



TESI DOCTORAL

LA VIA JAK/STAT COM A MEDIADORA DE RESPOSTES A L'ESTRÈS OXIDATIU, LA INFLAMACIÓ I LA IMMUNITAT INNATA EN ASTRÒCITS

ROSER GORINA MENDIZ

DECEMBRE 2007

INTRODUCCIÓ

L'objectiu d'aquesta tesi ha estat l'estudi de la via de senyalització JAK/STAT, una via de transducció capaç de convertir un senyal extracel·lular en un canvi d'expressió gènica i produir respostes cel·lulars a estímuls externs. Els senyals que activen la via són citoquines, factors de creixement i l'estrès oxidatiu. L'interès del *Laboratori d'Isquèmia Cerebral* en el desenvolupament d'aquesta tesi resideix en el fet que alguns dels senyals activadors de la via JAK/STAT són importants en la fisiopatologia de la isquèmia cerebral, i que algunes proteïnes que participen en aquesta ruta es troben activades després de la isquèmia. Ni el mecanisme molecular de l'activació de la via JAK/STAT en resposta a la isquèmia, ni el seu paper en la progressió del dany són ben coneguts. Al llarg d'aquesta introducció es presenta la via JAK/STAT, la isquèmia cerebral i els processos desencadenats en la isquèmia que poden contribuir a l'activació d'aquesta via en el cervell isquèmic, que són, essencialment, l'estrès oxidatiu i la inflamació. També es considera breument l'activació de la via JAK/STAT en el sistema immunitari, donat que actualment es coneix que la lesió isquèmica cerebral indueix una síndrome d'immunodeficiència que està mitjançada per alteracions en les cèl·lules immunitàries, i que la via JAK/STAT és un component important en la senyalització en aquestes cèl·lules. Finalment, es presenta l'astròcit, doncs, és un tipus cel·lular que té un paper rellevant en la fisiopatologia isquèmica. L'activació astrocitària és un procés poc conegut, però s'ha descrit que la via JAK/STAT és important en astròcits i participa en la diferenciació i la mort cel·lular. Per aquests motius, els cultius d'astròcits han estat l'eina escollida per estudiar la via JAK/STAT en aquesta tesi.

1. VIA DE SENYALITZACIÓ JAK/STAT

En la via de transducció JAK/STAT hi participen dues famílies de proteïnes: la família tirosina quinasa *Janus* (JAKs) i la família de transductors del senyal i activadors de la transcripció (STATs). La família JAK està formada per 4 membres (Jak1, Jak2, Jak3 i Tyk 2) que es localitzen al citoplasma associats a receptors de citoquines. La família STAT inclou 7 factors de transcripció. Aproximadament uns 40 receptors de citoquines diferents utilitzen la via JAK/STAT, en les múltiples combinacions formades entre els quatre membres de la família JAK i els set de la STAT (Murray, 2007).

1.1. Janus quinases (JAKs)

Les Janus quinases o JAKs, són proteïnes intracel·lulars amb activitat tirosina quinasa. Presenten un pes molecular d'entre 120 i 140 kDa. Les 4 proteïnes JAK presenten trets estructurals comuns (figura 1). Entre els membres de la família JAK,

existeixen regions d'homologia (JH) altament conservades. La regió JH1 és el domini d'activitat quinasa que es localitza a la regió C-terminal (JH1/Ki). La substitució de residus específics en aquest domini inactiva la quinasa. JH2, es troba adjacent a JH1, presenta una estructura pseudo-quinasa (JH2/ ψ Ki), i tot i ser catalíticament inactiva, pot tenir funció reguladora (Sharinen et al., 2000). Es postula que JH2 pot funcionar com a lloc d'ancoratge per les proteïnes STAT (Fujitani et al., 1997), o bé regular l'activitat quinasa (Frank et al., 1994). Els 4 dominis JH de l'extrem amino-terminal (JH7-5 i la meitat de JH4) constitueixen el domini FERM que és homòleg al domini que es troba en molècules com *Four-point-one band*, Ezrina, Radaxina i Moesina (*FERM*), aquests dominis interaccionen amb el receptor de citoquines (Chishti et al., 1998; Hilkens et al., 2001). Entre el domini pseudoquinasa i el domini FERM, s'hi localitza una regió de funció desconeguda que presenta homologia amb dominis *Src homology 2* (SH2) (Schindler et al., 2007).

Les JAKs es troben constitutivament associades a receptors de membrana, un cop el lligand s'hi uneix, els receptors es dimeritzen induint un canvi conformacional en les proteïnes JAK que condueix a la seva activació.

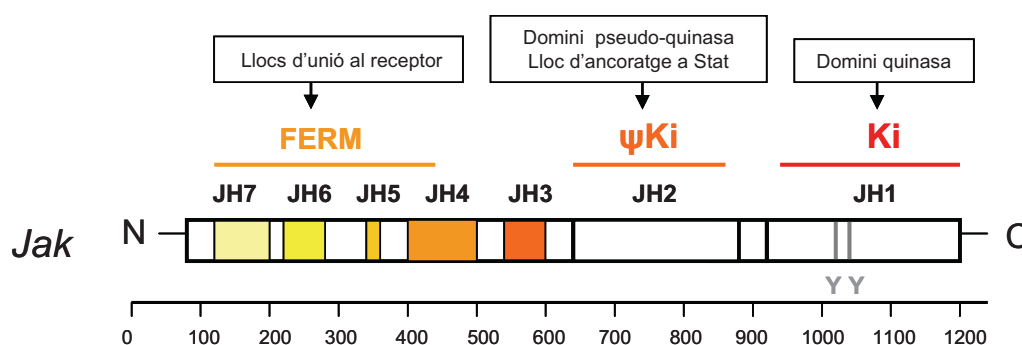


Figura 1. Estructura de les proteïnes de la família JAK.

Les JAK quinases poden actuar sobre diferents substrats: al inici de la via, actuen transferint γ -fosfats de l'ATP als grups hidroxils dels residus tirosina del domini citoplasmàtic del receptor. Aquests residus fosfo-tirosina esdevindran llocs d'ancoratge per molècules que presentin un domini SH2, com les STATs. Un cop les STATs hagin estat reclutades i s'hagin unit al receptor, seràn fosforilades en tirosina per acció de les JAK. Les JAK quinases poden ser substrat de elles mateixes i autofosforilar-se en residus de tirosina. S'ha demostrat que les JAK quinases necessiten que es fosforilin els residus tirosina conservats del *loop* d'activació perquè s'incrementi la seva activitat catalítica, i aquest procés depèn de la transfosforilació entre JAK quinases (Matsuda et al., 2004). La tirosina 1007 de Jak2 també és important per l'associació amb proteïnes

que regulen la via negativament, suggerint que el domini catalític podria actuar com a interruptor ON-OFF de l'activació de la quinasa (Ungureanu et al., 2002).

A banda dels residus de tirosina conservats en el domini catalític, trobem 12 residus de tirosina totalment conservats en tots els membres de la família JAK, i més de 40 tirosines de Jak2 conservades entre espècies. Recentment s'ha descrit que les tirosines fosforilades 966 i 81 de Jak2 actuen reclutant a les proteïnes p70 i SH2- β , respectivament (Carpino et al., 2002; Kurzer et al., 2006). De manera que les JAKs presenten molts llocs de fosforilació, tant al domini catalític com a la resta de la molècula, i el significat funcional de molts d'ells encara no es coneix.

1.2. *Signal Transducers and Activators of Transcription (STATs)*

Les proteïnes STATs formen una família de factors de transcripció citoplasmàtics. En mamífers, s'han descrit 7 membres de la família STAT: Stat1, Stat2, Stat3, Stat4, Stat5a, Stat5b i Stat6, que entre ells presenten una estructura molt conservada. Els gens de les proteïnes STAT es localitzen en tres regions cromosòmiques: Stat1 i Stat4 es troben al cromosoma humà 2 (cromosoma 1 en ratolins), Stat2 i Stat6 es localitzen al cromosoma humà 12 (cromosoma 10 en ratolins) Stat3, Stat5a i Stat5b estan en el cromosoma humà 16 (cromosoma 11 en ratolins) (Copeland et al., 1995). Existeix la hipòtesi de que els gens de les STATs provenen d'un únic gen ancestral comú que inicialment es va duplicar i es va dispersar pels diferents cromosomes.

Les proteïnes STAT presenten entre 750 i 851 aminoàcids (80-115KDa) i estan formades per 6 dominis diferents amb una funció definida cadascun (Darnell, 1997) (figura 2). Totes les STATs presenten un domini SH2 que ocupa la regió entre el residu 600 i el 700 i participa en l'interacció amb altres molècules de senyalització. El domini N-terminal (entre els residus 1-130, *NH₂*) participa en l'estabilització dels dímers i facilita la formació de tetràmers o oligòmers. Els tetramers estableixen la unió Stat-DNA de manera que s'incrementa l'activitat transcripcional. El següent domini (del residu 130 al 320, *coiled coil*) està format per 4 hèlix- α i presenta una gran superfície hidrofílica que és important per l'interacció amb altres proteïnes com l' *IFN regulatory factor-9* (IRF-9), el *N-Myc interacting protein* (Nmi-1), i el factor de transcripció c-jun. El domini d'unió a DNA està localitzat a la part central de la molècula (entre el residu 320-490, *DNA binding domain, DBD*) i en aquesta regió s'hi troben residus conservats en tots els membres de la família STAT. Aquest domini està format per un seguit de làmines β plegades de la mateixa manera que en el domini d'unió a l'ADN d' altres factors de transcripció, com NF κ B i p53. L'especificitat d'unió a l'ADN de cada STAT ve determinada per aquest domini. Entre la regió d'unió a l'ADN i el domini SH2, s'hi

localitza un domini espaiador (entre els residus 490-580, *linker*). La funció d'aquest domini espaiador no està clara però mutacions en els aminoàcids d'aquest domini poden afectar l'estabilitat de la unió a l'ADN. El domini SH2 presenta una estructura α -hèlix (del residu 580 al 675). El domini SH2 d'unió a tirosines fosforilades és necessari per l'ancoratge al receptor i la formació dels dímers. Les diferències presents en aquest domini fan que les diferents Stats siguin selectives alhora d'unir-se a diferents receptors de citoquines.

