:1099–111.
- Furuse M, Sasaki H, Fujimoto K, Tsukita S (1998) A single gene product, claudin-1 or -2, reconstitutes tight junction strands and recruits occludin in fibroblasts. *J Cell Biol* 143:391–401.
- Galbiati F, Engelman JA, Volonte D, Zhang XL, Minetti C, Li M, Hou H, Kneitz B, Edelmann W, Lisanti MP (2001) Caveolin-3 Null Mice Show a Loss of Caveolae, Changes in the Microdomain Distribution of the Dystrophin-Glycoprotein Complex, and T-tubule Abnormalities. *J Biol Chem* 276:21425–33.
- Gao Y, Zhao Y, Pan J, Yang L, Huang T, Feng X, Li C, Liang S, Zhou D, Liu C, Tu F, Tao C, Chen X (2014) Treadmill exercise promotes angiogenesis in the ischemic penumbra of rat brains through caveolin-1/VEGF signaling pathways. *Brain Res* 1585:83–90.
- Garcia-Touchard A, Henry TD, Sangiorgi G, Spagnoli LG, Mauriello A, Conover C, Schwartz RS (2005) Extracellular proteases in atherosclerosis and restenosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25(6):1119–27.
- García-Yébenes I, Sobrado M, Zarruk JG, Castellanos M, De La Ossa NP, Dávalos A, Serena J, Lizasoain I, Moro MA (2011) A mouse model of hemorrhagic transformation by delayed tissue plasminogen activator administration after in situ thromboembolic stroke. *Stroke* 42:196–203.
- Garraud M, Khacef K, Vion AC, Leconte C, Yin M, Renard JM, Marchand-Leroux C, Boulanger CM, Margail I, Beray-Berthet V (2016) Recombinant tissue plasminogen activator enhances microparticle release from mouse brain-derived endothelial cells through plasmin. *J Neurol Sci* 370:187–95.
- Gelderblom M, Leypoldt F, Steinbach K, Behrens D, Choe CU, Siler DA, 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.
- Gerhardt H, Wolburg H, Redies C (2000) N-cadherin mediates pericytic-endothelial interaction during brain angiogenesis in the chicken. *Dev Dyn* 218:472–9.
- Ghandour MS, Langley OK, Zhu XL, Waheed A, Sly WS (1992) Carbonic anhydrase IV on brain capillary endothelial cells: a marker associated with the blood-brain barrier. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:6823–7.
- Gilda JE, Gomes A V. (2013) Stain-Free total protein staining is a superior loading control to b-actin for Western blots. *Anal Biochem* 440:186–8.
- Gilda JE, Gomes A V. (2014) Western blotting using in-gel protein labeling as a normalization control: Stain-free technology. *Methods Mol Biol* 1295:381–91.
- Goasdoue K, Awabdy D, Bjorkman ST, Miller S (2016) Standard loading controls are not reliable for Western blot quantification across brain development or in pathological conditions. *Electrophoresis* 37:630–4.
- Godfrey KR, Tanswell P, Bates R a, Chappell MJ, Madden FN (1998) Nonlinear pharmacokinetics of tissue-type

- plasminogen activator in three animal species: a comparison of mathematical models. *Biopharm Drug Dispos* 19:131–40.
- Goetz JG, Lajoie P, Wiseman SM, Nabi IR (2008) Caveolin-1 in tumor progression: The good, the bad and the ugly. *Cancer Metastasis Rev* 27:715–35.
- Goyal M, Yu AYX, Menon BK, Dippel DWJ, Hacke W, Davis SM, Fisher M, Yavagal DR, Turjman F, Ross J, Yoshimura S, Miao Z, Bhatia R, Almekhlafi M, Murayama Y, Sohn S II, Saver JL, Demchuk AM, Hill MD (2016) Endovascular Therapy in Acute Ischemic Stroke: Challenges and Transition from Trials to Bedside. *Stroke* 47:548–53.
- Graeber MB, Streit WJ (2010) Microglia: Biology and pathology. *Acta Neuropathol* 119:89–105.
- Gravanis I, Tsirka SE (2008) Tissue-type plasminogen activator as a therapeutic target in stroke. *Expert Opin Ther Targets* 12:159–70.
- Grotta JC, Hacke W (2015) Stroke Neurologist's Perspective on the New Endovascular Trials. *Stroke* 46:1447–52.
- Gu Y, Zheng G, Xu M, Li Y, Chen X, Zhu W, Tong Y, Chung SK, Liu KJ, Shen J (2012) Caveolin-1 regulates nitric oxide-mediated matrix metalloproteinases activity and blood-brain barrier permeability in focal cerebral ischemia and reperfusion injury. *J Neurochem* 120:147–56.
- Gu Z, Kaul M, Yan B, Kridel SJ, Cui J, Strongin A, Smith JW, Liddington RC, Lipton SA (2002) S-nitrosylation of matrix metalloproteinases: Signaling pathway to neuronal cell death. *Science* (80- ) 297:1186–90.
- Gubern C, Hurtado O, Rodríguez R, Morales JR, Romera VG, Moro MA, Lizasoain I, Serena J, Mallolas J (2009) Validation of housekeeping genes for quantitative real-time PCR in in-vivo and in-vitro models of cerebral ischaemia. *BMC Mol Biol* 10:57.
- Gupta IR, Ryan AK (2010) Claudins: Unlocking the code to tight junction function during embryogenesis and in disease. *Clin Genet* 77:314–25.
- Gürsoy-Özdemir Y, Can A, Dalkara T (2004) Reperfusion-induced oxidative/nitrative injury to neurovascular unit after focal cerebral ischemia. *Stroke* 35:1449–53.
- Ha SN, Hochman J, Sheridan RP (2007) Mini review on molecular modeling of P-glycoprotein (Pgp). *Curr Top Med Chem* 7:1525–9.
- Hacke W, Kaste M, Bluhmki E, Brozman M, Dávalos A, Guidetti D, Larrue V, Lees KR, 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.
- Haile WB, Wu J, Echeverry R, Wu F, An J, Yepes M (2012) Tissue-type plasminogen activator has a neuroprotective effect in the ischemic brain mediated by neuronal TNF- $\alpha$ . *J Cereb Blood Flow Metab* 32:57–69.
- Hamann GF, Burggraf D, Martens HK, Liebetrau M, Jäger G, Wunderlich N, DeGeorgia M, Krieger DW (2004) Mild to Moderate Hypothermia Prevents Microvascular Basal Lamina Antigen Loss in Experimental Focal Cerebral Ischemia. *Stroke* 35:764–9.
- Hansen CG, Nichols BJ (2010) Exploring the caves: Cavins, caveolins and caveolae. *Trends Cell Biol* 20:177–86.
- Haorah J, Ramirez SH, Schall K, Smith D, Pandya R, Persidsky Y (2007) Oxidative stress activates protein tyrosine kinase and matrix metalloproteinases leading to blood-brain barrier dysfunction. *J Neurochem* 101:566–76.
- Hatakeyama T, Matsumoto M, Brengman JM, Yanagihara T (1988) Immunohistochemical investigation of ischemic and postischemic damage after bilateral carotid occlusion in gerbils. *Stroke* 19:1526–34.
- Henninger DD, Panés J, Eppihimer M, Russell J, Gerritsen M, Anderson DC, Granger DN (1997) Cytokine-induced VCAM-1 and ICAM-1 expression in different organs of the mouse. *J Immunol* 158:1825–32.



- Heo JH, Lucero J, Abumiya T, Koziol JA, Copeland BR, Del Zoppo GJ (1999) Matrix metalloproteinases increase very early during experimental focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 19:624–33.
- Herz J, Strickland DK (2001) LRP: A multifunctional scavenger and signaling receptor. *J Clin Invest* 108:779–84.
- Hill NC, Millikan CH, Wakim KG, Sayre GP (1995) Studies in cerebrovascular disease. VII. Experimental production of cerebral infarction by intracarotid injection of homologous blood clot; preliminary report. *Proc Staff Meet Mayo Clin* 30(26):625-33.
- Hiu T, Nakagawa S, Hayashi K, Kitagawa N, Tsutsumi K, Kawakubo J, Honda M, Suyama K, Nagata I, Niwa M (2008) Tissue plasminogen activator enhances the hypoxia/reoxygenation-induced impairment of the blood-brain barrier in a primary culture of rat brain endothelial cells. *Cell Mol Neurobiol* 28:1139–46.
- Holloway PM, Gavins FNE (2016) Modeling Ischemic Stroke *in vitro*: Status Quo and Future Perspectives. *Stroke* 47:561–69.
- Horowitz A, Seerapu HR (2012) Regulation of VEGF signaling by membrane traffic. *Cell Signal* 24:1810–20.
- Hu G, Ye RD, Dinauer MC, Malik AB, Minshall RD (2007) Neutrophil caveolin-1 expression contributes to mechanism of lung inflammation and injury. *AJP Lung Cell Mol Physiol* 294:178–86.
- Hu X, Du S, Yu J, Yang X, Yang C, Zhou D, Wang Q, Qin S, Yan X, He L, Han D, Wan C (2016) Common housekeeping proteins are upregulated in colorectal adenocarcinoma and hepatocellular carcinoma, making the total protein a better "housekeeper". *Oncotarget* 7(41):66679-88.
- Hu Y, Li R, Yang H, Luo H, Chen Z (2015) Sirtuin 6 is essential for sodium sulfide-mediated cytoprotective effect in ischemia/reperfusion-stimulated brain endothelial cells. *J Stroke Cerebrovasc Dis* 24:601–9.
- Huang J, Upadhyay UM, Tamargo RJ (2006) Inflammation in stroke and focal cerebral ischemia. *Surg Neurol* 66:232–45.
- Huppert J, Closhen D, Croxford A, White R, Kulig P, Pietrowski E, Bechmann I, Becher B, Luhmann HJ, Waisman A, Kuhlmann CRW (2010) Cellular mechanisms of IL-17-induced blood-brain barrier disruption. *FASEB J* 24:1023–34.
- Iizuka M (1994) Quantitative RT-PCR Assay Detecting the Transcriptional Induction of Vascular Endothelial Growth Factor Under Hypoxia. *Biochem Biophys Res Commun* 205:1474–80.
- Ikezu T, Ueda H, Trapp BD, Nishiyama K, Sha JF, Volonte D, Galbiati F, Byrd AL, Bassell G, Serizawa H, Lane WS, Lisanti MP, Okamoto T (1998) Affinity-purification and characterization of caveolins from the brain: Differential expression of caveolin-1, -2, and -3 in brain endothelial and astroglial cell types. *Brain Res* 804:177–92.
- Indyk JA, Chen ZL, Tsrirka SE, Strickland S (2003) Laminin chain expression suggests that laminin-10 is a major isoform in the mouse hippocampus and is degraded by the tissue plasminogen activator/plasmin protease cascade during excitotoxic injury. *Neuroscience* 116:359–71.
- Institute for Health Metrics and Evaluation (2017) Global Health Data Exchange: GBD Results Tool. Available at: <http://ghdx.healthdata.org/gbd-results-tool?params=gbd-api-2017-permalink/b2b30387815a57fbbd2f246fab510337> [Accessed April 25, 2019].
- Jamieson JJ, Searson PC, Gerecht S (2017) Engineering the human blood-brain barrier *in vitro*. *J Biol Eng* 11:37.
- Janzer RC, Raff MC (1987) Astrocytes induce blood-brain barrier properties in endothelial cells. *Nature* 325:253–7.
- Jasmin J-F, Malhotra S, Singh Dhallu M, Mercier I, Rosenbaum DM, Lisanti MP (2007) Caveolin-1 deficiency increases cerebral ischemic injury. *Circ Res* 100:721–9.
- Jiang Y et al. (2017) Critical role of caveolin-1 in ocular neovascularization and multitargeted antiangiogenic effects of cavtratin via JNK. *Proc Natl Acad Sci* 114:10737–42.
- Jiao H, Zhang Y, Yan Z, Wang Z-G, Liu G, Minshall RD, Malik AB, Hu G (2013) Caveolin-1 Tyr14 Phosphorylation

- Induces Interaction with TLR4 in Endothelial Cells and Mediates MyD88-Dependent Signaling and Sepsis-Induced Lung Inflammation. *J Immunol* 191:6191–9.
- Jickling GC, Liu D, Stamova B, Ander BP, Zhan X, Lu A, Sharp FR (2014) Hemorrhagic transformation after ischemic stroke in animals and humans. *J Cereb Blood Flow Metab* 34:185–99.
- Jin K, Wang X, Xie L, Mao XO, Greenberg DA (2010a) Transgenic ablation of doublecortin-expressing cells suppresses adult neurogenesis and worsens stroke outcome in mice. *Proc Natl Acad Sci* 107:7993–8.
- Jin R, Yang G, Li G (2010b) Molecular insights and therapeutic targets for blood-brain barrier disruption in ischemic stroke: Critical role of matrix metalloproteinases and tissue-type plasminogen activator. *Neurobiol Dis* 38:376–85.
- Jin R, Yang G, Li G (2010c) Inflammatory mechanisms in ischemic stroke: role of inflammatory cells. *J Leukoc Biol* 87:779–89.
- Jin X, Sun Y, Xu J, Liu W (2015) Caveolin-1 mediates tissue plasminogen activator-induced MMP-9 up-regulation in cultured brain microvascular endothelial cells. *J Neurochem* 132:724–30.
- Jögi A, Øra I, Nilsson H, Lindeheim A, Makino Y, Poellinger L, Axelson H, Pählman S (2002) Hypoxia alters gene expression in human neuroblastoma cells toward an immature and neural crest-like phenotype. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:7021–26.
- Johnson-Léger CA, Aurrand-Lions M, Beltraminelli N, Fasel N, Imhof BA (2002) Junctional adhesion molecule-2 (JAM-2) promotes lymphocyte transendothelial migration. *Blood* 100:2479–86.
- Justicia C, Panés J, Solé S, Cervera Á, Deulofeu R, Chamorro Á, Planas AM (2003) Neutrophil Infiltration Increases Matrix Metalloproteinase-9 in the Ischemic Brain after Occlusion/Reperfusion of the Middle Cerebral Artery in Rats. *J Cereb Blood Flow Metab* 23:1430–40.
- Khatri P, Wechsler LR, Broderick JP (2007) Intracranial hemorrhage associated with revascularization therapies. *Stroke* 38:431–40.
- Kim SY, Cheon SY, Kim EJ, Lee JH, Kam EH, Kim JM, Park M, Koo BN (2017) Isoflurane Postconditioning Inhibits tPA-Induced Matrix Metalloproteinases Activation After Hypoxic Injury via Low-Density Lipoprotein Receptor-Related Protein and Extracellular Signal-Regulated Kinase Pathway. *Neurochem Res* 42:1533–42.
- Klohs J, Steinbrink J, Bourayou R, Mueller S, Cordell R, Licha K, Schirner M, Dirnagl U, Lindauer U, Wunder A (2009) Near-infrared fluorescence imaging with fluorescently labeled albumin: A novel method for non-invasive optical imaging of blood-brain barrier impairment after focal cerebral ischemia in mice. *J Neurosci Methods* 180:126–32.
- Knowland D, Arac A, Sekiguchi KJ, Hsu M, Lutz SE, Perrino J, Steinberg GK, Barres BA, Nimmerjahn A, Agalliu D (2014) Stepwise Recruitment of Transcellular and Paracellular Pathways Underlies Blood-Brain Barrier Breakdown in Stroke. *Neuron* 82:603–17.
- Krupinski J, Kaluza J, Kumar P, Kumar S, Wang JM (1994) Role of angiogenesis in patients with cerebral ischemic stroke. *Stroke* 25:1794–8.
- Ku JM, Taher M, Chin KY, Grace M, McIntyre P, Miller AA (2016) Characterisation of a mouse cerebral microvascular endothelial cell line (bEnd.3) after oxygen glucose deprivation and reoxygenation. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 43:777–86.
- Kumar K, Savithiry S, Madhukar B V (1993) Comparison of a-tubulin mRNA and heat shock protein-70 mRNA in gerbil brain following 10 min of ischemia. *Brain Res Mol Brain Res* 1-2:130–6.
- Kurien BT, Hal Scofield R (2015) Western blotting: An introduction. In: *Western Blotting: Methods and Protocols* 17–30.
- Lakhan SE, Kirchgessner A, Hofer M (2009) Inflammatory mechanisms in ischemic stroke: Therapeutic approaches. *J Transl Med* 7:97.

- LaMonte MP (2002) Argatroban in thrombotic stroke. *Pathophysiol Haemost Thromb* 32:39–45.
- Lapchak PA, Chapman DF, Zivin JA (2000) Metalloproteinase inhibition reduces thrombolytic (tissue plasminogen activator)-induced hemorrhage after thromboembolic stroke. *Stroke* 31:3034–40.
- Lapchak PA, Chapman DF, Zivin JA (2001) Pharmacological Effects of the Spin Trap Agents N-t-Butyl-Phenylnitron (PBN) and 2,2,6,6-Tetramethylpiperidine-N-Oxyl (TEMPO) in a Rabbit Thromboembolic Stroke Model. *Stroke* 32:147–53.
- Larrue V, von Kummer R, Müller A, Bluhmki E (2001) Risk Factors for Severe Hemorrhagic Transformation in Ischemic Stroke Patients Treated With Recombinant Tissue Plasminogen Activator. *Stroke* 32:438–41.
- Larsen J, Martin D, Byrne M (2014) Recent Advances in Delivery Through the Blood-Brain Barrier. *Curr Top Med Chem* 14:1148–60.
- Larson DM, Carson MP, Haudenschild CC (1987) Junctional transfer of small molecules in cultured bovine brain microvascular endothelial cells and pericytes. *Microvasc Res* 34:184–99.
- Latour LL, Kang DW, Ezzeddine MA, Chalela JA, Warach S (2004) Early blood-brain barrier disruption in human focal brain ischemia. *Ann Neurol* 56:468–77.
- Lee H, Volonte' D, Galbiati F, Iyengar P, Lublin DM, Bregman DB, Wilson MT, Campos-Gonzalez Boumediene Bouzahza R, Pestell RG, Scherer PE, Lisanti MP (2000) Constitutive and Growth Factor-Regulated Phosphorylation of Caveolin-1 Occurs at the Same Site (Tyr-14) *in Vivo*: Identification of a c-Src/Cav-1/Grb7 Signaling Cassette. *Mol Endocrinol* 14:1750–75.
- Lee S-R, Wang X, Tsuji K, Lo EH (2004) Extracellular proteolytic pathophysiology in the neurovascular unit after stroke. *Neurol Res* 26:854–61.
- Li G, Simon MJ, Cancel LM, Shi ZD, Ji X, Tarbell JM, Morrison B, Fu BM (2010) Permeability of endothelial and astrocyte cocultures: *In vitro* Blood-brain barrier models for drug delivery studies. *Ann Biomed Eng* 38:2499–511.
- Li JY, Boado RJ, Pardridge WM (2001) Blood-brain barrier genomics. *J Cereb Blood Flow Metab* 21:61–8.
- Li P, Murphy TH (2008) Two-Photon Imaging during Prolonged Middle Cerebral Artery Occlusion in Mice Reveals Recovery of Dendritic Structure after Reperfusion. *J Neurosci* 28:11970–9.
- Li S, Galbiati F, Volonte' D, Sargiacomo M, Engelman JA, Das K, Scherer PE, Lisanti MP (1998) Mutational analysis of caveolin-induced vesicle formation. Expression of caveolin-1 recruits caveolin-2 to caveolae membranes. *FEBS Lett* 434:127–34.
- Li S, Seitz R, Lisanti MP (1996) Phosphorylation of caveolin by Src tyrosine kinases: The  $\alpha$ -isoform of caveolin is selectively phosphorylated by v-Src *in vivo*. *J Biol Chem* 271:3863–8.
- Li Y, Liu LB, Ma T, Wang P, Xue YX (2015) Effect of caveolin-1 on the expression of tight junction-associated proteins in rat glioma-derived microvascular endothelial cells. *Int J Clin Exp Pathol* 8:13067–74.
- Liebner S, Corada M, Bangsow T, Babbage J, Taddei A, Czupalla CJ, Reis M, Felici A, Wolburg H, Fruttiger M, Taketo MM, Von Melchner H, Plate KH, Gerhardt H, Dejana E (2008) Wnt/ $\beta$ -catenin signaling controls development of the blood - brain barrier. *J Cell Biol* 183:409–17.
- Lijnen HR (2006) Elements of the Fibrinolytic System. *Ann N Y Acad Sci* 936:226–36.
- Liu J, Jin X, Liu KJ, Liu W (2012a) Matrix Metalloproteinase-2-Mediated Occludin Degradation and Caveolin-1-Mediated Claudin-5 Redistribution Contribute to Blood-Brain Barrier Damage in Early Ischemic Stroke Stage. *J Neurosci* 32:3044–57.
- Liu J, Weaver J, Jin X, Zhang Y, Xu J, Liu KJ, Li W, Liu W (2016a) Nitric Oxide Interacts with Caveolin-1 to Facilitate Autophagy-Lysosome-Mediated Claudin-5 Degradation in Oxygen-Glucose Deprivation-Treated Endothelial Cells. *Mol Neurobiol* 53:5935–47.
- Liu S, Agalliu D, Yu C, Fisher M (2012b) The Role of Pericytes in Blood-Brain Barrier Function and Stroke. *Curr*

- Pharm Des 18:3653–62.
- Liu WY, Wang Z Bin, Wang Y, Tong LC, Li Y, Wei X, Luan P, Li L (2015) Increasing the Permeability of the Blood-brain Barrier in Three Different Models *in vivo*. *CNS Neurosci Ther* 21:568–74.
- Liu Y, Jiang S, Yang PY, Zhang YF, Li TJ, Rui YC (2016b) EF1A1/HSC70 Cooperatively Suppress Brain Endothelial Cell Apoptosis via Regulating JNK Activity. *CNS Neurosci Ther* 22:836–44.
- Lo EH (2008) Experimental models, neurovascular mechanisms and translational issues in stroke research. *Br J Pharmacol* 153 Suppl 1:S396-405.
- Lo EH, Wang X, Louise Cuzner M (2002) Extracellular proteolysis in brain injury and inflammation: Role for plasminogen activators and matrix metalloproteinases. *J Neurosci Res* 69:1–9.
- Löscher W, Potschka H (2005) Blood-brain barrier active efflux transporters: ATP-binding cassette gene family. *NeuroRx* 2:86–98.
- Lucas SM, Rothwell NJ, Gibson RM (2006) The role of inflammation in CNS injury and disease. *Br J Pharmacol* 147 Suppl 1:S232-40.
- Luo D, Zhao J, Rong J (2016) Plant-derived triterpene celastrol ameliorates oxygen glucose deprivation-induced disruption of endothelial barrier assembly via inducing tight junction proteins. *Phytomedicine* 23:1621–8.
- Ma XL, Liu KD, Li FC, Jiang XM, Jiang L, Li HL (2013) Human mesenchymal stem cells increases expression of alpha-tubulin and angiopoietin 1 and 2 in focal cerebral ischemia and reperfusion. *Curr Neurovasc Res* 10:103–11.
- MacRez R, Bezin L, Le Mauff B, Ali C, Vivien D (2010) Functional occurrence of the interaction of tissue plasminogen activator with the NR1 subunit of N-methyl-d-aspartate receptors during stroke. *Stroke* 41:2950–5.
- Majesky MW (2007) Developmental basis of vascular smooth muscle diversity. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 27:1248–58.
- Mandyam CD, Schilling JM, Cui W, Egawa J, Niesman IR, Kellerhals SE, Staples MC, Busija AR, Risbrough VB, Posadas E, Grogman GC, Chang JW, Roth DM, Patel PM, Patel HH, Head BP (2017) Neuron-Targeted Caveolin-1 Improves Molecular Signaling, Plasticity, and Behavior Dependent on the Hippocampus in Adult and Aged Mice. *Biol Psychiatry* 81:101–10.
- Maneen MJ, Hannah R, Vitullo L, DeLance N, Cipolla MJ (2006) Peroxynitrite diminishes myogenic activity and is associated with decreased vascular smooth muscle F-actin in rat posterior cerebral arteries. *Stroke* 37:894–9.
- Martin-Padura I, Lostaglio S, Schneemann M, Williams L, Romano M, Fruscella P, Panzeri C, Stoppacciaro A, Ruco L, Villa A, Simmons D, Dejana E (1998) Junctional adhesion molecule, a novel member of the immunoglobulin superfamily that distributes at intercellular junctions and modulates monocyte transmigration. *J Cell Biol* 142:117–27.
- Martin HGS, Wang YT (2010) Blocking the Deadly Effects of the NMDA Receptor in Stroke. *Cell* 140:174–6.
- Mattson MP, Culmsee C, Zai FY (2000) Apoptotic and antiapoptotic mechanisms in stroke. *Cell Tissue Res* 301:173–87.
- Mattson MP, Duan W, Pedersen WA, Culmsee C (2001) Neurodegenerative disorders and ischemic brain diseases. *Apoptosis* 6:69–81.
- McColl BW, Allan SM, Rothwell NJ (2009) Systemic infection, inflammation and acute ischemic stroke. *Neuroscience* 158:1049–61.
- McDonough AA, Veiras LC, Minas JN, Ralph DL (2014) Considerations when quantitating protein abundance by immunoblot. *Am J Physiol Physiol* 308:426–33.