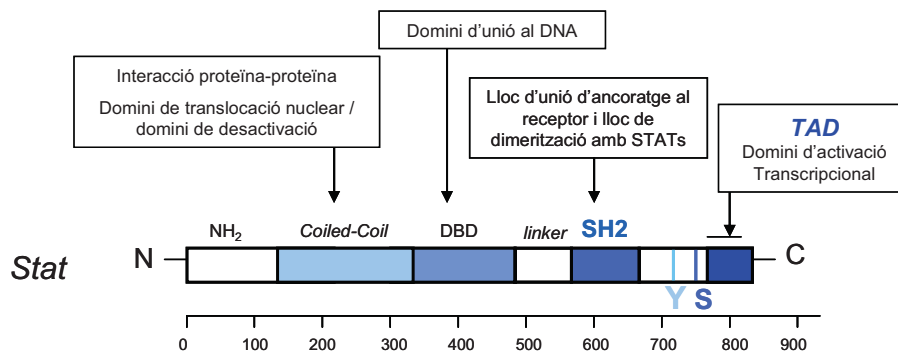


Figura 2. Estructura de les proteïnes de la família STAT.

A la regió carboxi terminal, les STATs presenten el domini d'activació de la transcripció (*transcriptional activation domain; TAD*) que participa en la comunicació amb altres factors de transcripció i co-activadors. Les Stats 1, 3, 4, 5a i 5b presenten una regió carboxi terminal curta, d'uns 40 o 50 aminoàcids, mentre que Stat2 i 6 tenen regions C-terminal més llargues. En les Stats 1, 3, 4, 5a i 5b aquesta regió es pot modificar per *splicing alternatiu*. L'isoforma llarga de la proteïna s'anomena α i la forma truncada β . En el cas de Stat3, existeixen 3 isoformes: Stat3 α , és la forma llarga; Stat3 β , és la forma truncada a la regió C-terminal per *splicing* (Schaefer et al., 1997) i Stat3 γ , és una altra isoforma truncada a la regió C-terminal en aquest cas per proteòlisi limitada (Chakraborty et al., 1998).

En aquesta regió també es localitza un aminoàcid tirosina molt conservat, que es fosforila quan la proteïna s'activa i és necessari per la dimerització, translocació nuclear i unió a l'ADN. A banda del lloc de fosforilació en tirosina, hi trobem un residu serina conservat que es pot fosforilar, i és crucial per assolir la màxima activitat transcripcional, alhora que actua controlant la disponibilitat del domini activador (Wen et al., 1995). Tant la fosforilació en tirosina com la fosforilació en serina, són importants per la formació i estabilització dels dímers.

1.2.1. EFECTES BIOLÒGICS DE LES PROTEÏNES STAT

Mitjançant la regulació de l'expressió dels gens efectors, les STATs controlen funcions biològiques tan importants com la regulació de la diferenciació cel·lular, la supervivència i l'apoptosi. En ratolí s'ha deletionat cadascun dels gens STAT, i l'anàlisi del fenotip d'aquests animals ha estat molt útil per determinar la funció individual de cada proteïna. Aquests estudis demostren el paper no redundant de les proteïnes STAT, tant pel que fa a la regulació de la resposta immune, com en processos no immunològics. En la taula següent es descriu el fenotip que presenten els diferents ratolins KO en relació al sistema immunitari (Taula 1).

Paper de les diferents STATs en el sistema immune		Referència
Stat1 ^{-/-}	Resposta a l'IFN alterada; augment de la susceptibilitat per infecció vírica, control del creixement danyat i major susceptibilitat a desenvolupar tumors	Meraz et al., 1996 Durbin et al., 1996
Stat2 ^{-/-}	Resposta a l'IFN alterada	Park et al., 2000
Stat3 ^{-/-}	Letalitat embrionària; resposta a patògens danyada en teixits específics	Takeda et al., 1997 Levy et al., 2002
Stat4 ^{-/-}	Pèrdua de senyalització en resposta al receptor IL-12 i diferenciació de cèl·lules Th1 danyada.	Kaplan et al., 1996 Thierfelder et al., 1996
Stat5a ^{-/-}	Senyalització induïda per prolactina danyada, desenvolupament de les glàndules mamaries defectiu	Cui et al., 2004
Stat5b ^{-/-}	Proliferació de cèl·lules Natural Killer mitjançada per cèl·lules T i activitat citolítica danyades; senyalització per l'hormona del creixement alterada.	Imada et al., 1998 Fain et al., 1999
Stat5a ^{-/-} Stat5b ^{-/-}	Eritropoiesis danyada; pèrdua de proliferació de cèl·lules T en resposta a IL-2; diferenciació de cèl·lules NK alterada	Teglund et al., 1998
Stat6 ^{-/-}	Senyalització a través dels receptors d'IL-4 i IL-13 malmeses, i per tant, diferenciació de cèl·lules Th2 defectuosa.	Shimoda et al., 1996 Takeda et al., 1996

Taula 1. Taula adaptada de Reich i Liu (2006).

Stat1 - Stat1 va identificar com un component del complex de transcripció ISGF-3, que s'estimula per IFN- α (figura 3) i s'uneix al element de resposta ISRE (Schiendler et al., 1992). Estudis següents van confirmar que GAF, el factor de transcripció que s'activa per l'IFN- γ i s'uneix a la seqüència GAS, és un homodímer de Stat1 (Shuai et al., 1992). D'aquesta manera es va demostrar el paper de Stat1 com a mediador de la resposta a IFN de tipus I i II. La proteïna Stat1 regula els efectes anti-virals i immunològics dels interferons a través de l'inducció de gens inflamatoris i immuno efectors com el complex major d'histocompatibilitat (MHC), molècules co-estimuladores, quimioquines, el sistema del complement, IRF1, iNOS i gens Fc γ RI. D'altra banda, Stat1 també regula els efectes anti-proliferatius i proapoptòtics dels

interferons, de manera que potencialment també pot actuar restringint la inflamació. Stat1 té un paper important en les respostes anti-tumorals. A banda de la seva participació en la modulació de la resposta immune, Stat1 també té funcions no immunes, com la regulació de la formació i destrucció òsea (Takayanagi et al., 2000).

Stat2 - Stat2 també va ser inicialment identificada com a part del complex de transcripció heterodimèric ISGF3. Stat2 s'activa únicament per IFN- α/β i IFN- λ (Kotenko et al., 2003), i és necessari per les respostes d'IFN de tipus I, com la resposta anti-viral. Stat2 juntament amb Stat1 i IRF9 forma el complex de transcripció heterodimèric ISGF3 i ISFG3 és essencial per la resposta a IFN- α/β . Stat2 també pot formar complexos amb Stat6 i IRF9 específicament en cèl·lules B.

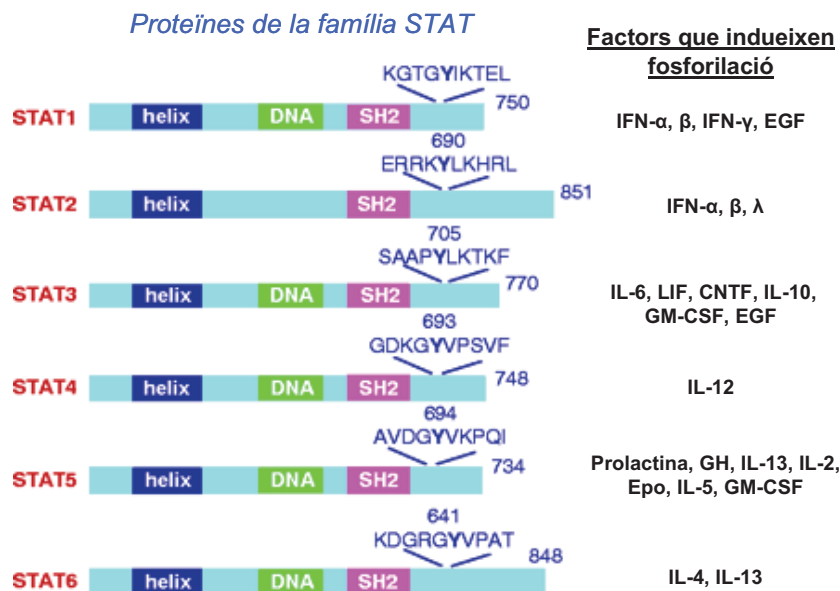


Figura 3. Esquema adaptat d'Akira et al., 1999.

Stat3 - La proteïna Stat3 va ser identificada com un factor de transcripció dependent d'IL-6 que promou l'expressió de gens de fase aguda (Akira et al., 1994). Stat3 es pot activar per múltiples citoquines com les de la família d'IL-6 (IL-6, IL-11, IL-31, LIF, CNTF) i la família d'IL-10 (IL-10, IL-19, IL-20, IL-22, IL-24, IL-26) i altres com la leptina, IL-21, i IL-27 (Kisseleva et al., 2002). Stat3 és essencial pel desenvolupament embrionari, de manera que el ratolí *knock out* no és viable. Estudis amb KO específics de teixit, han demostrat l'importància de la funció antiinflamatòria de Stat3. Stat3 també es troba constitutivament activat en molts tipus de càncers, ja que regula l'expressió de gens de supervivència i antiapoptòtics.

Stat4 - El gen que codifica per Stat4 es va identificar per la seva homologia amb Stat1. Stat4 s'activa en resposta a IL-12 i IL-23 i a més a més, en cèl·lules humanes, s'activa per IFN- α juntament amb Stat2 (Farra et al., 2000). El ratolí Stat4^{-/-} no produeix IFN- γ i té la resposta immune cel·lular alterada (Thierfelder et al., 1996).

Stat5 - Stat5a i Stat5b es codifiquen a partir de dos gens en tàndem provinents d'una duplicació. Aquests gens presenten més d'un 90% d'homologia i, donat el seu origen comú, tenen funcions redundants. Stat5 s'activa per un gran nombre de citocines, incloent l'hormona del creixement, la prolactina, EGF i PDGF i citocines hematopoietiques com IL-3, GM-CSF, IL-5, i l'eritropoietina. Estudis recents demostren que Stat5 és important en l'eritropoesis i limfopoesis (Yao et al., 2006).

Stat6 - Com Stat2, la seva veïna en el cromosoma, Stat6 és un dels membres més divergents de la família. Presenta un domini TAD relativament gran que pot interaccionar amb molts factors reguladors. Stat6 s'activa per IL-4 i IL-13, i en cèl·lules B per l'IFN- α . Entre els gens diana de Stat6 s'hi troben la cadena pesada ϵ de les immunoglobulines, CD23, MHC de classe II, GATA-3 i c-maf (Ivashkiv i Hu, 2004).

1. 3. ACTIVACIÓ DE LA VIA JAK/STAT

Segons el model clàssic d'activació de la via JAK/STAT (figura 4), una citocina o factor de creixement s'uneix al seu receptor de membrana donant lloc a la dimerització del receptor i a l'activació de les proteïnes JAK associades.