- Medcalf RL, Davis SM (2012) Plasminogen activation and thrombolysis for ischemic stroke. *Int J Stroke* 7:419–25.
- Mehta SL, Manhas N, Raghubir R (2007) Molecular targets in cerebral ischemia for developing novel therapeutics. *Brain Res Rev* 54:34–66.
- Meldgaard M, Fenger C, Lambertsen KL, Pedersen MD, Ladeby R, Finsen B (2006) Validation of two reference genes for mRNA level studies of murine disease models in neurobiology. *J Neurosci Methods* 156:101–10.
- Minoura I (2016) Towards an understanding of the isotype-specific functions of tubulin in neurons: Technical advances in tubulin expression and purification. *Neurosci Res* 122:1–8.
- Miranda E, Lomas DA (2006) Neuroserpin: A serpin to think about. *Cell Mol Life Sci* 63:709–22.
- Mishiro K, Ishiguro M, Suzuki Y, Tsuruma K, Shimazawa M, Hara H (2012) A broad-spectrum matrix metalloproteinase inhibitor prevents hemorrhagic complications induced by tissue plasminogen activator in mice. *Neuroscience* 205:39–48.
- Mishiro K, Ishiguro M, Suzuki Y, Tsuruma K, Shimazawa M, Hara H (2013) Tissue plasminogen activator prevents restoration of tight junction proteins through upregulation of angiotensin-2. *Curr Neurovasc Res* 10:39–48.
- Mittapalli RK, Manda VK, Adkins CE, Geldenhuys WJ, Lockman PR (2010) Exploiting nutrient transporters at the blood-brain barrier to improve brain distribution of small molecules. *Ther Deliv* 1:775–84.
- Miyamoto T, Morita K, Takemoto D, Takeuchi K, Kitano Y, Miyakawa T, Nakayama K, Okamura Y, Sasaki H, Miyachi Y, Furuse M, Tsukita S (2005) Tight junctions in Schwann cells of peripheral myelinated axons: A lesson from claudin-19-deficient mice. *J Cell Biol* 169:527–38.
- Montaner J, Molina CA, Monasterio J, Abilleira S, Arenillas JF, Ribó M, Quintana M, Alvarez-Sabín J (2003) Matrix metalloproteinase-9 pretreatment level predicts intracranial hemorrhagic complications after thrombolysis in human stroke. *Circulation* 107:598–603.
- Montesano R, Pepper MS, Möhle-Steinlein U, Risau W, Wagner EF, Orci L (1990) Increased proteolytic activity is responsible for the aberrant morphogenetic behavior of endothelial cells expressing the middle T oncogene. *Cell* 62:435–45.
- Mora R, Bonilha VL, Marmorstein A, Scherer PE, Brown D, Lisanti MP, Rodriguez-Boulan E (1999) Caveolin-2 localizes to the Golgi complex but redistributes to plasma membrane, caveolae, and rafts when co-expressed with caveolin-1. *J Biol Chem* 274:25708–17.
- Morita K, Sasaki H, Furuse M, Tsukita S (1999) Endothelial claudin: Claudin-5/TMVCF constitutes tight junction strands in endothelial cells. *J Cell Biol* 147:185–94.
- Morris ME, Rodriguez-Cruz V, Felmler MA (2017) SLC and ABC Transporters: Expression, Localization, and Species Differences at the Blood-Brain and the Blood-Cerebrospinal Fluid Barriers. *AAPS J* (5):1317-31.
- Moskowitz MA, Lo EH, Iadecola C (2010) The science of stroke: Mechanisms in search of treatments. *Neuron* 67:181–98.
- Mosnier LO, Zlokovic B V, Griffin JH (2007) The cytoprotective protein C pathway. *Blood* 109(8):3161-72.
- Mrak RE, Griffin WST (2005) Glia and their cytokines in progression of neurodegeneration. *Neurobiol Aging* 349–54.
- Muralikrishna Adibhatta R, Hatcher JF (2008) Tissue Plasminogen Activator (tPA) and Matrix Metalloproteinases in the Pathogenesis of Stroke: Therapeutic Strategies. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 7:243–53.
- Nag S, Manias JL, Stewart DJ (2009) Expression of endothelial phosphorylated caveolin-1 is increased in brain injury. *Neuropathol Appl Neurobiol* 35:417–26.

- Nag S, Venugopalan R, Stewart DJ (2007) Increased caveolin-1 expression precedes decreased expression of occludin and claudin-5 during blood-brain barrier breakdown. *Acta Neuropathol* 114:459–69.
- Nagyoszi P, Wilhelm I, Farkas AE, Fazakas C, Dung NTK, Haskó J, Krizbai IA (2010) Expression and regulation of toll-like receptors in cerebral endothelial cells. *Neurochem Int* 57:556–64.
- Naik P, Cucullo L (2012) *In vitro* blood-brain barrier models: Current and perspective technologies. *J Pharm Sci* 101:1337–54.
- Nakagawa S, Deli MA, Kawaguchi H, Shimizudani T, Shimono T, Kittel Á, Tanaka K, Niwa M (2009) A new blood-brain barrier model using primary rat brain endothelial cells, pericytes and astrocytes. *Neurochem Int* 54:253–63.
- Nicolazzo JA, Charman SA, Charman WN (2006) Methods to assess drug permeability across the blood-brain barrier. *J Pharm Pharmacol* 58:281–93.
- Nicole O, Docagne F, Ali C, Margail I, Carmeliet P, Mackenzie ET, Vivien D, Buisson A (2001) The proteolytic activity of tissue-plasminogen activator enhances NMDA receptor-mediated signaling. *Nat Med* 7(1):59–64.
- Niego B, Freeman R, Puschmann TB, Turnley AM, Medcalf RL (2012) t-PA-specific modulation of a human blood-brain barrier model involves plasmin-mediated activation of the Rho kinase pathway in astrocytes. *Blood* 119:4752–61.
- Niesman IR, Zemke N, Fridolfsson HN, Haushalter KJ, Levy K, Grove A, Schnoor R, Finley JC, Patel PM, Roth DM, Head BP, Patel HH (2013) Caveolin isoform switching as a molecular, structural, and metabolic regulator of microglia. *Mol Cell Neurosci* 56:283–97.
- Nishiyama K, Trapp BD, Ikezu T, Ransohoff RM, Tomita T, Iwatsubo T, Kanazawa I, Hsiao KK, Lisanti MP, Okamoto T (1999) Caveolin-3 upregulation activates  $\beta$ -secretase-mediated cleavage of the amyloid precursor protein in Alzheimer's disease. *J Neurosci* 19:6538–48.
- Noell S, Wolburg-Buchholz K, Mack AF, Beedle AM, Satz JS, Campbell KP, Wolburg H, Fallier-Becker P (2011) Evidence for a role of dystroglycan regulating the membrane architecture of astroglial endfeet. *Eur J Neurosci* 33:2179–86.
- O. Ogunshola O (2012) *In vitro* Modeling of the Blood-Brain Barrier: Simplicity Versus Complexity. *Curr Pharm Des* 17:2755–61.
- O'Donnell MJ et al. (2010) Risk factors for ischaemic and intracerebral haemorrhagic stroke in 22 countries (the INTERSTROKE study): A case-control study. *Lancet* 376:112–23.
- Oakley FO, Smith RL, Engelhardt JF (2009) Lipid rafts and caveolin-1 coordinate interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ )-dependent activation of NF $\kappa$ B by controlling endocytosis of Nox2 and IL-1 $\beta$  receptor 1 from the plasma membrane. *J Biol Chem* 284:33255–64.
- Ohtsuki S, Hirayama M, Ito S, Uchida Y, Tachikawa M, Terasaki T (2014) Quantitative targeted proteomics for understanding the blood-brain barrier: Towards pharmacoproteomics. *Expert Rev Proteomics* 11:303–13.
- Orlowski M, Sessa G, Green JP (1974)  $\gamma$ -Glutamyl transpeptidase in brain capillaries: Possible site of a blood-brain barrier for amino acids. *Science* (80- ) 184:66–8.
- Overgaard K, Sereghy T, Boysen G, Pedersen H, Høyer S, Diemer NH (1992) A rat model of reproducible cerebral infarction using thrombotic blood clot emboli. *J Cereb Blood Flow Metab* 12:484–490.
- Pacher P, Beckman JS, Liaudet L (2007) Nitric Oxide and Peroxynitrite in Health and Disease. *Physiol Rev* 87:315–424.
- Pang Q, Zhang H, Chen Z, Wu Y, Bai M, Liu Y, Zhao Y, Tu F, Liu C, Chen X (2017) Role of caveolin-1/vascular endothelial growth factor pathway in basic fibroblast growth factor-induced angiogenesis and neurogenesis after treadmill training following focal cerebral ischemia in rats. *Brain Res* 1663:9–19.

- Panickar KS, Qin B, Anderson RA (2014) Ischemia-induced endothelial cell swelling and mitochondrial dysfunction are attenuated by cinnamtannin D1, green tea extract, and resveratrol *in vitro*. *Nutr Neurosci* 18:297–306.
- Parat MO (2009) Chapter 4 The Biology of Caveolae. Achievements and Perspectives. *Int Rev Cell Mol Biol* 273:117–62.
- Parton RG, Simons K (2007) The multiple faces of caveolae. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8:185–94.
- Peppiatt CM, Howarth C, Mobbs P, Attwell D (2006) Bidirectional control of CNS capillary diameter by pericytes. *Nature* 443:700–4.
- Peterson TE, Guicciardi ME, Gulati R, Kleppe LS, Mueske CS, Mookadam M, Sowa G, Gores GJ, Sessa WC, Simari RD (2003) Caveolin-1 can regulate vascular smooth muscle cell fate by switching platelet-derived growth factor signaling from a proliferative to an apoptotic pathway. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23:1521–7.
- Piantadosi CA, Zhang J (1996) Mitochondrial generation of reactive oxygen species after brain ischemia in the rat. *Stroke* 27:327–32.
- Polavarapu R, Gongora MC, Yi H, Ranganthan S, Lawrence DA, Strickland D, Yepes M (2007) Tissue-type plasminogen activator-mediated shedding of astrocytic low-density lipoprotein receptor-related protein increases the permeability of the neurovascular unit. *Blood* 109:3270–8.
- Posch A, Kohn J, Oh K, Hammond M, Liu N (2013) V3 Stain-free Workflow for a Practical, Convenient, and Reliable Total Protein Loading Control in Western Blotting. *J Vis Exp* (82):50948.
- Prieto-Arribas R, Moreno-Gutierrez A, Simal-Hernandez P, Pascual-Garvi JM, Matias-Guiu J, Roda JM, Barcia-Albacar JA (2008) [Experimental models of cerebral ischemia]. *Rev Neurol* 47:414–26.
- Rabinstein AA (2017) Treatment of Acute Ischemic Stroke. *Contin Lifelong Learn Neurol* 23:62–81.
- Razani B, Wang XB, Engelman JA, Battista M, Lagaud G, Zhang XL, Kneitz B, Hou H, Christ GJ, Edelmann W, Lisanti MP (2002) Caveolin-2-deficient mice show evidence of severe pulmonary dysfunction without disruption of caveolae. *Mol Cell Biol* 22:2329–44.
- Reese TS, Karnovsky MJ (1967) Fine structural localization of a blood-brain barrier to exogenous peroxidase. *J Cell Biol* 34:207–17.
- Rijken DC (1995) Plasminogen activators and plasminogen activator inhibitors: biochemical aspects. *Baillieres Clin Haematol* 8:291–312.
- Rijken DC, Lijnen HR (2009) New insights into the molecular mechanisms of the fibrinolytic system. *J Thromb Haemost* 7:4–13.
- Rivero-Gutiérrez B, Anzola A, Martínez-Augustin O, De Medina FS (2014) Stain-free detection as loading control alternative to Ponceau and housekeeping protein immunodetection in Western blotting. *Anal Biochem* 467:1–3.
- Rogove A, Siao C, Keyt B, Strickland S, Tsirka S (1999) Activation of microglia reveals a non-proteolytic cytokine function for tissue plasminogen activator in the central nervous system. *J Cell Sci* 112:4007–16.
- Romeo Cecchelli, Vincent Berezowski, Stefan Lundquist, Maxime Culot, Mila Renftel, Marie-Pierre Dehouck, Fenart L (2007) Modelling of the blood-brain barrier in drug discovery and development. *Nat Rev Drug Discov* 6:650–61.
- Romero IA, Radewicz K, Jubin E, Michel CC, Greenwood J, Couraud PO, Adamson P (2003) Changes in cytoskeletal and tight junctional proteins correlate with decreased permeability induced by dexamethasone in cultured rat brain endothelial cells. *Neurosci Lett* 344:112–6.
- Rosell A, Cuadrado E, Ortega-Aznar A, Hernández-Guillamon M, Lo EH, Montaner J (2008) MMP-9-positive neutrophil infiltration is associated to blood-brain barrier breakdown and basal lamina type IV collagen degradation during hemorrhagic transformation after human ischemic stroke. *Stroke* 39:1121–6.

- Rosell A, Ortega-Aznar A, Alvarez-Sabín J, Fernández-Cadenas I, Ribó M, Molina CA, Lo EH, Montaner J (2006) Increased brain expression of matrix metalloproteinase-9 after ischemic and hemorrhagic human stroke. *Stroke* 37:1399–406.
- Rosenberg GA, Yang Y (2007) Vasogenic edema due to tight junction disruption by matrix metalloproteinases in cerebral ischemia. *Neurosurg Focus* 22:E4.
- Ross AM, Hurn P, Perrin N, Wood L, Carlini W, Potempa K (2007) Evidence of the Peripheral Inflammatory Response in Patients With Transient Ischemic Attack. *J Stroke Cerebrovasc Dis* 16:203–7.
- Rothberg KG, Heuser JE, Donzell WC, Ying YS, Glenney JR, Anderson RGW (1992) Caveolin, a protein component of caveolae membrane coats. *Cell* 68:673–82.
- Ruhnau J, Schulze J, Dressel A, Vogelgesang A (2017) Thrombosis, Neuroinflammation, and Poststroke Infection: The Multifaceted Role of Neutrophils in Stroke. *J Immunol Res* 2017 id:5140679.
- Sacco RL et al. (2013) An updated definition of stroke for the 21st century: A statement for healthcare professionals from the American heart association/American stroke association. *Stroke* 44:2064–89.
- Saeed SA, Shad KF, Saleem T, Javed F, Khan MU (2007) Some new prospects in the understanding of the molecular basis of the pathogenesis of stroke. *Exp Brain Res* 182:1–10.
- Saitou M, Furuse M, Sasaki H, Schulzke J-D, Fromm M, Takano H, Noda T, Tsukita S (2000) Complex Phenotype of Mice Lacking Occludin, a Component of Tight Junction Strands. *Mol Biol Cell* 11:4131–42.
- Samson AL, Nevin ST, Croucher D, Niego B, Daniel PB, Weiss TW, Moreno E, Monard D, Lawrence DA, Medcalf RL (2008) Tissue-type plasminogen activator requires a co-receptor to enhance NMDA receptor function. *J Neurochem* 107:1091–101.
- Sandoval KE, Witt KA (2008) Blood-brain barrier tight junction permeability and ischemic stroke. *Neurobiol Dis* 32:200–19.
- Sappino AP, Madani R, Huarte J, Belin D, Kiss JZ, Wohlwend A, Vassalli JD (1993) Extracellular proteolysis in the adult murine brain. *J Clin Invest* 92:679–85.
- Saver JL, Gornbein J, Starkman S (2010) Graphic reanalysis of the two NINDS-tPA trials confirms substantial treatment benefit. *Stroke* 41:2381–90.
- Schreibelt G, Kooij G, Reijerkerk A, van Doorn R, Gringhuis SI, van der Pol S, Weksler BB, Romero IA, Couraud P-O, Piontek J, Blasig IE, Dijkstra CD, Ronken E, de Vries HE (2007) Reactive oxygen species alter brain endothelial tight junction dynamics via RhoA, PI3 kinase, and PKB signaling. *FASEB J* 21:3666–76.
- Seeds NW, Siconolfi LB, Haffke SP (1997) Neuronal extracellular proteases facilitate cell migration, axonal growth, and pathfinding. *Cell Tissue Res* 290:367–70.
- Sheehan JJ, Tsirka SE (2005) Fibrin-modifying serine proteases thrombin, tPA, and plasmin in ischemic stroke: A review. *Glia* 50:340–50.
- Shen J, Ma S, Chan P, Lee W, Fung PCW, Cheung RTF, Tong Y, Liu KJ (2006) Nitric oxide down-regulates caveolin-1 expression in rat brains during focal cerebral ischemia and reperfusion injury. *J Neurochem* 96:1078–89.
- Shepro D, Morel NM (1993) Pericyte physiology. *FASEB J* 7:1031–38.
- Shin HK, Dunn AK, Jones PB, Boas DA, Moskowitz MA, Ayata C (2006) Vasoconstrictive neurovascular coupling during focal ischemic depolarizations. *J Cereb Blood Flow Metab* 26:1018–30.
- Shin JA, Yoon JC, Kim M, Park EM (2016) Activation of classical estrogen receptor subtypes reduces tight junction disruption of brain endothelial cells under ischemia/reperfusion injury. *Free Radic Biol Med* 92:78–89.
- Shin T, Kim H, Jin JK, Moon C, Ahn M, Tanuma N, Matsumoto Y (2005) Expression of caveolin-1, -2, and -3 in the spinal cords of Lewis rats with experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmunol*



165:11–20.

Shue EH, Carson-Walter EB, Liu Y, Winans BN, Ali ZS, Chen J, Walter KA (2008) Plasmalemmal vesicle associated protein-1 (PV-1) is a marker of blood-brain barrier disruption in rodent models. *BMC Neurosci* 9:29.

Siket MS (2016) Treatment of Acute Ischemic Stroke. *Emerg Med Clin North Am* 34:861–82.

Sims DE (1986) The pericyte-A review. *Tissue Cell* 18:153–74.

Snappyan M, Lemasson M, Brill MS, Blais M, Massouh M, Ninkovic J, Gravel C, Berthod F, Gotz M, Barker PA, Parent A, Saghatelian A (2009) Vasculature Guides Migrating Neuronal Precursors in the Adult Mammalian Forebrain via Brain-Derived Neurotrophic Factor Signaling. *J Neurosci* 29:4172–88.

Somjen GG (2001) Mechanisms of Spreading Depression and Hypoxic Spreading Depression-Like Depolarization. *Physiol Rev* 81:1065–96.

Sommer CJ (2017) Ischemic stroke: experimental models and reality. *Acta Neuropathol* 133:245–61.

Song H, Cheng Y, Bi G, Zhu Y, Jun W, Ma W, Wu H (2016) Release of matrix metalloproteinases-2 and 9 by S-nitrosylated caveolin-1 contributes to degradation of extracellular matrix in tPA-treated hypoxic endothelial cells. *PLoS One* 11:1–16.

Song L, Ge S, Pachter JS (2007) Caveolin-1 regulates expression of junction-associated proteins in brain microvascular endothelial cells. *Blood* 109:1515–23.

Sonveaux P, Martinive P, DeWever J, Batova Z, Daneau G, Pelat M, Ghisdal P, Grégoire V, Dessy C, Balligand JL, Feron O (2004) Caveolin-1 expression is critical for vascular endothelial growth factor-induced ischemic hindlimb collateralization and nitric oxide-mediated angiogenesis. *Circ Res* 95:154–61.

Sorokin L (2010) The impact of the extracellular matrix on inflammation. *Nat Rev Immunol* 10:712–23.

Stamatovic SM (2003) Potential role of MCP-1 in endothelial cell tight junction 'opening': signaling via Rho and Rho kinase. *J Cell Sci* 116:4615–28.

Stenman JM, Rajagopal J, Carroll TJ, Ishibashi M, McMahon J, McMahon AP (2008) Canonical Wnt signaling regulates organ-specific assembly and differentiation of CNS vasculature. *Science* (80-) 322:1247–50.

Sugawara T, Chan PH (2003) Reactive Oxygen Radicals and Pathogenesis of Neuronal Death After Cerebral Ischemia. *Antioxid Redox Signal* 5:597–607.

Suh SW, Shin BS, Ma H, Van Hoecke M, Brennan AM, Yenari MA, Swanson RA (2008) Glucose and NADPH oxidase drive neuronal superoxide formation in stroke. *Ann Neurol* 64:654–63.

Sumii T, Lo EEH (2002) Involvement of matrix metalloproteinase in thrombolysis-associated hemorrhagic transformation after embolic focal ischemia in rats. *Stroke* 33:831–6.

Suzuki Y, Nagai N, Umemura K (2016) A Review of the Mechanisms of Blood-Brain Barrier Permeability by Tissue-Type Plasminogen Activator Treatment for Cerebral Ischemia. *Front Cell Neurosci* 10:1–10.

Suzuki Y, Nagai N, Umemura K, Collen D, Lijnen HR (2007) Stromelysin-1 (MMP-3) is critical for intracranial bleeding after t-PA treatment of stroke in mice. *J Thromb Haemost* 5:1732–9.

Suzuki Y, Nagai N, Yamakawa K, Muranaka Y, Hokamura K, Umemura K (2015) Recombinant tissue-type plasminogen activator transiently enhances blood-brain barrier permeability during cerebral ischemia through vascular endothelial growth factor-mediated endothelial endocytosis in mice. *J Cereb Blood Flow Metab* 35:2021–31.

Tan S, Shan Y, Wang Y, Lin Y, Liao S, Deng Z, Zhou L, Cai W, Zeng Q, Zhang L, Zhang B, Men X, Li H, Hu X, Wu C, Peng L, Lu Z (2017) Exacerbation of oxygen-glucose deprivation-induced blood-brain barrier disruption: potential pathogenic role of interleukin-9 in ischemic stroke. *Clin Sci* 131:1499–513.

Tanaka R, Mochizuki H, Suzuki A, Katsube N, Ishitani R, Mizuno Y, Urabe T (2002) Induction of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) expression in rat brain after focal ischemia/reperfusion. *J Cereb*

- Blood Flow Metab 22:280–8.
- Tang XN, Zheng Z, Giffard RG, Yenari MA (2011) Significance of marrow-derived nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase in experimental ischemic stroke. *Ann Neurol* 70:606–15.
- Teismann IK, Suntrup S, Warnecke T, Steinsträter O, Fischer M, Flöel A, Ringelstein EB, Pantev C, Dziewas R (2011) Cortical swallowing processing in early subacute stroke. *BMC Neurol* 11:34.
- The National Institute of Neurological Disorders and Stroke rt-PA Stroke Study Group (NINDS Group) (1995) Tissue plasminogen activator for acute ischemic stroke. The National Institute of Neurological Disorders and Stroke rt-PA Stroke Study Group. *N Engl J Med* 333:1581–7.
- Thiebaut F, Tsuruo T, Hamada H, Gottesman MM, Pastan I, Willingham MC (1989) Immunohistochemical localization in normal tissues of different epitopes in the multidrug transport protein P170: evidence for localization in brain capillaries and crossreactivity of one antibody with a muscle protein. *J Histochem Cytochem* 37:159–64.
- Thyberg J (2003) Caveolin-1 and caveolae act as regulators of mitogenic signaling in vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23:1481–3.
- Tietz S, Engelhardt B (2015) Brain barriers: Crosstalk between complex tight junctions and adherens junctions. *J Cell Biol* 209:493–506.
- Tornabene E, Brodin B (2016) Stroke and Drug Delivery - *In vitro* Models of the Ischemic Blood-Brain Barrier. *J Pharm Sci* 105:398–405.
- Touzé E, Gauthier JY, Moulin T, Meder JF, Bracard S, Mas JL (2003) Risk of stroke and recurrent dissection after a cervical artery dissection: A multicenter study. *Neurology* 61:1347–51.
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76:4350–4.
- Trushina E, Du Charme J, Parisi J, McMurray CT (2006) Neurological abnormalities in caveolin-1 knock out mice. *Behav Brain Res* 172:24–32.
- Tsirka SE, Gualandris A, Amaral DG, Strickland S (1995) Excitotoxin-induced neuronal degeneration and seizure are mediated by tissue plasminogen activator. *Nature* 377:340–4.
- Tsuji K, Aoki T, Tejima E, Arai K, Lee SR, Atochin DN, Huang PL, Wang X, Montaner J, Lo EH (2005) Tissue plasminogen activator promotes matrix metalloproteinase-9 upregulation after focal cerebral ischemia. *Stroke* 36:1954–9.
- Tuttolomondo A, Di Raimondo D, di Sciacca R, Pinto A, Licata G (2008) Inflammatory Cytokines in Acute Ischemic Stroke. *Curr Pharm Des* 14(33):3574–89
- Van der Goes A, Wouters D, Van Der Pol SM, Huizinga R, Ronken E, Adamson P, Greenwood J, Dijkstra CD, De Vries HE (2001) Reactive oxygen species enhance the migration of monocytes across the blood-brain barrier *in vitro*. *FASEB J* 15:1852–4.
- Van Deurs B, Roepstorff K, Hommelgaard AM, Sandvig K (2003) Caveolae: Anchored, multifunctional platforms in the lipid ocean. *Trends Cell Biol* 13:92–100.
- Van Itallie CM, Anderson JM (2006) Claudins and epithelial paracellular transport. *Annu Rev Physiol* 68:403–29.
- Van Itallie CM, Anderson JM (2013) Claudin interactions in and out of the tight junction. *Tissue Barriers* 1:e25247.
- Van Itallie CM, Holmes J, Bridges A, Gookin JL, Coccaro MR, Proctor W, Colegio OR, Anderson JM (2008) The density of small tight junction pores varies among cell types and is increased by expression of claudin-2. *J Cell Sci* 121:298–305.
- Wang Q, Tang XN, Yenari MA (2007) The inflammatory response in stroke. *J Neuroimmunol* 184:53–68.