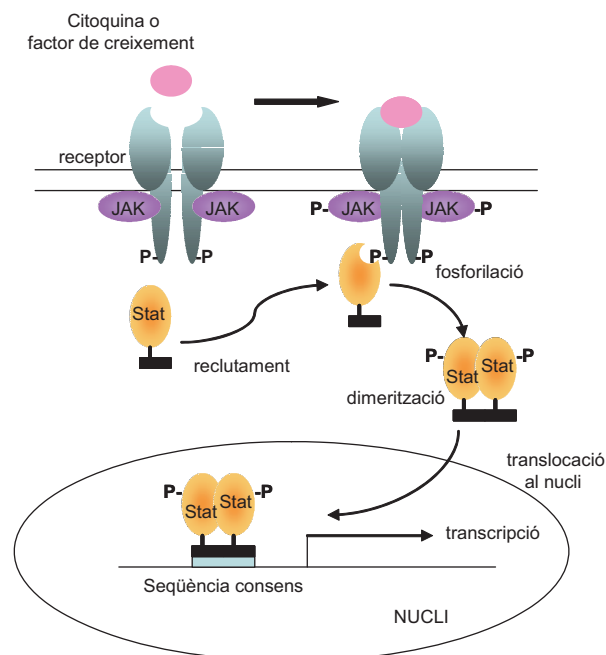


Figura 4. Model clàssic d'activació de la via JAK/STAT.

Les JAKs activades actuen fosforilant els residus de tirosina del domini citosòlic del receptor. Aleshores les STATs, que es troben en forma de monòmers inactius al citoplasma, seran reclutades cap a la membrana i s'uniran als residus fosfo-tirosina del receptor mitjançant el domini SH2. Diferents estudis aporten dades que modifiquen aquest model clàssic d'activació de JAK/STAT en alguns punts.

En primer lloc, les proteïnes STATs quan es troben inactives al citoplasma estan formant part d'un complex heteromèric anomenat *Statosoma* (Ndubuisi et al., 1999). Els statosomes inclouen un seguit de proteïnes accessòries que participen en la presentació de la proteïna STAT al receptor de membrana i que actuen de xaperones facilitant la translocació al nucli (figura 5). En sistemes *in vitro* lliures de citoquines, la Stat3 citosòlica es troba formant complex d'un tamany que oscil·la entre els 400 i els 200 kDa (*Statosoma I*) i complexos de major tamany, d'entre 1 i 2 MDa (*Statosoma II*), mentre que només una porció pràcticament indetectable es troba en forma monomèrica. També s'ha observat complexos citosòlics d'elevat pes molecular on s'hi troba Stat1, Stat5a o Stat5b. El complex *Statosoma I* que conté Stat3 està format com a mínim per vuit polipèptids diferents. Una de les primeres proteïnes del *Statosoma I* en ser identificada va ser la xaperona GRP58/ER-60/Erp57 (Gou et al., 2002). Les principals xaperones identificades, GRP58, Tid1 i Hsp90, estan relacionades amb l'activació de Stat3.

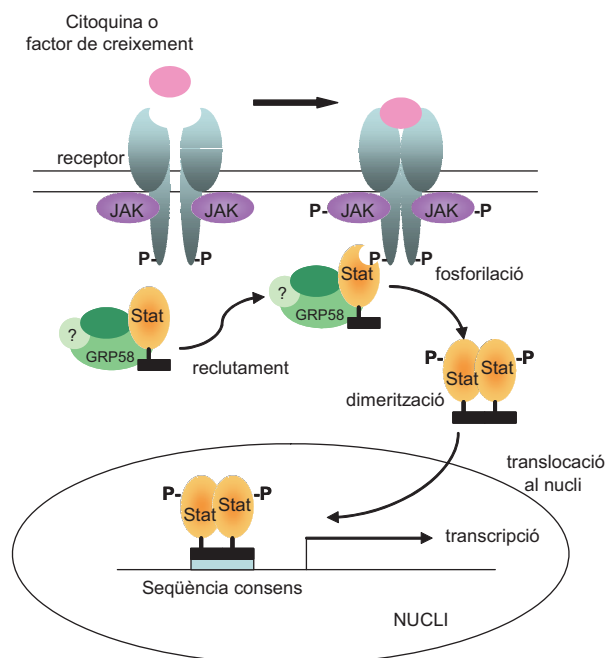


Figura 5. Nou model d'activació de la via JAK/STAT.

Altres estudis proposen que existeix una porció del total de proteïna Stat que es troba continguda en els microdominis *Raft* de la membrana plasmàtica. Aquests

microdominis lipídics són rics en glucolípid, esfingolípid i colesterol i participen en funcions cel·lulars tan importants com el transport vesicular o la transducció de senyals. Els dominis *raft* actuen com a unitats funcionals i participen en processos de senyalització. Formant part dels dominis *raft*, s'han localitzat proteïnes quinases de la família JAK i cadenes dels receptors de diverses citoquines (gp130 del receptor d'IL-6, IFN- γ R1 i IFN- γ R2, IFNAR1, IFNAR2 i la cadena CD120a del receptor de TNF- α) (revisat a Sehgal, 2003). També les proteïnes Stat1 i Stat3 poden localitzar-se formant part d'aquests dominis. Aquests estudis suggereixen que les STATs són activades en els dominis *raft* de la membrana (*Hipòtesi de la senyalització de raft-Stat*). Conceptualment, aquesta hipòtesi fa pensar en els *rafts* que contenen STATs com a llocs físics per l'integració dels efectes combinatoris de diferents citoquines i vies d'activació.

1.3.1. TRANSLOCACIÓ NUCLEAR DE LES STATs

Després de la fosforilació en tirosina i la dimerització, les STATs activades s'acumulen al nucli mitjançant diferents models d'internalització.

Existeixen mecanismes reguladors que controlen l'entrada i la sortida de proteïnes del nucli a través del complex del porus nuclear (*Nuclear Pore Complex*, NPC). Les molècules petites poden difondre a través del NPC, però el pas de proteïnes grans està restringit. Les molècules grans, com els dímers de Stats, que pesen aproximadament 180KDa, presenten l'anomenada *seqüència de localització nuclear* (NLS) que permet que siguin guiades per un transportador a través del NPC. Aquest senyal pot funcionar de manera constitutiva o transitòria. Les proteïnes encarregades del transport transmembranal pertanyen a la família *karioferina- β* i tant poden importar com exportar proteïnes del nucli, per això es coneixen com a importines i exportines respectivament. Aquesta seqüència NLS és reconeguda per un proteïna adaptadora de la família importina- α , que s'unirà a l'importina- β 1, per portar a terme l'ancoratge de la proteïna a la cara citoplasmàtica del NPC. El complex format per les importines i la proteïna que conté la NLS serà translocat al nucli a través del porus. Aquest pas requereix activitat GTPasa.

Stat1 i Stat2 no presenten la clàssica seqüència NLS, però s'ha observat que la fosforilació i subseqüent dimerització d'aquestes STATs per formar un homodímer de Stat1 o un heterodímer Stat1-Stat2 comporta un canvi conformacional que fa que l'importina- α 5 s'hi pugui unir (Fagerlund et al., 2002). Els residus Leu 407, Lys 410 i Lys413 presents al domini d'unió a l'ADN són indispensables per a que tingui lloc l'associació de Stat1 amb l'importina- α 5. Aquesta regió entre els residus 407 i 413 s'ha definit com el senyal de localització nuclear específic del dímer (dsNLS) (McBride et

al., 2002). Els dímers de Stat1 associats a l'importina- $\alpha 5$ no poden interaccionar amb l'ADN, i l'importina no es pot unir a Stat1 quan aquest es troba interaccionant amb l'ADN, de manera que la seqüència consens d'ADN i l'importina- $\alpha 5$ competeixen per la unió als dímers de Stat1 (Fagerlund et al., 2002).

Les diferents STATs presenten models individuals de la regulació del tràfic nuclear. Stat5b presenta un model d'internalització nuclear anàleg a Stat1, en canvi, Stat3 s'internalitza al nucli constitutivament de manera independent al seu estat de fosforilació. Stat3 presenta una seqüència NLS constitutiva que és reconeguda específicament per l'importina- $\alpha 3$ i produeix l'acumulació nuclear de Stat3 (Pranada et al., 2004).

La presència de les Stats al nucli és transitòria, de manera que és necessària l'exportació cap al citoplasma. L'exportació de les Stats també depèn de residus presents al domini d'unió a l'ADN. S'han identificat seqüències d'exportació nuclear (NES) en Stat1 i en Stat3. En Stat3, existixen 3 elements NES localitzats entre els residus 306-318, 404-414 i 524-535 (Bhattacharya et al., 2003). En el cas de Stat1, els tres NES es localitzen entre els aminoàcids 197-205, 302-314 i 392-413. El tercer NES inclou la Leu 407, que és necessària per a l'importació nuclear, això indica que la seqüència NLS i la NES del domini d'unió a l'ADN de Stat1 es superposen. Aquesta seqüència NES interacciona amb el receptor llançadora CRM1, que unit a la ranGTPasa s'associa a la part interna del NPC i regula l'exportació. Quan Stat1 es troba unida a l'ADN, la NES, que es localitza en aquest domini, no és accessible a CRM1. Després de la desfosforilació i l'alliberació de l'ADN, els dímers de Stat1 poden interaccionar amb CRM1 i ser exportats al citoplasma.

1.3.2. ACTIVACIÓ TRANSCRIPCIONAL DE LES STATs

La capacitat dels dímers de STAT per regular la transcripció gènica depèn de l'interacció amb diferents coactivadors nuclears i proteïnes adaptadores. Les proteïnes que interaccionen amb les STATs indueixen modificacions a la cromatina i modulen la maquinària transcripcional.

Les *Histone AcetilTransferases* (HATs) són una classe d'activadors nuclears que incorporen grups acetil als residus lisina de les histones. Els grups acetil es troben carregats negativament i generen una força repulsiva amb les histones que estan hiperacetilades, així s'aconsegueix obrir la cromatina (Korzus et al., 1998).

Les STATs també poden interaccionar directament amb co-activadors transcripcionals mitjançant el seu domini TAD com el *CREB-Binding Protein/p300* (CBP/p300) (Paulson et al., 1999), i també necessiten interaccionar amb proteïnes addicionals, com la *minichromosome maintenance 5* (MCM5), i la *N-Myc-interacting*

protein (Nmi), per aconseguir la màxima activació transcripcional. Les STATs també presenten la capacitat d'unir-se a factors de transcripció addicionals, com Jun, *Specificity protein 1* (Sp1), i el receptor de glucocorticoids (Brierley i Fish, 2005).