- Wang X, Lee SR, Arai K, Lee SR, Tsuji K, Rebeck GW, Lo EH (2003) Lipoprotein receptor-mediated induction of matrix metalloproteinase by tissue plasminogen activator. *Nat Med* 9:1313–17.
- Wang X, Lo EH (2003) Triggers and Mediators of Hemorrhagic Transformation in Cerebral Ischemia. *Mol Neurobiol* 28:229–44.
- Wang X, Tsuji K, Lee SR, Ning MM, Furie KL, Buchan AM, Lo EH (2004) Mechanisms of hemorrhagic transformation after tissue plasminogen activator reperfusion therapy for ischemic stroke. *Stroke* 35(11 Suppl 1):2726-30
- Wang YF, Tsirka SE, Strickland S, Stieg PE, Soriano SG, Lipton SA (1998) Tissue plasminogen activator (tPA) increases neuronal damage after focal cerebral ischemia in wild-type and tPA-deficient mice. *Nat Med* 4:228–31.
- Warach S, Latour LL (2004) Evidence of reperfusion injury, exacerbated by thrombolytic therapy, in human focal brain ischemia using a novel imaging marker of early blood-brain barrier disruption. *Stroke* 35(11 Suppl 1):2659-61.
- Watanabe T, Dohgu S, Takata F, Nishioku T, Nakashima A, Futagami K, Yamauchi A, Kataoka Y (2013) Paracellular Barrier and Tight Junction Protein Expression in the Immortalized Brain Endothelial Cell Lines bEND.3, bEND.5 and Mouse Brain Endothelial Cell 4. *Biol Pharm Bull* 36(3):492-5.
- Weber C, Fraemohs L, Dejana E (2007) The role of junctional adhesion molecules in vascular inflammation. *Nat Rev Immunol* 7:467–77.
- Wei EP, Kontos HA, Beckman JS (1996) Mechanisms of cerebral vasodilation by superoxide, hydrogen peroxide, and peroxynitrite. *Am J Physiol Circ Physiol* 271:1262–66.
- Westergaard E, Brightman MW (1973) Transport of proteins across normal cerebral arterioles. *J Comp Neurol* 152:17–44.
- Wolburg H, Wolburg-Buchholz K, Fallier-Becker P, Noell S, Mack AF (2011) Structure and Functions of Aquaporin-4-Based Orthogonal Arrays of Particles. *Int Rev Cell Mol Biol* 287:1–41.
- Won S-J, Kim D-Y, Gwag B-J (2002) Cellular and Molecular Pathways of Ischemic Neuronal Death. *BMB Rep* 35:67–86.
- Won S, Lee JH, Wali B, Stein DG, Sayeed I (2014) Progesterone attenuates hemorrhagic transformation after delayed tPA treatment in an experimental model of stroke in rats: Involvement of the VEGF-MMP pathway. *J Cereb Blood Flow Metab* 34:72–80.
- Woodruff TM, Thundiyil J, Tang SC, Sobey CG, Taylor SM, Arumugam T V. (2011) Pathophysiology, treatment, and animal and cellular models of human ischemic stroke. *Mol Neurodegener* 6(1):11.
- Wu F, Echeverry R, Wu J, An J, Haile WB, Cooper DS, Catano M, Yepes M (2013) Tissue-type plasminogen activator protects neurons from excitotoxin-induced cell death via activation of the ERK1/2-CREB-ATF3 signaling pathway. *Mol Cell Neurosci* 52:9–19.
- Wu F, Wu J, Nicholson AD, Echeverry R, Haile WB, Catano M, An J, Lee AK, Duong D, Dammer EB, Seyfried NT, Tong FC, Votaw JR, Medcalf RL, Yepes M (2012) Tissue-Type Plasminogen Activator Regulates the Neuronal Uptake of Glucose in the Ischemic Brain. *J Neurosci* 32:9848–58.
- Xie H, Lu W cheng (2018) Inhibition of transient receptor potential vanilloid 4 decreases the expressions of caveolin-1 and caveolin-2 after focal cerebral ischemia and reperfusion in rats. *Neuropathology* 38:337–46.
- Xu L, Guo R, Xie Y, Ma M, Ye R, Liu X (2015) Caveolae: molecular insights and therapeutic targets for stroke. *Expert Opin Ther Targets* 19:633–50.
- Yang J (2019) The role of reactive oxygen species in angiogenesis and preventing tissue injury after brain ischemia. *Microvasc Res* 123:62–7.

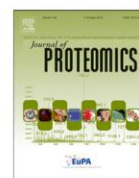
- Yang L, Shah KK, Abbruscato TJ (2012) An *in vitro* model of ischemic stroke. *Methods Mol Biol* 814:451–66.
- Yang MC, Zhang HZ, Wang Z, You FL, Wang YF (2016) The molecular mechanism and effect of cannabinoid-2 receptor agonist on the blood-spinal cord barrier permeability induced by ischemia-reperfusion injury. *Brain Res* 1636:81–92.
- Yang S, Jin H, Zhao Z (2019) Epidermal growth factor treatment has protective effects on the integrity of the blood-brain barrier against cerebral ischemia injury in bEnd3 cells. *Exp Ther Med* 17(3):2397–402
- Yang Y, Estrada EY, Thompson JF, Liu W, Rosenberg GA (2007) Matrix metalloproteinase-mediated disruption of tight junction proteins in cerebral vessels is reversed by synthetic matrix metalloproteinase inhibitor in focal ischemia in rat. *J Cereb Blood Flow Metab* 27:697–709.
- Yang Y, Rosenberg GA (2011) Blood-Brain Barrier Breakdown in Acute and Chronic Cerebrovascular Disease. *Stroke* 42:3323–28
- Yao Y, Tsirka SE (2014) Monocyte chemoattractant protein-1 and the blood-brain barrier. *Cell Mol Life Sci* 71:683–97.
- Yepes M, Lawrence DA (2004) New functions for an old enzyme: Nonhemostatic roles for tissue-type plasminogen activator in the central nervous system. *Exp Biol Med (Maywood)* 229(11):1097–104.
- Yepes M, Roussel BD, Ali C, Vivien D (2009) Tissue-type plasminogen activator in the ischemic brain: more than a thrombolytic. *Trends Neurosci* 32:48–55.
- Yepes M, Sandkvist M, Moore EG, Bugge TH, Strickland DK, Lawrence DA (2003) Tissue-type plasminogen activator induces opening of the blood-brain barrier via the LDL receptor-related protein. *J Clin Invest* 112:1533–40.
- Yepes M, Sandkvist M, Wong MK, Coleman TA, Smith E, Cohan SL, Lawrence DA (2000) Neuroserpin reduces cerebral infarct volume and protects neurons from ischemia-induced apoptosis. *Blood* 96:569–76.
- Yilmaz G, Granger DN (2008) Cell adhesion molecules and ischemic stroke. *Neurol Res* 30:783–93.
- Zeng L, Guo J, Xu HB, Huang R, Shao W, Yang L, Wang M, Chen J, Xie P (2013) Direct Blue 71 staining as a destaining-free alternative loading control method for Western blotting. *Electrophoresis* 34:2234–39.
- Zhai D, Li S, Wang M, Chin K, Liu F (2013) Disruption of the GluR2/GAPDH complex protects against ischemia-induced neuronal damage. *Neurobiol Dis* 54:392–403.
- Zhang Y, Wang T, Yang K, Xu J, Ren L, Li W, Liu W (2016) Cerebral Microvascular Endothelial Cell Apoptosis after Ischemia: Role of Enolase-Phosphatase 1 Activation and Aci-Reductone Dioxygenase 1 Translocation. *Front Mol Neurosci* 9:79.
- Zhao BQ, Wang S, Kim HY, Storrie H, Rosen BR, Mooney DJ, Wang X, Lo EH (2006) Role of matrix metalloproteinases in delayed cortical responses after stroke. *Nat Med* 12:441–5.
- Zimnicka AM, Husain YS, Shajahan AN, Sverdlov M, Chaga O, Chen Z, Toth PT, Klomp J, Karginov A V., Tirupathi C, Malik AB, Minshall RD (2016) Src-dependent phosphorylation of caveolin-1 Tyr-14 promotes swelling and release of caveolae. *Mol Biol Cell* 27:2090–106.
- Zlokovic B V (2008) The blood-brain barrier in health and chronic neurodegenerative disorders. *Neuron* 57:178–201.
- Zou R, Wu Z, Cui S (2015) Electroacupuncture pretreatment attenuates blood-brain barrier disruption following cerebral ischemia/reperfusion. *Mol Med Rep* 12:2027–34.

## 9. ANNEX



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Proteomics

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/jprot](http://www.elsevier.com/locate/jprot)

## Evaluation of common housekeeping proteins under ischemic conditions and/or rt-PA treatment in bEnd.3 cells

Pau Comajóan<sup>a,b,1</sup>, Carme Gubern<sup>a,b,1</sup>, Gemma Huguet<sup>a,b</sup>, Joaquín Serena<sup>a,b</sup>, Elisabet Kádár<sup>a,b,\*</sup>, Mar Castellanos<sup>c,\*</sup>

<sup>a</sup> Cerebrovascular Pathology Research Group, Department of Neurology, Girona Biomedical Research Institute (IdIBGi), Dr. Josep Trueta University Hospital, Girona, Spain

<sup>b</sup> Cellular and Molecular Neurobiology Research Group, Department of Biology, University of Girona (UdG), Girona, Spain

<sup>c</sup> Neurology Service, University Hospital Complex of A Coruña, A Coruña Biomedical Research Institute, A Coruña, Spain



### ARTICLE INFO

#### Keywords:

Housekeeping proteins  
OGD  
rt-PA  
Blood brain barrier  
Endothelial cells  
Ischemic stroke

### ABSTRACT

Thrombolysis with recombinant tissue plasminogen activator (rt-PA) is the only pharmacological approved treatment for ischemic stroke, despite its associated increasing risk of hemorrhagic transformation. Since many of rt-PA effects in blood-brain barrier (BBB) are not well characterized, the study of protein changes in BBB cells after rt-PA administration may help to understand its adverse effects. Our aim was to analyze protein levels of four commonly used housekeeping proteins:  $\beta$ -Actin,  $\alpha$ -Tubulin, GAPDH and HPRT in bEnd.3 endothelial cell line subjected to oxygen and glucose deprivation (OGD) conditions and rt-PA treatment to determine their reliability as Western blot loading controls. bEnd.3 monolayers were subjected to 2.5 h of OGD and reperfusion with/without 20  $\mu$ g/ml of rt-PA. At 3, 6, 24 and 72 h post-OGD, protein levels were analyzed by Western blot using Stain-Free technology. OGD significantly decreased  $\beta$ -Actin,  $\alpha$ -Tubulin, GAPDH and HPRT protein levels at 3, 6, 24 and 72 h post-OGD without significant rt-PA treatment effects except for the GAPDH levels increase in control condition at 3 h post-OGD. The present study clearly demonstrated that  $\beta$ -Actin,  $\alpha$ -Tubulin, GAPDH and HPRT proteins are not suitable as loading controls for Western Blot analysis in bEnd.3 cells after OGD.