1.4. REGULACIÓ NEGATIVA DE LA VIA JAK/STAT

L'activació de les proteïnes STAT és transitòria, de manera que la seva inactivació és molt important pel control de les seves funcions biològiques. En poques hores, el senyal decau i les STATs són exportades al citoplasma per ser reutilitzades en la pròxima tanda d'activació. Existeixen diferents mecanismes que regulen negativament la via JAK/STAT (figura 6).

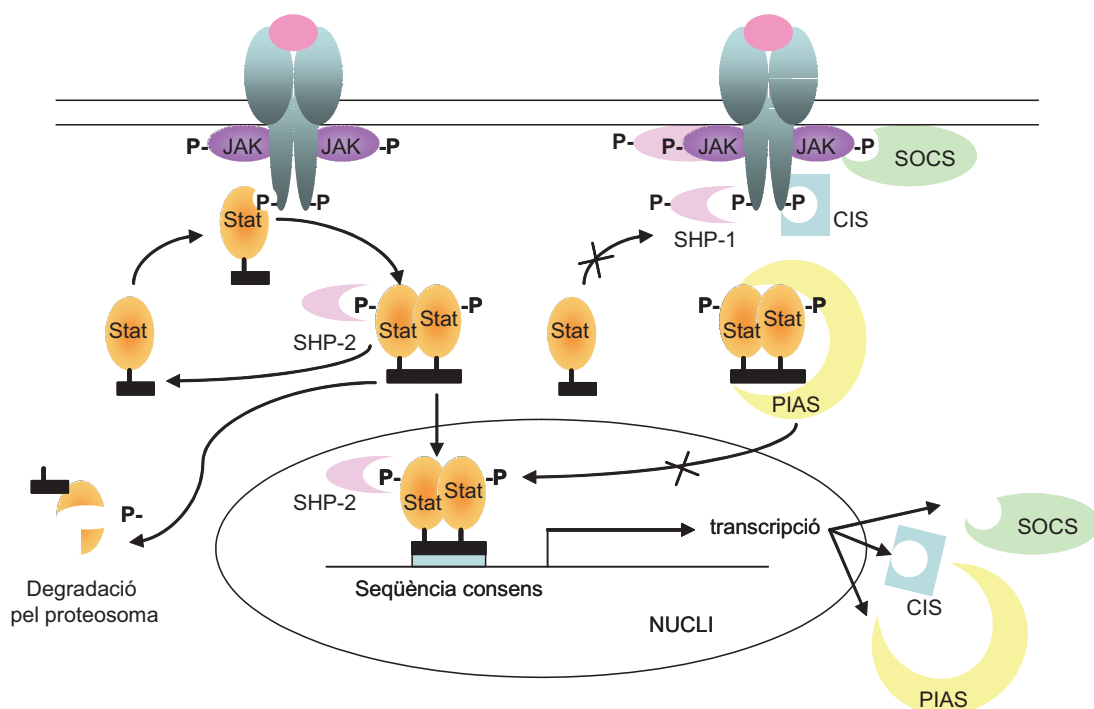


Figura 6. Mecanismes de regulació negativa de la via JAK/STAT.

Desfosforilació - El primer mecanisme depèn de les tirosina fosfatases. Tan importants com són les tirosina quinases en l'activació de la via JAK/STAT, ho són les tirosina fosfatases en l'inactivació. La desfosforilació de les STATs és necessària per ser exportades al citosol, de manera que aquesta desfosforilació és principalment nuclear. A nivell nuclear, la fosfatasa TC-PTP participa en la desfosforilació de Stat1 i Stat3, i també s'ha descrit que la SHP-2 està implicada en la desfosforilació nuclear de les STATs (Wu et al., 2002).

La desfosforilació de STATs a nivell citoplasmàtic també és possible, la tirosina fosfatasa SHP-2 i la proteïna fosfatasa 2A (PP2A) actuen desfosforilant en tirosina i

serina respectivament. La proteïna tirosina fosfatasa 1B (PTP1B) també regula negativament la ruta, ja que actúa desfosforilant a Jak2 i Tyk2 (Myers et al., 2001).

Les fosfatases que contenen un grup SH2 (SHPs), la SHP1 i SHP2, poden inactivar la via de transducció desfosforilant residus del receptor o de les JAKs, i així inhibint el reclutament de les STATs. Les fosfatases SHPs interaccionen amb tirosines fosforilades dels receptors o de les quinases mitjançant els seus dominis SH2. Tant SHP1 com SHP2 són importants en la regulació negativa de la senyalització per IFN (You et al., 1990; Massa i Wu, 1996).

Protein Inhibitors of Activated Stats (PIAS) - Les proteïnes (*Protein Inhibitors of activated Stats*) PIAS formen una família de reguladors negatius de la via JAK/STAT que s'expressen constitutivament en el nucli i en el citoplasma. Les proteïnes PIAS interaccionen amb els dímers de STATs fosforilats i inhibeixen la seva activitat. S'han identificat 4 membres de la família en mamífers: PIAS1, PIAS3, PIASX i PIASY. PIAS1 i PIAS3 interaccionen amb Stat1 i Stat3 respectivament, impeding la unió a l'ADN. PIAS1 també pot bloquejar la unió de Stat1 al seu promotor, inhibint l'expressió dels gens de resposta a IFN (Liu et al., 2004). D'altra banda, PIASX i PIASY no inhibeixen la unió amb l'ADN, sinó que actuen de co-repressors de la transcripció induïda per STATs. PIASX s'associa a Stat4 i bloqueja l'inducció gènica activada per l'IL-12 (Arora et al., 2003).

Totes les proteïnes PIAS presenten activitat E3 lligasa per la proteïna SUMO (*small ubiquitin-related modifier*). La unió de SUMO a una proteïna induïx canvis en la seva localització, activitat o unió a altres proteïnes. PIAS1, PIAS3 i PIASX poden induir la unió covalent de SUMO a Stat1 en la Lisina 703 inhibint l'activació de Stat1 (Ungureanu et al., 2003).

Suppressor of Cytokine Signaling (SOCS) - Una altra família d'inhibidors important en la senyalització de moltes citoquines, és la família de proteïnes *suppressor of cytokine signaling* (SOCS), que també s'anomenen *JAK binding protein* (JAB) o *STAT-induced STAT inhibitor* (SSI). Vuit membres componen aquesta família, de la SOCS1-SOCS7 i la *cytokine inducible SH2-containing protein* (CIS). Les SOCS regulen negativament la via de senyalització JAK/STAT mitjançant diferents mecanismes: el primer, inhibint directament les JAK, unint-se al receptor o al domini d'activació de les JAK. També poden bloquejar els residus de fosfo-tirosina del receptor i de les JAK amb el seu domini SH2. En tercer lloc, poden dirigir components activats de la ruta cap a la degradació mitjançada pel sistema ubiquitina / proteosoma (Larsen i Röpke, 2002).

CIS (el primer membre de la família en ser clonat), SOCS1, SOCS2 i SOCS3 actuen com a reguladors negatius de la senyalització de citoquines, mentre que la funció de SOCS4-7 no està plenament descrita. SOCS1 i SOCS3 s'uneixen a les JAK quinases mitjançant l'interacció entre el domini SH2 i la fosfo-tirosina.

SOCS1 també pot inhibir l'activitat catalítica de les JAK, en canvi SOCS3 és molt menys eficient (Ivashkiv i Hu, 2004). SOCS1 regula la senyalització per IFN- γ i també funciona com a regulador de la resposta innata modulant la senyalització dels TLRs (Nakagawa et al., 2002). SOCS3 s'expressa en resposta a múltiples citoquines, com IL-6 o IL-10.

Excepte en alguns teixits com el timus o el fetge fetal, les SOCS no s'expressen a nivell basal però són ràpidament induïdes, ja que són gens de resposta immediata a citoquines que activen la ruta JAK/STAT o a citoquines inflamatòries com l'IL-1 β o el TNF- α . De manera que les SOCS són molt importants en la regulació de la resposta immune. Estudis de sobreexpressió gènica demostren l'importància de SOCS1, SOCS2 i SOCS3 en l'antagonització de les respostes d'IFN- γ -Stat1, IL-12-Stat4, IL-4-Stat6, GH-Stat5 i IL-6-Stat3 (Revisat per Alexander i Hilton, 2004).

Formes truncades - Un altre mecanisme de regulació de les STATs és l'*splicing* alternatiu. Stat1, Stat3, Stat5a i Stat5b presenten formes de la proteïna truncades en l'extrem C-terminal. Aquestes proteïnes es comporten com a dominants negatius (Wang et al., 1996). A la forma truncada de Stat1, Stat1 β , li manquen 38 aminoàcids, i els homodímers composts per Stat1 β no poden activar la transcripció de l'ADN degut a la falta del TAD.

1.5. MODIFICACIONS POSTTRANSCRIPCIONALS DE LES STATs

La durada i el grau de l'activació de les proteïnes STAT es controla de manera molt estricta per diferents mecanismes reguladors, que principalment estan basats en modificacions postranscripcionals o interaccions amb proteïnes reguladores.

Fosforilació en tirosina - Aquesta fosforilació és necessària perquè tingui lloc la dimerització, l'internalització al nucli i la unió a l'ADN de les STATs. Per sortir del nucli, és necessària la desfosforilació, de manera que aquesta fosfo-tirosina juga un important paper en la retenció nuclear de les STATs, i és indispensable per l'activitat transcripcional.

Fosforilació en serina - Totes les STATs excepte Stat2 es fosforilen com a mínim en un residu de serina del domini TAD, la Ser727. Stat1 i Stat5 presenten un lloc de fosforilació en serina addicional en el TAD, Ser708 i Ser779, respectivament. Aquesta fosforilació té lloc independentment de la fosforilació en tirosina i és

necessària per assolir el grau màxim d'activació. S'han descrit diferents serines quinases segons l'estímul activador i la proteïna STAT implicada: p38MAPK (com a quinasa de Stat1, 3 i 4), ERK (Stat3 i Stat5) i JNK (Stat3), PKC δ (Stat1 i 3), mTOR (Stat3), NLK (Stat3), i CaMKII i IKK ϵ (Stat1) (Revisat per Schindler et al., 2007).

Acetilació – L'acetilació reversible en lisina s'ha descrit per Stat1, Stat3 i Stat6. Aquesta acetilació depèn de l'associació de les STATs amb les histona desacetilases o les histona acetil-transferases, com la CBP/p300. En Stat1 i 3, l'acetilació afecta la via de senyalització NF κ B, donant lloc a un efecte proapoptòtic en el cas de Stat1 i anti-apoptòtic en el cas de Stat3 (Kramer et al., 2006; Nadiminty et al., 2006). L'acetilació de Stat3 també regula l'activitat transcripcional i l'estabilitat dels homodímers (Yuan et al., 2005).