**Significance:** We reported altered levels of  $\beta$ -Actin,  $\alpha$ -Tubulin, GAPDH and HPRT housekeeping proteins in bEnd.3 endothelial cell line after an ischemic insult. Therefore, we demonstrated that these proteins are not suitable as loading controls for Western Blot analysis in our experimental conditions and we recommended the use of Stain-Free gels as an alternative to traditional housekeeping proteins normalization.

### 1. Introduction

According to the World Health Organization, stroke is a leading cause of death and disability in the world (2012). Despite all clinical trials carried out in recent years, thrombolytic therapy with recombinant tissue plasminogen activator (rt-PA) has been the only drug shown to be effective for the treatment of ischemic stroke when administered within the first 4.5 h of stroke onset [1]. However, its administration is associated with an increasing risk (8%) of symptomatic hemorrhagic transformation (HT) of the ischemic brain. This adverse effect constitutes an important limitation for the generalization of rt-PA therapy which, at the present time, is given to < 5% of patients with ischemic stroke [2, 3].

HT is mostly caused by the disruption of the blood-brain barrier (BBB) after the ischemic insult as a result of the increase of permeability and the subsequent pass of erythrocytes through the structure. BBB is composed of astrocyte end-feet, pericytes, specialized brain capillary endothelial cells (EC) and the extracellular matrix (ECM) components [4, 5]. At the molecular level, it has been shown that rt-PA could affect directly to EC through triggering the degradation of tight junction proteins [6] which are essential for maintaining cerebrovascular homeostasis and regulating the vascular endothelial growth factor (VEGF) expression and the subsequent stimulation of endocytosis, transcytosis and angiogenesis [7]. rt-PA has also been implicated in the degradation of basement membrane components such as collagen IV, laminin and fibronectin through plasmin activation, low density

\* Correspondence to: E. Kádár, Cellular and Molecular Neurobiology Research Group, Department of Biology, University of Girona (UdG), Aulari Comú building, C/Maria Aurèlia Capmany 40, 17003 Girona, Spain.

\*\* Correspondence to: M. Castellanos, Neurology Service, University Hospital Complex of A Coruña, A Coruña Biomedical Research Institute, C/Xubias de Arriba, 84, 15006 A Coruña, Spain.

E-mail addresses: [elisabet.kadar@udg.edu](mailto:elisabet.kadar@udg.edu) (E. Kádár), [María.del.Mar.Castellanos.Rodrigo@sergas.es](mailto:María.del.Mar.Castellanos.Rodrigo@sergas.es) (M. Castellanos).

<sup>1</sup> Equally contribution.

<https://doi.org/10.1016/j.jprot.2018.06.011>

Received 5 February 2018; Received in revised form 12 June 2018; Accepted 15 June 2018  
Available online 18 June 2018

1874-3919/ © 2018 Elsevier B.V. All rights reserved.



lipoprotein receptor associated protein-1 (LRP-1) stimulation, and matrix metalloprotease (MMPs) induction [8].

Since many of rt-PA's pleiotropic interactions are not well characterized, the identification and time profile analysis of endothelial protein levels after ischemic conditions and rt-PA administration may shed light on the molecular mechanisms underlying rt-PA's adverse effects in this important element of neurovascular unit of BBB [9].

The Western Blot or Immunoblot is a widely accepted technic used to determine the expression changes of particular proteins under specific experimental conditions such as ischemia. The most common way to validate the detected differences is performing a loading normalization using high-abundance housekeeping proteins expressed at a constant level and theoretically not affected by experimental conditions.  $\beta$ -Actin,  $\alpha$ -Tubulin and glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), among other housekeeping proteins, are usually chosen as loading controls [10]. Different studies have used these housekeeping proteins to normalize results after *in vitro* and *in vivo* ischemia models [11, 12] but, other studies have reported altered expressions of actin, tubulin and GAPDH due to the effects of the ischemia [13–15]. These controversial results make questionable the use of these loading controls for western blot normalization purposes in ischemic conditions. In this sense, different papers have recently confirmed Stain-Free technology as a more reliable method than housekeeping's labeling, avoiding saturate signals and housekeeping variations due to experimental conditions [16–19]. Moreover, there are no published data analyzing the effect of rt-PA in normoxic and ischemic conditions on expression of these putative housekeeping proteins in bEnd.3 cells. This immortalized mouse cerebral endothelial cell line appears to be a suitable *in vitro* BBB model presenting similar barrier characteristics to the primary brain microvascular endothelial cells [20, 21].

The aim of this study was to analyze the levels of four common housekeeping proteins,  $\beta$ -Actin,  $\alpha$ -Tubulin, GAPDH and Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (HPRT) in the bEnd.3 endothelial cell line subjected to oxygen and glucose deprivation (OGD) conditions and/or treatment with rt-PA to determine whether they are reliable as loading controls to Western blot or not in these experimental conditions during a time period from 3 to 72 h post-OGD.

## 2. Material and methods

### 2.1. Cell culture

Immortalized mouse brain endothelial cell line (bEnd.3) were purchased from ATCC (CRL-2299), seeded in 60 mm Petri dishes (Corning, USA) and grown in DMEM high glucose (HG) medium with 1% glutamine (Gibco, USA), 10% fetal bovine serum (Gibco, USA) and 1% Penicillin/Streptomycin (HyClone Laboratories, USA). All bEnd.3 cells used for these experiments were cultured between 25 and 30 passages, which have been shown to maintain excellent BBB characteristics *in vitro* [20].

### 2.2. OGD performance and rt-PA treatment

After overnight starvation in DMEM HG with 1% fetal bovine, bEnd.3 monolayers were subjected to OGD. Briefly, the medium was replaced with glucose-free DMEM without FBS (Gibco, USA) previously perfused with  $N_2$  to purge the oxygen. Then, the cells were placed into a 37 °C humidified hypoxic chamber with a constant  $N_2$  flow of 1 L/min and 0.15 bar pressure for 2.5 h. This OGD period was selected after confirm that a viable cell population remains until 72 h though with ionic and paracellular permeability as well as tight junction protein levels differences between control, OGD and OGD + rt-PA treated cells (unpublished results). Regarding the control (CTR) group, the same procedure was carried out with the difference that the glucose-free medium was supplemented with glucose (5.5 mM) and incubated at 37 °C with 5% of  $CO_2$ . At the end of the OGD period, media were

removed and replaced with DMEM HG medium containing 10% FBS and with or without rt-PA at a concentration of 20  $\mu$ g/ml. As reported in previous publications, we used a dose of 20  $\mu$ g/ml of tPA, based on the finding that such a concentration can be observed in blood [22].

### 2.3. Cell viability

At 0, 24, 48 and 72 h of reperfusion, with or without rt-PA treatment, cell viability was assessed with 3-(4,5-dimethylthiazol)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) assay (5 mg/ml, Sigma). Absorbance was measured at 570 nm using a SpectraMax 340PC384 Microplate Reader and results were expressed as a percentage of the value in the control group.

### 2.4. Western Blot analysis

At 3, 6, 24 and 72 h post-OGD, cells were collected and protein was isolated using Lysis Buffer (Cell Signaling, The Netherlands). Protein concentration was measured using BCA method (Thermo fisher scientific, USA). Protein samples (10  $\mu$ g) were loaded and separated by electrophoresis on Criterion™ TGX Stain-Free™ Precast Gels (Bio-Rad) at 120 V for 80–90 min. Then, proteins were transferred to PVDF membranes at 30 V overnight at 4 °C. After 1 h of blocking with TBST 5% BSA (EMD Millipore, USA), membranes were incubated 1 h at room temperature with primary antibodies: anti- $\beta$ -Actin (sc-47,778), 1:1000; anti- $\alpha$ -Tubulin (sc-5286), 1:1000 from Santa Cruz Biotechnology and anti GAPDH, 1:20000 (MAB374) from EMD Millipore, USA and overnight at 4 °C with anti-HPRT (sc-376,938), 1:100 from Santa Cruz Biotechnology, in TBST 3% BSA. HRP-conjugated secondary antibodies were used for 1 h at room temperature. Protein bands were revealed using Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate (EMD Millipore, USA) and quantified with Alpha Innotech software (AlphaEaseFC™).

### 2.5. Stain-Free total protein staining and quantification

The Criterion Stain-Free gels (BioRad) were used as a loading control in Western Blot since they contained a trihalo compounds that allowed rapid fluorescent detection of total protein loaded in each lane and after the transfer in PVDF membranes. Once the gel had run, it was placed to the transilluminator and exposed 5 min with UV light in order to activate the fluorescence signal. Then, each lane was quantified using Alpha Innotech software (AlphaEaseFC™). The space between lanes was taken as a background according to Aldridge GM et al. [10] as shows in Fig. 1.

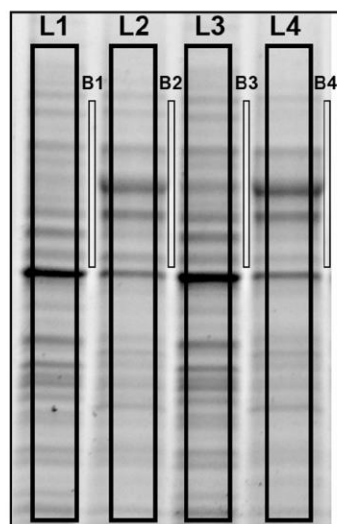
### 2.6. Statistical analysis

SPSS software (IBM SPSS Statistics 22) was used to perform the statistical analysis. Since variables were not normally distributed, non-parametric Mann-Whitney test was used to perform the analysis. *P* value < 0.05 was considered as significant.

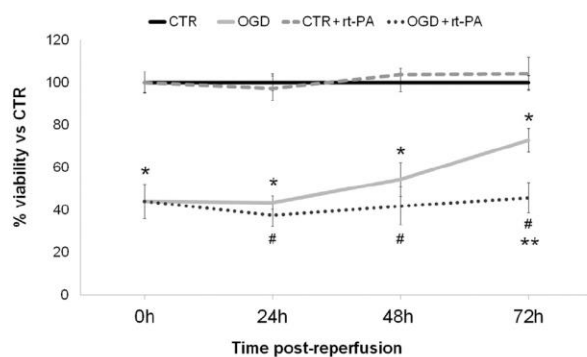
## 3. Results

OGD decreased significantly the viability of bEnd.3 cells from 0 to 72 h while rt-PA administration at reperfusion only induced a significant decrease of viability at 72 h in the OGD rt-PA group (Fig. 2).

Fig. 3 shows a representative gel with total protein staining of bEnd.3 murine endothelial cells subjected to 2.5 h of OGD and the subsequent reperfusion, in which it is possible to observe differences in protein profile between OGD and CTR samples. The most remarkable differences were seen between 3 and 24 h post-reperfusion, while at 72 h the profiles were similar again. Regarding rt-PA treatment, the possible differences between groups were much more attenuated and therefore, practically unobservable.



**Fig. 1.** Stain-Free gel image with schematic representation of quantification method. The fluorescent signal allows to detect total protein loaded in each lane and use it to normalize the results. The intensity average of each lane was quantified taking the space between lanes as a background as it is showed (L1: lane 1; B1: background 1; and the same for 2, 3 and 4).

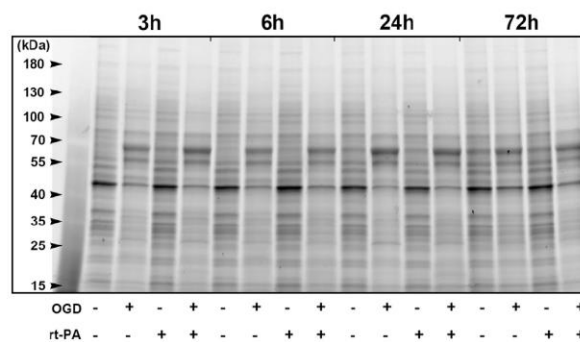


**Fig. 2.** Cellular survival rate tested in the fourth conditions analyzed: CTR, CTR + rt-PA, OGD and OGD + rt-PA after 2.5 h of OGD and the subsequent reperfusion periods. \* $p < 0.05$  vs CTR, #  $< 0.05$  vs CTR + rt-PA, \*\* $p < 0.05$  vs OGD. Data represent the mean of  $n = 3-4$  independent experiments and error bars indicate the standard error of the mean (SEM).

As can be seen in Fig. 4, protein levels of  $\beta$ -Actin,  $\alpha$ -Tubulin, GAPDH and HPRT in bEnd.3 were significantly decreased after 2.5 h of OGD at 3, 6, 24 and 72 h of reperfusion compared to CTR condition. Moreover, rt-PA treatment had no effects on  $\beta$ -Actin,  $\alpha$ -Tubulin and HPRT protein levels since no differences were observed neither between CTR and CTR + rt-PA nor OGD and OGD + rt-PA groups at 3, 6, 24 and 72 h of reperfusion (Fig. 4B, C and E). However, GAPDH levels significantly increased after rt-PA treatment in the CTR condition ( $p = 0.05$ ; CTR vs CTR + rt-PA) at 3 h but not at 6, 24 and 72 h post-reperfusion (Fig. 4D).

#### 4. Discussion

The aim of the present study was to evaluate the suitability of  $\beta$ -Actin,  $\alpha$ -Tubulin, GAPDH and HPRT proteins as loading controls for Western Blot analysis in an *in vitro* model of ischemia and reperfusion, with or without rt-PA administration, using the murine brain



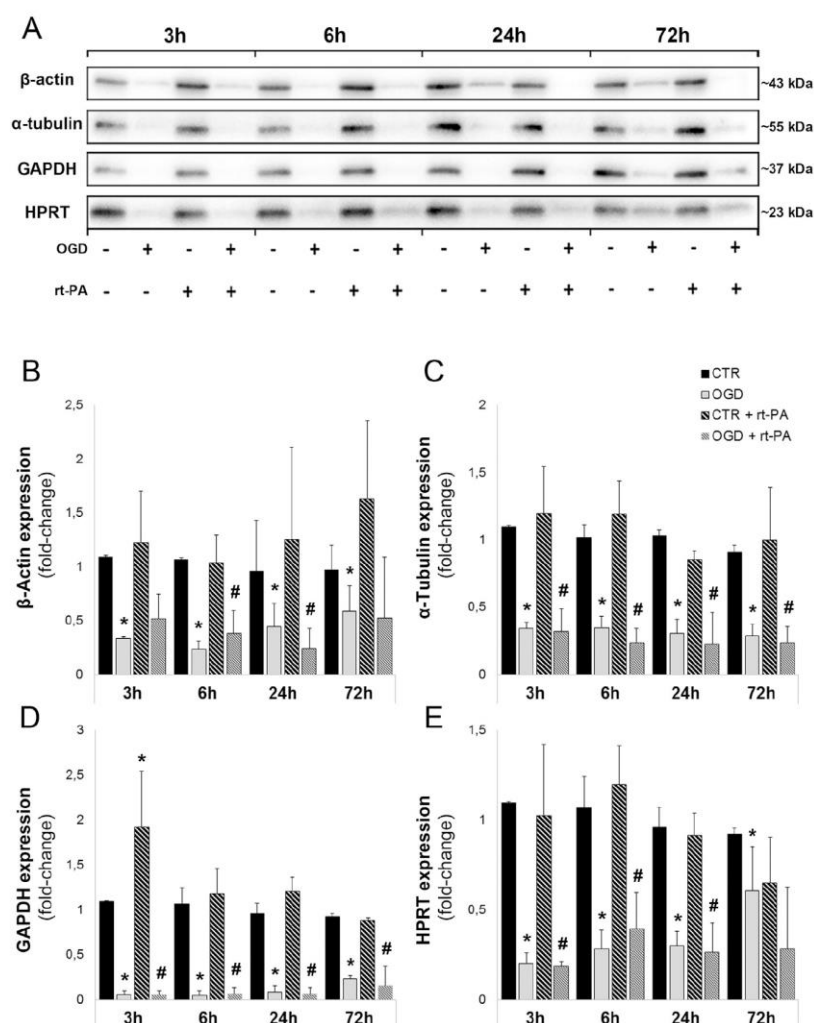
**Fig. 3.** Stain-Free gel image of a representative experiment. bEnd.3 cells were subjected to 2.5 h of OGD and/or rt-PA administration and 10  $\mu$ g of total cell lysates were loaded in each lane. Total protein bands were visible due to trihalo compounds that allowed its rapid fluorescent detection.

endothelial bEnd.3 cell line. Our results showed that none of them seems to be appropriate for normalization purposes when OGD is applied to bEnd.3 cells since the levels of these proteins significantly diminished from 3 to 72 h post-reperfusion, independently of rt-PA administration.

It has been previously reported that common housekeeping proteins are not always reliable loading controls and it is necessary to test them in each experimental condition before normalizing the results [10, 17, 19, 23]. Stain-Free gels appears as a good option to test the suitability of candidate housekeeping protein [18, 19]. Total protein staining also allowed to observe a differential protein profile due to OGD in bEnd.3 endothelial cell line. In concordance with this, Andreev et al. described a translation alteration of about 3000 genes during 1 h of OGD in a PC12 neural cell line [24]. Furthermore, it has been demonstrated that hypoxia-inducible factor (HIF)-1 was increased in bEnd.3 cells after 18 h post-6 h of OGD [25]. In concordance, a similar HIF-1 response to hypoxia was described in neuroblastoma cells and associated with protein profile alterations as a result of an induction of genes involved in anaerobic metabolism, oxygen transport and angiogenesis [26].

$\beta$ -Actin,  $\alpha$ -Tubulin, GAPDH and HPRT proteins have been used as housekeeping proteins in many experimental conditions, including ischemic *in vivo* and *in vitro* models [27, 28]. However, other studies have reported altered expressions of actin, tubulin and GAPDH as a result of the ischemia [13–15], which is in agreement with our results. According to this, Maneen MJ et al. [29] demonstrated a reduction of actin levels in rats subjected to 1 h of right middle cerebral artery occlusion (MCAO) and 30 min of reperfusion, and proposed that the actin polymerization is particularly susceptible to oxidative stress after stroke. Moreover, a significant decrease of actin expression after exposing bovine brain microvessel endothelial cells to 6 h of hypoxia and aglycaemia was also reported by Brown RC et al., suggesting that maintenance of the actin cytoskeleton is energy-dependent and requires a constant supply of ATP [13]. In concordance, Torii H et al. and Coucha M et al. concluded that hypoxia/reoxygenation produced a cytoskeletal reorganization in which filamentous actin decreased [30, 31]. Similar to actin,  $\alpha$ - and  $\beta$ -Tubulin are important structural proteins of the cytoskeleton and alterations in their expression and distribution were also observed after ischemic conditions [32]. Particularly, Ma XL et al. reported a significant decrease in  $\alpha$ -Tubulin expression in rats after 60 min of cerebral ischemia and 1 h of reperfusion [15]. Similarly, Kumar K et al. and Hatakeyama T et al. described a significant tubulin mRNA and immunoreactivity decrease, after 10 min of transient ischemia and reperfusion at 6 and 48 h [33, 34]. Regarding GAPDH, a critical enzyme involved in glycolysis for energy production [35], Tanaka R et al. described different GAPDH levels depending on the analyzed area and post-ischemia time point in an *in vivo* model of cerebral ischemia. Specifically, they reported a nuclear accumulation of GAPDH





**Fig. 4.** Protein levels of  $\beta$ -Actin,  $\alpha$ -Tubulin, GAPDH and HPRT in bEnd.3 cells after 2.5 h of OGD and/or rt-PA administration. 10  $\mu$ g of total cell lysates from the four experimental groups were prepared and subjected to Western blot analysis (A). Protein levels of  $\beta$ -Actin,  $\alpha$ -Tubulin, GAPDH and HPRT at 3, 6, 24 and 72 h of reperfusion (B–E) were obtained using total protein as a loading control. \* $p < 0.05$  vs CTR, #  $< 0.05$  vs CTR + rt-PA. Data represent the mean of  $n = 3$ –4 independent experiments and error bars indicate the standard error of the mean (SEM).

in the ischemic core area after 2 h of MCAO without reperfusion that decreased in a time-dependent manner from 3 to 48 h after reperfusion [14]. Finally, HPRT is an important enzyme that catalyzes the conversion of hypoxanthine to inosine monophosphate in a rescue pathway to obtain ATP. Although some articles reported unchanged mRNA HPRT expression and it was accepted as housekeeping control for real time-PCR analysis in *in vivo* models of permanent MCAO (pMCAO) [36, 37], other studies have reported reduced HPRT mRNA levels under ischemic conditions [38]. In accordance, our results have showed a decrease of HPRT protein levels after ischemia. To the best of our knowledge, this is the first study analyzing HPRT protein levels after an ischemic insult and particularly showing that ischemia results in a decrease in the levels of this protein in bEnd.3 cells.

Although with many limitations, *in vitro* OGD models reproduce part of the cascade of molecular events resulting after cerebral ischemia highlighting the subsequent energy failure and metabolic disturbances. These disturbances included changes in the oxygen levels, in glucose metabolism and the depletion of energy metabolites including ATP, phosphocreatine, lactate and N-acetyl aspartate [39]. Therefore,

proteins involved in energy-dependent processes, which required a constant supply of ATP such as actin and tubulin polymerization, or related with metabolic pathways to obtain ATP such as GAPDH and HPRT, may be altered in our experimental conditions. Contrary to our results some studies carried out in the bEnd.3 model presented  $\beta$ -Actin as unchanging housekeeping protein. Jie Liu et al. and Haoming Song et al. exposed bEnd.3 cells to 2 h of OGD, without or with 6 h of reoxygenation, respectively [11, 27] and Soonmi Won et al. performed a 6-h of OGD and 3-h of reoxygenation model [40]. We consider that the discrepancies could be due to methodologic differences including the analyzed time points after OGD. In fact, our study presents an extensive time profile analysis (from 3 to 72 h after OGD) of  $\beta$ -Actin,  $\alpha$ -Tubulin, GAPDH and HPRT protein levels in bEnd.3 cells.

To the best of our knowledge, this is the first study evaluating the effects of rt-PA on the levels of the analyzed housekeeping proteins. Our results demonstrate that rt-PA administration did not modify  $\beta$ -Actin,  $\alpha$ -Tubulin and HPRT levels, neither under normal conditions nor after OGD at the different time point analysis. On the other hand, the addition of rt-PA to bEnd.3 cultures resulted in an increase in the GAPDH

levels at CTR condition at 3 h post-rt-PA administration. Although similar results had not been described in CTR conditions, it has been previously reported that GAPDH overexpression restores energy production and prevents DNA damage in endothelial cells after ischemia/reperfusion injury [41], and so it is possible that GAPDH protein levels could increase after rt-PA administration as a protective response. Further studies are, however, needed to confirm this hypothesis.

## 5. Conclusion

In summary, in our study we have demonstrated that levels of  $\beta$ -Actin,  $\alpha$ -Tubulin, GAPDH and HPRT proteins significantly decrease in murine brain endothelial bEnd.3 cells subjected to 2.5 h of OGD at 3, 6, 24 and 72 h of reperfusion, and so these proteins would not be suitable as loading controls for Western Blot analysis in these experimental conditions. Therefore, except GAPDH,  $\beta$ -Actin,  $\alpha$ -Tubulin and HPRT could be used as loading control proteins in experimental conditions including rt-PA administration (without OGD conditions) at least until 72 h post-administration. So, given the lack of a specific housekeeping protein for the experimental conditions analyzed, we consider the total protein normalization using Stain-Free technology to be a reliable option and, therefore, we recommend the use of Stain-Free gels as an alternative to traditional housekeeping normalization in Western Blot.

## Author contributions

PC performed *in vitro* procedures and Western Blot analysis with EK and CG help. PC, EK and CG analyzed and interpreted data obtained. PC, EK and CG were the major contributors in writing the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

## Funding sources

This research has been supported by the Instituto de Salud Carlos III, Health Strategic Action Program (PI13/02258) and the Spanish Stroke Research Network (RD16/0019/003) (INVICTUS and INVICTUS-PLUS). We also gratefully acknowledge grant support from Universitat de Girona (MPCUG2016/092). P. Comajoan is supported by a predoctoral fellowship from University of Girona.

## Conflict of interests

All authors declare no conflict of interests.