Metilació - La metilació de les STATs es va descriure per primer cop en en l'arginina 31 de Stat1 en resposta a IFN- α . L'inhibició de la metilació inhibeix la unió a l'ADN i la transcripció gènica i augmenta l'interacció de Stat1 amb PIAS1 (Mowen et al., 2001). El residu Arg 31 està conservat en totes les STATs i seva metilació també s'ha descrit en Stat3 i Stat6.

O-glicosilació – L'O-glicosilació de la treonina 92 de Stat5 està associada un augment de l'afinitat amb el coactivador CBP (Gewinner et al., 2004).

Ubiquitinització - Stat1 i Stat4 també poden trobar-se ubiquitinades. La proteïna *STAT-interacting LIM protein* (SLIM) porta a terme el la poliubiquitinització que conduirà a la degradació de les STATs pel proteosoma (Tananaka et al., 2005).

ISGilació – L'ISGilació és una nova modificació postranscripcional recentment descrita en STATs. L'ISG15 és una proteïna que s'indueix en forma de precursor de 17KDa i és tallada per proteases específiques per donar lloc a una proteïna de 15KDa. És un membre de la família de proteïnes semblants a ubiquitina que inclou SUMO i Nedd8, i presenten alta homologia amb l'ubiquitina. ISG15 es conjuga amb els seus substrats de manera similar a l'ubiquitina, però l'ISGilació no dirigeix a les proteïnes cap a la degradació en el proteosoma (Malakhov et al., 2003). L'ISG15 és un del gen que s'indueix en resposta a una infecció vírica, a l'estimulació amb IFN de tipus I, o amb LPS. Suggestint que l'ISGilació pot jugar un paper important en la resposta immune innata. Fins ara només s'ha descrit l'ISGilació de Stat1. L'ISGilació regula positivament la via de senyalització JAK/STAT en resposta a IFN (Malakhova et al., 2003), encara que hi ha estudis que demostren que no és essencial per a que l'activació de Stat1 després de l'estimulació amb IFN (Osiak et al., 2005).

SUMOilació - Les proteïnes de la família PIAS presenten activitat SUMO E3 lligasa, de manera que actuen addicionant la proteïna SUMO a la lisina 703 de Stat1 (Kotaja et al., 2002). La lisina 703 de Stat1 està conservada entre espècies, en canvi

no està present en altres membres de la família STAT. Stat1 pot ser SUMOilada per diferents proteïnes SUMO, mentre la conjugació amb SUMO3 no sembla tenir cap efecte, la conjugació amb SUMO1 està potenciada per l'IFN- γ (Ungureanu et al., 2003). La SUMOilació de Stat1 en resposta a l'IFN- γ regula negativament un grup específic de gens activats per Stat1 (Rogers et al., 2003).

2. RELLEVÀNCIA DE LA VIA JAK/STAT EN LA ISQUÈMIA CEREBRAL

2.1. ISQUÈMIA CEREBRAL

2.1.1. PENOMBRA ISQUÈMICA

La malaltia cerebrovascular isquèmica té lloc degut a la reducció, per sota d'un nivell crític, del flux sanguini cerebral (FSC) global o d'un determinat territori arterial, i la conseqüència principal és la manca d'oxigen i glucosa necessaris pel manteniment del metabolisme cerebral. Aquesta interrupció o disminució del FSC en un territori vascular determinat genera un gradient de dany a la regió implicada, amb un nucli isquèmic on les cèl·lules moren ràpidament per necrosi i una zona que envolta el nucli, anomenada "penombra isquèmica" que es manté viable degut a circulació col·lateral (figura 7). Tot i així, en aquesta regió, el FSC residual és insuficient per mantenir la funcionalitat cel·lular. Les neurones no poden desencadenar potencials d'acció però mantenen un petit potencial de repòs mitjançant l'activitat de les bombes de sodi, que les manté vives durant un temps limitat (Hossman, 1994).

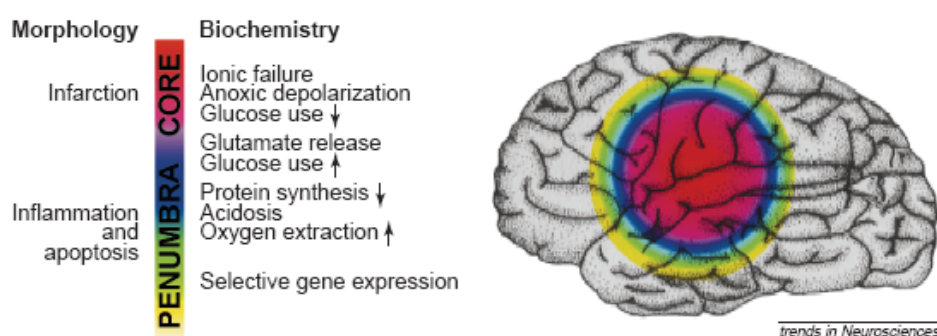


Figura 7. La penombra isquèmica (Dirnagl et al., 1999).

La penombra és una regió dependent del temps, la successió de fenòmens coneguda com la "cascada citotòxica isquèmica" (figura 8), juntament amb la reacció glial i les alteracions de la microcirculació induiran la destrucció progressiva del parènquima cerebral. Si la reperfusió de la penombra té lloc durant les primeres hores,

les neurones evolucionen cap a la recuperació funcional, si no és així, la cascada isquèmica esdevé imparabile i pot ser inclús potenciada per la reperfusió, que per sí mateixa pot contribuir a potenciar la lesió isquèmica. Aleshores, les neurones malmeses moren i s'extén l'infart.

La penombra isquèmica és el territori cerebral potencialment salvable. El temps és un factor crucial a l'hora d'instaurar una teràpia específica i salvar la major quantitat de teixit possible (Sanchez-Chavez, 1999).

2.1.2. CASCADA ISQUÈMICA CITOTÒXICA

El funcionament del cervell és totalment depenent de la glucosa i l'oxigen que l'hi aporta el flux sanguini. La reducció del FSC compromet el metabolisme oxidatiu de la glucosa, de manera que la cèl·lula subsisteix mitjançant la respiració anaeròbica, amb la subseqüent producció d'àcid làctic i acidosis tissular (Symon et al., 1993). Aquesta acidificació deteriora la funció cerebral amb cada cop menor possibilitat de recuperació com més temps es trigui a recuperar el metabolisme oxidatiu.

La manca d'oxigen comporta el desacoblament de la fosforilació oxidativa de manera que disminueix el nivell d'adenosina trifosfat (ATP). L'ATP és la font energètica necessària per mantenir el funcionament de les bombes iòniques de les membranes cel·lulars. La disminució d'ATP durant la isquèmia, produeix la pèrdua de l'homeòstasi iònica. La fallida de les bombes Na^+ i de K^+ origina la sortida de K^+ de l'interior cel·lular, i l'entrada al citosol de Na^+ , Ca^{2+} , i d'aigua per pressió osmòtica (Siesjo, 1990). Això comporta d'una banda l'aparició d'edema citotòxic i de l'altra despolarització neuronal, degut a l'impossibilitat de mantenir el potencial de membrana. L'intensa despolarització de la membrana neuronal produeix l'alliberació massiva de glutamat i d'altres aminoàcids excitatoris. Inicialment el glutamat s'allibera des de les vesícules presinàptiques del terminal nerviós i més tard pel transport revers que realitzen els astròcits.

Les elevades concentracions de glutamat acumulat a l'espai extracel·lular són neurotòxiques, de manera que la toxicitat per glutamat o "excitotoxicitat" participa en la patogènesis de la isquèmia. El glutamat alliberat estimula els receptors ionotròpics de membrana NMDA i AMPA, induint l'entrada de més Na^+ i la sortida de més K^+ a través dels canals iònics associats als receptors activats. L'activació dels receptors de glutamat contribueix a generar una ona de despolarització de les membranes neuronals que s'escampa des del nucli isquèmic cap a la penombra (Lee et al., 2000). L'estimulació dels receptors NMDA produeix l'entrada de Ca^{2+} des de l'espai extracel·lular i permet la sortida de Ca^{2+} mitocondrial, amb la conseqüent acumulació de Ca^{2+} intracel·lular (Hossman, 1994).