## References

- [1] K. Lees, E. Bluhmki, D. Toni, M.J. Von Kummer, T.G. Brott, M. Kaste, J.C. Grotta, G.W. Albers, S. Hamilton, B.C. Tilley, W. Hacke, Time dependent response to treatment with intravenous rtPA for stroke: an updated pooled analysis of ECASS, ATLANTIS and NINDS stroke trials, *Stroke* 41 (2010) e247–e248 <http://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&PAGE=reference&D=emed9&NEWS=N&AN=70429296>.
- [2] The NINDS t-PA Stroke Study Group, Intracerebral hemorrhage after intravenous t-PA therapy for ischemic stroke, *Stroke* 28 (1997) 2109–2118, <http://dx.doi.org/10.1161/01.STR.28.11.2109>.
- [3] W. Hacke, M. Kaste, E. Bluhmki, M. Brozman, A. Dávalos, D. Guidetti, V. Larrue, K.R. Lees, Z. Medeghri, T. Machnig, D. Schneider, R. von Kummer, N. Wahlgren, D. Toni, Thrombolysis with Alteplase 3 to 4.5 hours after acute ischemic stroke, *N. Engl. J. Med.* 359 (2008) 1317–1329, <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMoa0804656>.
- [4] R. Leigh, S.S. Jen, A.E. Hillis, J.W. Krakauer, P.B. Barker, Pretreatment blood-brain barrier damage and post-treatment intracranial hemorrhage in patients receiving intravenous tissue-type plasminogen activator, *Stroke* 45 (2014) 2030–2035, <http://dx.doi.org/10.1161/STROKEAHA.114.005249>.
- [5] K.E. Sandoval, K.A. Witt, Blood-brain barrier tight junction permeability and ischemic stroke, *Neurobiol. Dis.* 32 (2008) 200–219, <http://dx.doi.org/10.1016/j.nbd.2008.08.005>.
- [6] S. Lemarchant, F. Docagne, E. Emery, D. Vivien, C. Ali, M. Rubio, TPA in the injured central nervous system: different scenarios starring the same actor? *Neuropharmacology* 62 (2012) 749–756, <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuropharm.2011.10.020>.
- [7] Y. Suzuki, N. Nagai, K. Yamakawa, Y. Muranaka, K. Hokamura, K. Umemura, Recombinant tissue-type plasminogen activator transiently enhances blood-brain barrier permeability during cerebral ischemia through vascular endothelial growth factor-mediated endothelial endocytosis in mice, *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 35 (2015) 2021–2031, <http://dx.doi.org/10.1038/jcbfm.2015.167>.
- [8] Y. Suzuki, N. Nagai, K. Umemura, A review of the mechanisms of blood-brain barrier permeability by tissue-type plasminogen activator treatment for cerebral ischemia, *Front. Cell. Neurosci.* 10 (2016) 1–10, <http://dx.doi.org/10.3389/fncel.2016.00002>.
- [9] Z. Merali, M.M. Gao, T. Bowes, J. Chen, K. Evans, A. Kassner, Neuroproteome changes after ischemia/reperfusion injury and tissue plasminogen activator administration in rats: a quantitative iTRAQ proteomics study, *PLoS One* 9 (2014) 1–11, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0098706>.
- [10] G.M. Aldridge, D.M. Podrebarac, W.T. Greenough, I.J. Weiler, The use of total protein stains as loading controls: an alternative to high-abundance single-protein controls in semi-quantitative immunoblotting, *J. Neurosci. Methods* 172 (2008) 250–254, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jneumeth.2008.05.003>.
- [11] J. Liu, X. Jin, K.J. Liu, W. Liu, Matrix Metalloproteinase-2-mediated Occludin degradation and caveolin-1-mediated claudin-5 redistribution contribute to blood-brain barrier damage in early ischemic stroke stage, *J. Neurosci.* 32 (2012) 3044–3057, <http://dx.doi.org/10.1523/JNEUROSCI.6409-11.2012>.
- [12] P. Jie, Y. Tian, Z. Hong, L. Li, L. Zhou, L. Chen, L. Chen, Blockage of transient receptor potential vanilloid 4 inhibits brain edema in middle cerebral artery occlusion mice, *Front. Cell. Neurosci.* 9 (2015), <http://dx.doi.org/10.3389/fncel.2015.00141>.
- [13] R.C. Brown, T.P. Davis, Hypoxia/aglycemia alters expression of occludin and actin in brain endothelial cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 327 (2005) 1114–1123, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.12.123>.
- [14] R. Tanaka, H. Mochizuki, A. Suzuki, N. Katsube, R. Ishitani, Y. Mizuno, T. Urabe, Induction of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) expression in rat brain after focal ischemia/reperfusion, *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 22 (2002) 280–288, <http://dx.doi.org/10.1097/00004647-200203000-00005>.
- [15] X.L. Ma, K.D. Liu, F.C. Li, X.M. Jiang, L. Jiang, H.L. Li, Human mesenchymal stem cells increases expression of alpha-tubulin and angiopoietin 1 and 2 in focal cerebral ischemia and reperfusion, *Curr. Neurovasc. Res.* 10 (2013) 103–111.
- [16] A. Gürtler, N. Kunz, M. Gomolka, S. Hornhardt, A.A. Friedl, K. McDonald, J.E. Kohn, A. Posch, Stain-Free technology as a normalization tool in Western blot analysis, *Anal. Biochem.* 433 (2013) 105–111, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ab.2012.10.010>.
- [17] S.L. Eaton, S.L. Roche, M. Llaverro Hurtado, K.J. Oldknow, C. Farquharson, T.H. Gillingwater, T.M. Wishart, Total protein analysis as a reliable loading control for quantitative fluorescent Western Blotting, *PLoS One* 8 (2013) 1–7, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0072457>.
- [18] B. Rivero-Gutiérrez, A. Anzola, O. Martínez-Augustín, F.S. De Medina, Stain-free detection as loading control alternative to Ponceau and housekeeping protein immunodetection in Western blotting, *Anal. Biochem.* 467 (2014) 1–3, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ab.2014.08.027>.
- [19] J.E. Gilda, A.V. Gomes, Stain-Free total protein staining is a superior loading control to b-actin for Western blots, *Anal. Biochem.* 440 (2013) 186–188, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ab.2013.05.027>.
- [20] R.C. Brown, A.P. Morris, R.G. O'Neil, Tight junction protein expression and barrier properties of immortalized mouse brain microvessel endothelial cells, *Brain Res.* 1130 (2007) 17–30, <http://dx.doi.org/10.1016/j.brainres.2006.10.083>.
- [21] G. Li, M.J. Simon, L.M. Cancel, Z.D. Shi, X. Ji, J.M. Tarbell, B. Morrison, B.M. Fu, Permeability of endothelial and astrocyte cocultures: in vitro blood-brain barrier models for drug delivery studies, *Ann. Biomed. Eng.* 38 (2010) 2499–2511, <http://dx.doi.org/10.1007/s10439-010-0023-5>.
- [22] K.R. Godfrey, P. Tanswell, R.A. Bates, M.J. Chappell, F.N. Madden, Nonlinear pharmacokinetics of tissue-type plasminogen activator in three animal species: a comparison of mathematical models, *Biopharm. Drug Dispos.* 19 (1998) 131–140, [http://dx.doi.org/10.1002/\(Sici\)1099-081x\(199803\)19:2<131::Aid-Bdd87>3.0.Co;2-L](http://dx.doi.org/10.1002/(Sici)1099-081x(199803)19:2<131::Aid-Bdd87>3.0.Co;2-L).
- [23] K. Goasdoué, D. Awabdy, S.T. Bjorkman, S. Miller, Standard loading controls are not reliable for Western blot quantification across brain development or in pathological conditions, *Electrophoresis* 37 (2016) 630–634, <http://dx.doi.org/10.1002/elps.201500385>.
- [24] D.E. Andreev, P.B.F. O'Connor, A.V. Zhdanov, R.I. Dmitriev, I.N. Shatsky, D.B. Papkovsky, P.V. Baranov, Oxygen and glucose deprivation induces widespread alterations in mRNA translation within 20 minutes, *Genome Biol.* 16 (2015), <http://dx.doi.org/10.1186/s13059-015-0651-z>.
- [25] J.A. Shin, J.C. Yoon, M. Kim, E.M. Park, Activation of classical estrogen receptor subtypes reduces tight junction disruption of brain endothelial cells under ischemia/reperfusion injury, *Free Radic. Biol. Med.* 92 (2016) 78–89, <http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2016.01.010>.
- [26] A. Jögi, I. Øra, H. Nilsson, A. Lindeheim, Y. Makino, L. Poellinger, H. Axelson, S. Pählman, Hypoxia alters gene expression in human neuroblastoma cells toward an immature and neural crest-like phenotype, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99 (2002) 7021–7026, <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.102660199>.
- [27] H. Song, Y. Cheng, G. Bi, Y. Zhu, W. Jun, W. Ma, H. Wu, Release of matrix metalloproteinases-2 and 9 by S-nitrosylated caveolin-1 contributes to degradation of extracellular matrix in tPA-treated hypoxic endothelial cells, *PLoS One* 11 (2016) 1–16, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0149269>.
- [28] K. Mishiuro, M. Ishiguro, Y. Suzuki, K. Tsuruma, M. Shimazawa, H. Hara, Tissue plasminogen activator prevents restoration of tight junction proteins through up-regulation of angiopoietin-2, *Curr. Neurovasc. Res.* 10 (2013) 39–48, <http://dx.doi.org/10.2174/156720213804805918>.
- [29] M.J. Maneen, R. Hannah, L. Vitullo, N. Delance, M.J. Cipolla, Peroxynitrite



- diminishes myogenic activity and is associated with decreased vascular smooth muscle F-actin in rat posterior cerebral arteries, *Stroke* 37 (2006) 894–899, <http://dx.doi.org/10.1161/01.STR.0000204043.18592.0d>.
- [30] H. Torii, H. Kubota, H. Ishihara, M. Suzuki, Cilostazol inhibits the redistribution of the actin cytoskeleton and junctional proteins on the blood-brain barrier under hypoxia/reoxygenation, *Pharmacol. Res.* 55 (2007) 104–110, <http://dx.doi.org/10.1016/j.phrs.2006.10.010>.
- [31] M. Coucha, M. Abdelsaid, W. Li, M.H. Johnson, L. Orfi, A.B. El-Remessy, S.C. Fagan, A. Ergul, Nox4 contributes to the hypoxia-mediated regulation of actin cytoskeleton in cerebrovascular smooth muscle, *Life Sci.* 163 (2016) 46–54, <http://dx.doi.org/10.1016/j.lfs.2016.08.018>.
- [32] I. Minoura, Towards an understanding of the isotype-specific functions of tubulin in neurons: technical advances in tubulin expression and purification, *Neurosci. Res.* 122 (2016) 1–8, <http://dx.doi.org/10.1016/j.neures.2017.04.002>.
- [33] K. Kumar, S. Savithiry, B.V. Madhukar, Comparison of  $\alpha$ -tubulin mRNA and heat shock protein-70 mRNA in gerbil brain following 10 min of ischemia, *Brain Res. Mol. Brain Res.* (1993) 130–136.
- [34] T. Hatakeyama, M. Matsumoto, J.M. Brengman, T. Yanagihara, Immunohistochemical investigation of ischemic and postischemic damage after bilateral carotid occlusion in gerbils, *Stroke* 19 (1988) 1526–1534.
- [35] D. Zhai, S. Li, M. Wang, K. Chin, F. Liu, Disruption of the GluR2/GAPDH complex protects against ischemia-induced neuronal damage, *Neurobiol. Dis.* 54 (2013) 392–403, <http://dx.doi.org/10.1016/j.nbd.2013.01.013>.
- [36] C. Gubern, O. Hurtado, R. Rodríguez, J.R. Morales, V.G. Romera, M.A. Moro, I. Lizasoain, J. Serena, J. Mallolas, Validation of housekeeping genes for quantitative real-time PCR in in-vivo and in-vitro models of cerebral ischaemia, *BMC Mol. Biol.* 10 (2009) 57, <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2199-10-57>.
- [37] M. Meldgaard, C. Fenger, K.L. Lambertsen, M.D. Pedersen, R. Ladeby, B. Finsen, Validation of two reference genes for mRNA level studies of murine disease models in neurobiology, *J. Neurosci. Methods* 156 (2006) 101–110, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jneumeth.2006.02.008>.
- [38] M. Iizuka, Quantitative RT-PCR assay detecting the transcriptional induction of vascular endothelial growth factor under hypoxia, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 205 (1994) 1474–1480, <http://dx.doi.org/10.1006/bbrc.1994.2831>.
- [39] M. Castellanos, C. Gubern, E. Kadar, Chapter 7 – mTOR: exploring a new potential therapeutic target for stroke, *Molecules to Medicine with mTOR*, 2016, pp. 105–122, , <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-802733-2.00012-8>.
- [40] S. Won, J.H. Lee, B. Wali, D.G. Stein, I. Sayeed, Progesterone attenuates hemorrhagic transformation after delayed tPA treatment in an experimental model of stroke in rats: involvement of the VEGF-MMP pathway, *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 34 (2014) 72–80, <http://dx.doi.org/10.1038/jcbfm.2013.163>.
- [41] R. Cai, W. Xue, S. Liu, R.B. Petersen, K. Huang, L. Zheng, Overexpression of Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase prevents neurovascular degeneration after retinal injury, *FASEB J.* 29 (2015) 2749–2758, <http://dx.doi.org/10.1096/fj.14-265801>.