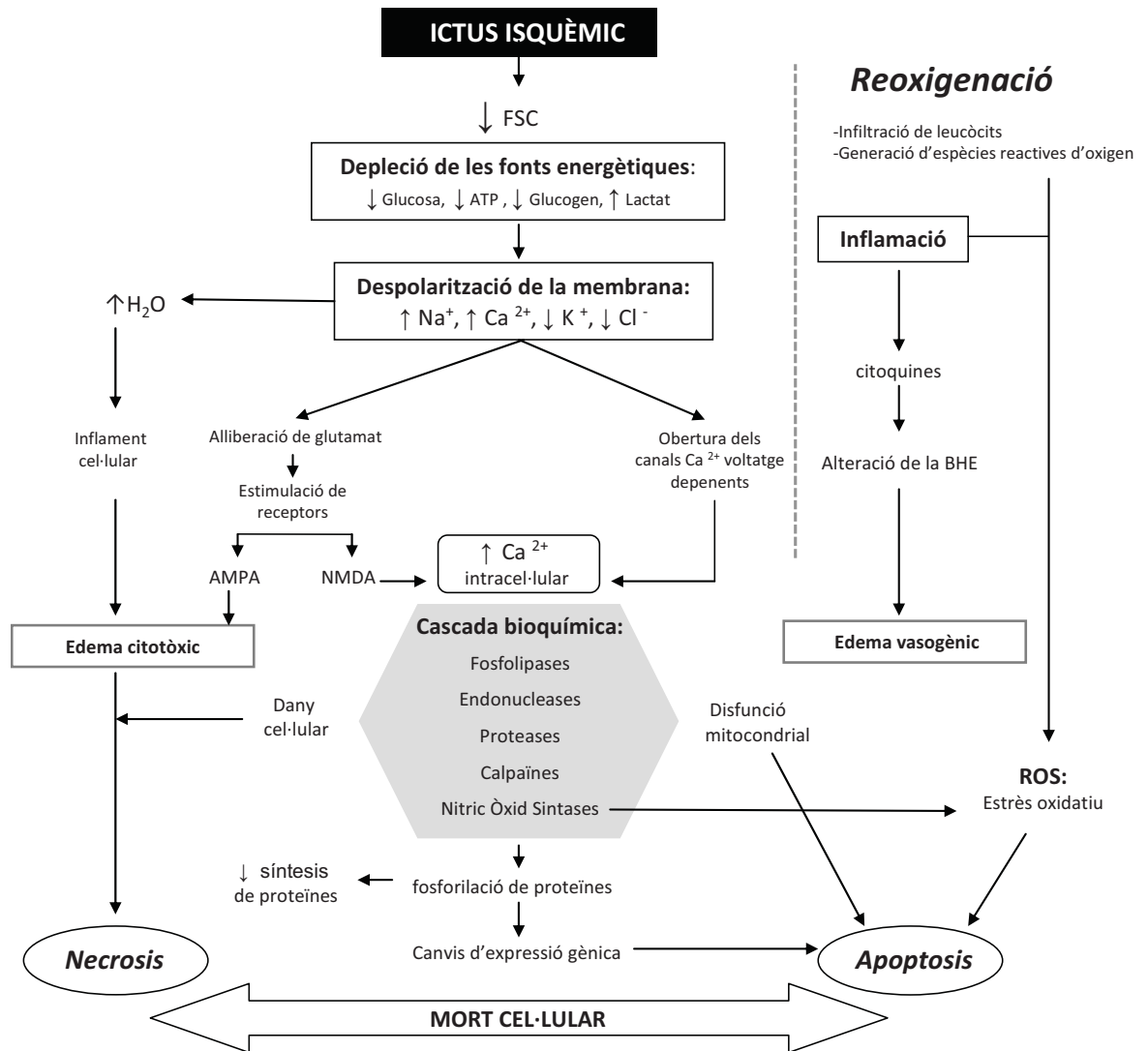


Figura 8. Cascada isquèmica citotòxica

L'increment de Ca^{2+} intracel·lular activa un seguit d'enzims Ca^{2+} -depenents, proteïnes quinases i fosfatases, calpaïnes, proteases, fosfolipases, endonucleases i la sintasa d'òxid nítric (NOS) i condiciona l'expressió de gens de resposta ràpida (Castillo et al., 2003). També té lloc a l'alliberació d'àcid araquidònic amb el conseqüent augment de la producció de prostaglandines i radicals lliures. La membrana cel·lular es degrada per acció de les fosfolipases i esdevé més permeable. La sobrecàrrega de Ca^{2+} intracel·lular comporta una sobrecàrrega de Ca^{2+} mitocondrial. Per reestablir el gradient original, es produeix l'obertura d'un *porus de permeabilitat transitòria* a la membrana mitocondrial. A través del porus es produeix la sortida al citosol d'ions i molècules de baix pes molecular, com el citocrom c i altres factors proapoptòtics que iniciaran l'apoptosi depenent de caspases (Sugawara et al., 2004). En aquest escenari, quan té lloc la recuperació del FSC s'inicia una segona tanda de mecanismes perjudicials que contribuiran a incrementar el dany tissular.

2.1.3. DANY PER REPERFUSIÓ

El dany per reperfusió ve donat, d'una banda, per la producció d'estrès oxidatiu, i de l'altra, per la resposta inflamatòria que produirà infiltració de leucòcits cap al parènquima lesionat. Aquests leucòcits poden tapar capil·lars en condicions de baix FSC i impedir la restauració de la reoxigenació en determinades regions cerebrals. A més a més, els leucòcits infiltrats augmenten la producció de radicals lliures i secreten mediadors inflamatoris que potencien la destrucció cel·lular. El desenvolupament de la reacció inflamatòria i l'alteració secundària de la microcirculació participen en el trencament de la barrera hematoencefàlica, fet que deriva en l'extravessament de proteïnes plasmàtiques i produeix l'aparició de l'edema vasogènic (Hatashita i Hoff, 1990).

A la fase isquèmica es generen radicals lliures en excés i s'alteren les defenses antioxidants. A més a més, durant el reestabliment del flux sanguini, s'aporta oxigen novament a les cèl·lules i aquest oxigen és substrat de múltiples reaccions oxidatives que originaran més radicals lliures produint estrès oxidatiu. Els radicals lliures danyen les proteïnes, l'ADN i les membranes cel·lulars. Aquestes espècies reactives d'oxigen també poden activar les vies de senyalització redox i juntament amb el dany mitocondrial i els mediadors inflamatoris, ser responsables de l'apoptosi cel·lular.

2.1.4. PAPER DE LA VIA JAK/STAT EN LA ISQUÈMIA CEREBRAL

2.1.4.1. LA VIA JAK/STAT EN EL SISTEMA NERVIÓS CENTRAL

El patró d'expressió de les diferents proteïnes JAK i STAT varia segons l'estadi de maduració i la regió del cervell. Mentre alguns membres de la família STAT, com Stat3, s'expressen constitutivament en el sistema nerviós central (SNC) adult i en el desenvolupament (Planas et al., 1997), altres presenten un patró d'expressió molt més complex, com Stat6, que també s'expressa durant el desenvolupament embrionari i es redueix fins a ser indetectable a l'edat adulta (De-Fraja et al., 1998). L'expressió de les proteïnes JAK i STAT també es diferencia segons el tipus cel·lular.

2.1.4.2. ACTIVACIÓ DE LA VIA JAK/STAT EN LA ISQUÈMIA CEREBRAL

Estudis portats a terme en el nostre laboratori mostren que l'expressió de Jak1, Jak2, Stat1 i Stat3 s'incrementa després de la isquèmia en astròcits reactius i micròglia, en el model d'isquèmia focal transitòria en rata (Planas et al., 1996; Planas et al., 1997; Justicia et al., 2000). S'observa un important augment de l'expressió de Stat1 i Stat3 en la micròglia reactiva/macròfags aproximadament a uns 4 dies després

de la isquèmia, coincidint amb el moment en que la reacció glial és màxima. Aquests resultats suggereixen que l'activació de la via JAK/STAT específicament en les cèl·lules gials, podria participar en l'adaptació d'aquestes cèl·lules als canvis desencadenats en resposta a la isquèmia.

L'activació de la via JAK/STAT s'ha descrit també durant les primeres hores després de la isquèmia. En els astròcits s'observa un ràpid increment de l'expressió de Jak1 i del marcatge nuclear de Stat3 (Planas et al., 1997). També s'ha trobat Stat3 fosforilada en neurones de l'àrea de penombra a 3h i mitja després de la reperfusió, assolint el màxim d'activació a les 24h, en el model d'oclusió de l'artèria cerebral mitja (OACM) (Suzuki et al., 2001). En model d'OACM, Stat1 també es fosforila en tirosina en el nucli de l'infart i en la penombra 3h després de la reperfusió (West et al., 2004). L'estudi portat a terme per Takagi, demostra que Stat1 es fosforila en tirosina i serina pocs minuts després de la reperfusió en neurones (Takagi et al., 2001).

Stat5 també es fosforila i transloca al nucli en la regió hipocampal CA1 en un model d'isquèmia global transitòria 1h després de la reperfusió (Zhang et al., 2007). A banda d'aquest treball recent, la major part de estudis sobre l'activació de la via JAK/STAT en resposta a la isquèmia cerebral s'han focalitzat en les proteïnes Stat1 i Stat3. Altres membres de la família STAT podrien participar en la resposta a la isquèmia cerebral, però la seva contribució es desconeix.

2.1.4.3. PAPER DE STAT1 I STAT3

Tant Stat1 com Stat3 participen en el control del destí cel·lular. Stat1 pot actuar induïnt la mort cel·lular a través de l'activació de caspasa-1 (Chin et al., 1997), i entre els seus gens diana presenta gens pro-apòptotics com FAS, FAS lligand (FASL), p21 i p53. Les cèl·lules Stat1^{-/-} són resistents a l'apoptosi induïda per TNF- α , donada la falta d'expressió constitutiva de caspasa-1, caspasa-2 i caspasa-3. (Levy i Darnell, 2002). Stat1 acetilat també pot induir apoptosi unint-se directament i inhibint la subunitat p65 de NF κ B (Wang et al., 2000). Aquest paper proapoptòtic de Stat1 també s'ha posat de manifest en la isquèmia cerebral. Els ratolins Stat1^{-/-} presenten una reducció del volum d'infart en el model d'OACM (Takagi et al., 2001).

A diferència de Stat1, Stat3 va ser descrit originàriament per la seva funció com a oncogen, promovent la transformació cel·lular i induïnt tumors en els ratolins *nude* (Bromberg et al., 1999). Aquests primers estudis mostraven a Stat3 com un factor de transcripció anti-apoptòtic i definien alguns dels seus gens diana, com Bcl-2 i Bcl-XL. Stat3 també pot inhibir l'expressió de p53 i de caspasa. Stat3 es troba constitutivament activat en molts tipus de càncers (Turkson, 2004). El paper de l'activació de Stat3 en la isquèmia és controvertit, hi ha estudis que demostren que l'activació de Stat3

contribueix al dany neuronal (Satriotomo et al., 2006), i altres treballs defensen l'acció neuroprotectora de Stat3 (Yamashita et al., 2005). Seguint aquestes directrius, l'activació de Stat1 i Stat3 en la isquèmia podria dirigir a les cèl·lules cap a destins oposats, activant vies de mort o promovent la supervivència. S'han fet estudis que mostren que, tot i que Stat1 i Stat3 s'activen en resposta a diferents citoquines, en absència de Stat3, IL-6 perllonga l'activació de Stat1 i produeix efectes semblants a l'IFN- γ , incloent l'inducció del complex major d'histocompatibilitat de classe II (MHC II) i muntant la resposta antiviral. Mentre que l'IFN- γ indueix la fosforilació de Stat3 en cèl·lules Stat1^{-/-} (Costa-Pereira, 2002). Aquests resultats suggereixen que tot i que Stat3 i Stat1 presenten accions biològiques oposades, en determinades circumstàncies també poden complementar-se.

La via JAK/STAT té un paper important en la resposta a la isquèmia/reperfusió, tot i així, l'estímul responsable de la seva activació després de la isquèmia/reperfusió encara no ha estat identificat. L'estrès oxidatiu derivat de la isquèmia pot activar la via de senyalització JAK/STAT (De-Fraja, 1998, Madamanchi, 2001) i també les citoquines que regulen la resposta inflammatòria i immunitària (Akira et al., 1999) (figura 9).

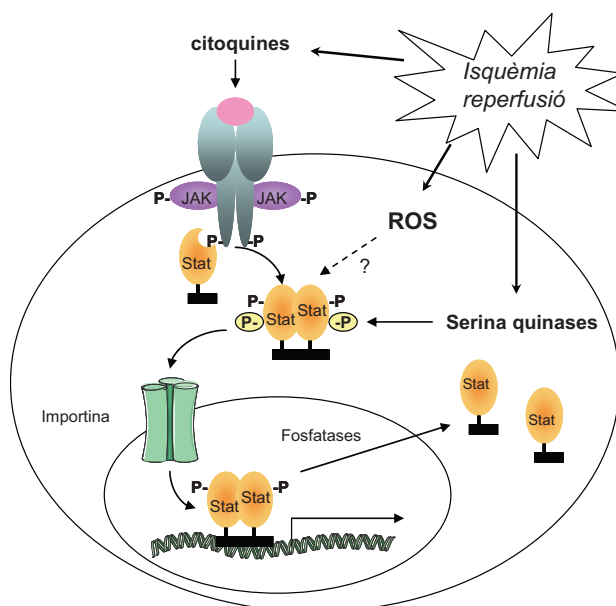


Figura 9. Activació de la via JAK/STAT en la isquèmia/reperfusió.

En els pròxims apartats d'aquesta tesi es descriuen els processos desencadenats en resposta a la isquèmia capaços d'induir l'activació de la ruta JAK/STAT.

2.2. PRODUCCIÓ D'ESTRÈS OXIDATIU EN LA ISQUÈMIA/REPERFUSIÓ. L'ESTRÈS OXIDATIU COM A ACTIVADOR DE LA VIA JAK/STAT.

L'estrès oxidatiu és la pèrdua d'equilibri entre els processos que generen agents pro-oxidants i l'activitat antioxidant d'un sistema a favor del primers. Dues condicions poden conduir a aquesta situació: una reducció d'antioxidants, o un increment d'espècies reactives d'oxigen.

2.2.1. ESPÈCIES REACTIVES D'OXIGEN (ROS)

Les espècies reactives d'oxigen (*Reactive Oxygen Species*, ROS) són substàncies químiques (àtoms o molècules) que contenen un o més àtoms d'oxigen i són capaces de donar o rebre electrons d'altres molècules. Els ROS es poden dividir en dos grups: els radicals lliures i les espècies reactives d'oxigen no-radicals (taula 2).

RADICALS LLIURES		ROS NO-RADICALS	
$O_2^{\cdot\cdot}$	Oxigen molecular	1O_2	Singlet d'oxigen
$O_2^{\cdot-}$	Anió superòxid	HOCl	Àcid hidrocloorur
OH \cdot	Radical hidroxil	H ₂ O ₂	Peròxid d'hidrogen
NO \cdot	Òxid nítric	ONOO $^-$	Anió peroxinitrit

Taula 2. Espècies reactives d'oxigen (ROS).

Els radicals lliures presenten un o més electrons desaparellats, cosa que els fa altament inestables i els hi confereix una forta reactivitat. Dos radicals lliures poden compartir els seus electrons desaparellats per formar un enllaç covalent. D'altra banda, un radical lliure pot cedir el seu electró desaparellat (radical reductor) o pot extreure un electró (radical oxidatiu) d'altres molècules. Segons aquesta definició, l'oxigen molecular és un diradical lliure que extreu electrons dels compostos amb els quals reacciona, i aquesta és la base que l'oxigen sigui un agent oxidant (Halliwell, 1989).

2.2.1.1. QUÍMICA DELS ROS

L'oxigen molecular presenta dos electrons desaparellats i això restringeix la seva reactivitat, però quan l'oxigen molecular capta un electró dona lloc a la formació de l'anió superòxid. L'anió superòxid només té un electró desaparellat, de manera que pot actuar com a agent reductor i també és un oxidant feble. L' $O_2^{\cdot-}$ té una vida mitja molt curta, de 2 a 4 μ segons. A pH fisiològic, l'anió superòxid tendeix a dismutar-se en peròxid d'hidrogen i oxigen, aquesta reacció està catalitzada pels membres de la família superòxid dismutases (SODs) (reacció a, taula 3). L'H₂O₂ és seguidament destoxificat per l'enzim catalasa i/o per la glutatió peroxidasa (Juurink, 1997).

El peròxid d'hidrogen és una molècula relativament estable amb una vida mitja d'1 milisegon. Pot travessar les membranes cel·lulars fàcilment i difondre varis micrometres abans d'interaccionar amb una altra entitat química, de manera que pot induir toxicitat en llocs distants a la seva generació. L'H₂O₂ és un component molt perillós que s'acumula als teixits i dona lloc a altres components molt destructius. Per exemple, mitjançant la reacció de Haber-Weiss (b), l'H₂O₂ pot interaccionar amb l'Ö₂ per produir el radical hidroxil (McCord, 1998). Tot i així, aquesta reacció no es produeix les suficients vegades com per ser una font important de radicals lliures. En presència de metalls de transició, com el ferro i el coure, l'H₂O₂ és convertit en el radical hidroxil, aquesta és l'anomenada reacció de Fenton (c). En la reacció de Fenton, el Fe²⁺ és oxidat a Fe³⁺, l'anió superòxid tornarà a reduir el ferro a Fe²⁺ (d). Existeixen diverses proteïnes que segresten el ferro lliure, com la ferritina. D'aquesta manera no té lloc la formació d'OH[•], ja que el ferro unit a la ferritina no genera radicals lliures (Auruoma i Halliwell, 1987).

Reaccions d'interconversió dels ROS		
(a)	$2 \text{Ö}_2 + 2 \text{H}^+$	$\rightarrow \text{H}_2\text{O}_2$
(b)	$\text{Ö}_2 + \text{H}_2\text{O}_2$	$\rightarrow \text{OH}^\bullet + \text{H}_2\text{O}$
(c)	$\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2$	$\rightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{OH}^- + \text{OH}^\bullet$
(d)	$\text{Fe}^{3+} + \text{Ö}_2$	$\rightarrow \text{Fe}^{2+} + \text{O}_2$
(e)	$\text{H}_2\text{O}_2 + \text{Cl}^-$	$\rightarrow \text{H}_2\text{O} + \text{OCl}^-$
(f)	$\text{H}_2\text{O}_2 + \text{OCl}^-$	$\rightarrow \text{H}_2\text{O} + \text{Cl}^- + {}^1\text{O}_2$
(g)	$\text{Ö}_2 + \text{Ö}_2 + 2\text{H}^+$	$\rightarrow \text{H}_2\text{O}_2 + {}^1\text{O}_2$
(h)	$\text{Ö}_2 + \text{NO}^\bullet$	$\rightarrow \text{ONOO}^-$
(i)	$\text{ONOO}^- + \text{H}^+$	$\leftrightarrow \text{ONOOH}$
(j)	ONOOH	$\rightarrow \text{OH}^- + \text{NO}_2$
(k)	$\text{H}_2\text{O}_2 + \text{ONOO}^-$	$\rightarrow {}^1\text{O}_2 + \text{ONO}^- + \text{H}_2\text{O}$
(l)	$\text{NO}^\bullet + \text{H}_2\text{O}_2$	$\rightarrow {}^1\text{O}_2 + \text{X}$

Taula 3. Reaccions d'interconversió dels ROS (Juurlink, 1997).

El radical hidroxil és considerat l'oxidant més potent dels sistemes biològics degut a la seva extremada reactivitat. L'OH[•] té una vida mitja molt curta de l'ordre de 10⁻⁹ segons, i en conseqüència una capacitat de difusió limitada a 0.3 nm (Beckman, 1994). Això significa que el radical hidroxil només pot atacar macromolècules quan s'ha produït just al costat. Les cèl·lules no presenten mecanismes de destoxicació pel radical OH[•], la defensa contra aquest l'OH[•] és evitar la seva formació.

Alguns tipus cel·lulars, com els neutròfils, poden utilitzar el peròxid d'hidrogen per oxidar l'ió clor a hipoclorit, amb un alt poder oxidant; aquesta reacció és catalitzada per l'enzim mieloperoxidasa (MPO) (e) (Weiss, 1989). El singlet d'oxigen és un agent oxidant molt potent que pot existir únicament durant 3 μsegons en un ambient aquós. Es pot formar a partir de reaccions entre hipoclorit i H₂O₂ (f), també per dismutació espontània de l'anió superòxid en H₂O₂ i singlet d'oxigen (g). Una important funció de la SOD és evitar la formació del singlet d'oxigen.

Les cèl·lules poden formar òxid nítric (NO·) a partir de l'oxidació d'una arginina a NO i citrulina; aquesta reacció és catalitzada per l'enzim òxid nítric sintasa (NOS) (Dawson et al., 1994). El NO és una molècula molt important en la senyalització fisiològica i, tot i que no presenta toxicitat, pot interaccionar amb l'anió superòxid per donar peroxinitrit, un agent oxidant molt poderós (h). A pH fisiològic, el peroxinitrit es protona i forma àcid peroxinitrós (i), que al seu torn es pot dismutar donant lloc al radical hidroxil i al radical diòxid de nitrogen (j). Tots aquests radicals són agents amb alt poder oxidatiu. El peroxinitrit també és capaç d'interaccionar amb l'H₂O₂ i formar el singlet d'oxigen (k) (Dimascio, 1994). El singlet d'oxigen també es pot formar a partir de l'interacció entre NO i H₂O₂ (l) (Noronha-Dutra, 1993).

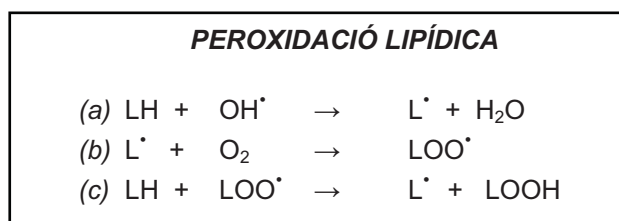
Una característica important dels ROS és la capacitat que tenen de dismutar-se d'un a l'altre, i això fa molt difícil poder identificar exactament quin ROS ha produït un dany oxidatiu determinat (Taula 3).

2.2.2. EFECTE DELS ROS EN LES MACROMOLÈCULES

Proteïnes - Els grups tiol són especialment susceptibles a l'atac pels ROSs amb capacitat oxidativa, incloent l'anió superòxid. Per exemple, el singlet d'oxigen pot oxidar els grups sulfidril i inactivar directament proteïnes com la glutatió reductasa, la glutatió peroxidasa i la Ca²⁺-ATPasa (Kukreja et al., 1992). De la mateixa manera s'ha demostrat que l'hipoclorit pot oxidar grups sulfidril alterant la funció de proteïnes que intervenen en transport de glucosa, transport d'aminoàcids i en l'activitat de la bomba de sodi (Schraufstätter et al., 1990). També es produeixen descarboxilacions i desaminacions produïnt-se el trencament de la cadena peptídica o creuaments anormals entre residus que interfereixen en la funció proteïna (Dean et al., 1993).

Àcids nucleics – L'ADN també resulta danyat per efecte dels ROS. Per exemple, el radical hidroxil pot extreure hidrogens de l'esquelet deoxirribosa-fosfat de l'ADN. Els radicals hidroxil també poden interaccionar amb les bases nitrogenades de l'ADN, això pot produir mutagènesis degut a l'aparellament incorrecte durant la replicació de l'ADN (Breen et al., 1995).

Lípids - Els ROS tenen efectes molt importants sobre els lípids. L'anió superòxid pot desesterificar els fosfolípids de membrana amb la subseqüent alliberació d'àcids grassos (Deby et al., 1990). Els àcids grassos poliinsaturats són immediatament oxidats pels ROS. Els radicals hidroxil poden extreure un àtom d'hidrogen de la cadena hidrocarbonada dels àcids grassos donant lloc a la formació de radicals lipídics (Taula4, a). Normalment, els radicals lipídics es combinen amb l'oxigen per obtenir radicals peròxid (b). El radical peròxid esdevé hidroperòxid a l'extreure un àtom d'hidrogen del grup metilè adjacent en la cadena hidrocarbonada de l'àcid gras, i així es va propagant la formació de radicals lipídics (c). Les peroxidacions lipídiques indueixen canvis en la fluïdesa i la permeabilitat de les membranes i poden afectar a la funcionalitat de les proteïnes integrades a la bicapa lipídica.



Taula 4. Peroxidació lipídica (Juurlink, 1997).

2.2.3. MECANISMES DE DEFENSA ANTIOXIDANTS

Totes les cèl·lules aeròbiques presenten mecanismes de defensa antioxidants que les protegeixen de l'estrès oxidatiu basal. Els mecanismes utilitzats per les cèl·lules per erradicar els ROS poden ser enzimàtics o no enzimàtics.

Mecanismes antioxidants enzimàtics

Els enzims de la família de la superòxid dismutasa (SOD) constitueixen la primera línia de defensa (figura 10). La SOD porta a terme la dismutació d' \dot{O}_2 en H_2O_2 i evita d'aquesta manera la formació del singlet d'oxigen. Existeixen tres SODs diferents amb diferent distribució cel·lular i localització: la SOD coure/zinc (CuZnSOD, SOD1), la SOD manganès (MnSOD, SOD2), i la SOD extracel·lular (ECSOD, SOD3). La CuZnSOD és l'enzim majoritari del citosol i constitueix aproximadament el 0.1% del total de les proteïnes cel·lulars en mamífers. La MnSOD és un enzim mitocondrial, i l'ECSOD és una isoforma que es localitza a l'espai extracel·lular, en el fluid cerebroespinal i en els vasos cerebrals (Fridovich, 1995).

La segona línia de defensa són els enzims encarregats de dismutar l' H_2O_2 en H_2O i oxigen molecular. Existeixen dos enzims diferents que catalitzen aquesta reacció: la catalasa i la glutatió peroxidasa (Chance, 1979). La catalasa es localitza

principalment als peroxisomes, i té una elevada capacitat per l' H_2O_2 , però una relativa baixa afinitat. A diferència de la catalasa, la GSHPx converteix qualsevol peròxid, no només l' H_2O_2 , en aigua i oxigen molecular (o grup hidroxil). L'activitat de la GSHPx necessita glutatió (GSH) que s'oxida en aquest procés. La GSHPx depèn directament de l'activitat de la glutatió redutasa i de l'estat redox cel·lular (el ratio entre $\text{NADPH}/\text{NADP}^+$) per reduir el glutatió oxidat de nou a GSH.

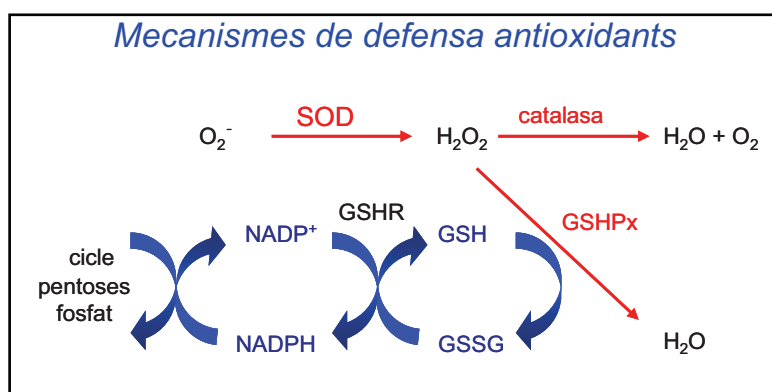


Figura 10. Mecanismes de defensa antioxidants.

Mecanismes antioxidants no enzimàtics

Tant el NADPH , com el GSH poden participar en els mecanismes no enzimàtics de destoxicació de ROS. El NADPH , per sí mateix pot protegir directament del dany per $^1\text{O}_2$ (Bodaness, 1982). El GSH també elimina directament ROS, formant el radical glutatí; aleshores dos radicals glutatí reaccionaran per formar glutatió oxidat (GSSG).

No es coneixen *scavengers* enzimàtics de l' OH^\bullet , però indirectament les accions de la SOD, les peroxidases, i la catalasa prevenen la seva formació. Altres agents antioxidants, com el α -tocoferol (vitamina E) i l'àcid ascòrbic (vitamina C), reaccionen directament amb l' OH^\bullet per formar compostos més estables. El α -tocoferol protegeix de l'oxidació a àcids grassos poliinsaturats i a proteïnes riques en grups tiol de les membranes cel·lulars, mentre que l'ascorbat és un antioxidant soluble i és utilitzat com a cofactor per algunes hidrolases dependents de ferro (Padh, 1991).

2.2.4. MECANISMES DE GENERACIÓ DE ROS EN LA ISQUÈMIA/REPERFUSIÓ

Les espècies reactives d'oxigen estan implicades en la patologia de molts desordres neurològics i disfuncions cerebrals (Kontos, 1985; Chan, 1994). Els ROS participen en el dany generat durant la isquèmia/reperfusió. Hi ha diferents estudis on s'ha observat un increment en la formació de ROS durant la isquèmia, així com durant la reperfusió del teixit que segueix a un episodi isquèmic. El cervell és especialment

sensible a l'estrès oxidatiu, ja que es produeixen una gran quantitat de ROS donat l'elevat contingut en lípids, l'alta taxa de consum d'oxigen i les reaccions d'oxidació de la dopamina. En la generació de ROS en resposta a la isquèmia/reperfusió estan implicats molts mecanismes diferents (figura 11).

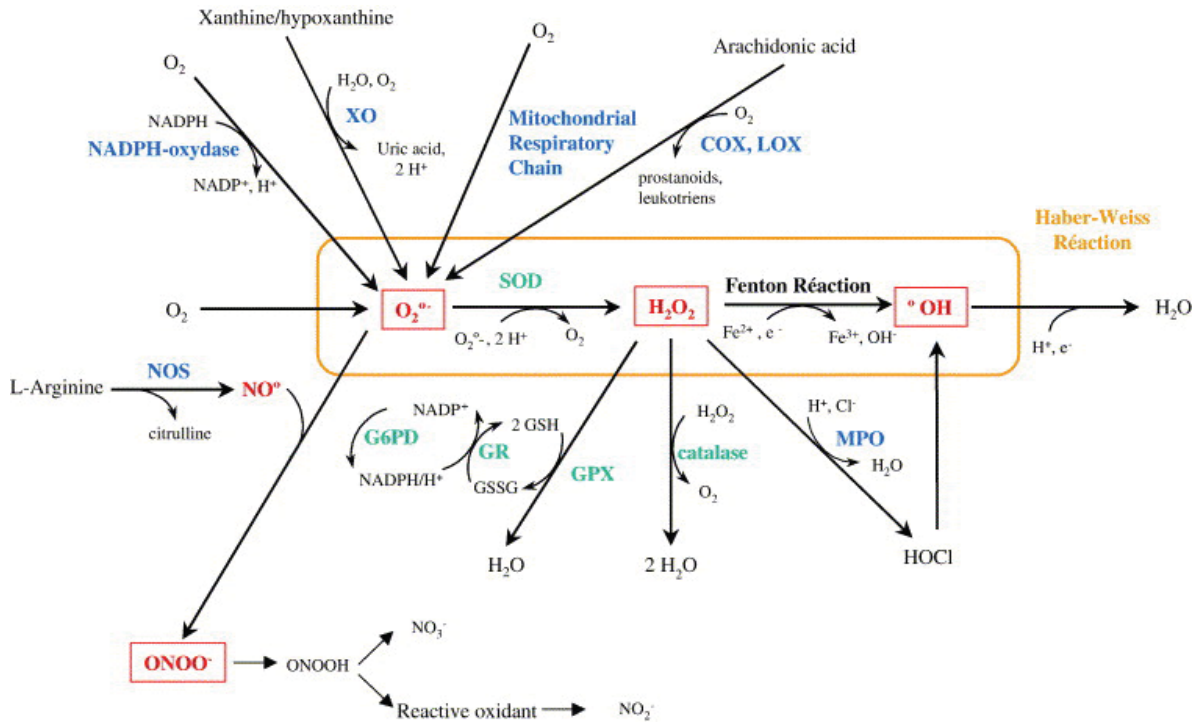


Figura 11. Figura de Margail et al., 2005.

2.2.4.1. PRODUCCIÓ DE ROS A LA CADENA DE TRANSPORT ELECTRÒNIC

En condicions fisiològiques normals, durant la fosforilació oxidativa l'O₂ capta 4 electrons que produeixen la total reducció a H₂O. L'O₂ accepta els electrons d'un en un, la reducció seqüencial de l'O₂ produeix anió superòxid, peròxid d'hidrogen, radical hidroxil i aigua (figura 12). Dins el mitocondri, els ROS intermediaris es troben units als enzims de la cadena respiratòria i són reduïts de manera segura. Tot i així, durant la respiració cel·lular d'un 2% a un 5% del flux d'electrons escapa de la cadena respiratòria mitocondrial. Aquests electrons poden reaccionar amb l'oxigen i generar \dot{O}_2 (Boveris i Chance, 1973). La producció de \dot{O}_2 s'incrementa molt durant un episodi d'hipòxia quan la cadena respiratòria es troba en estat reduït, doncs els electrons no poden ser transferits a l'oxigen i escapen de la cadena respiratòria.

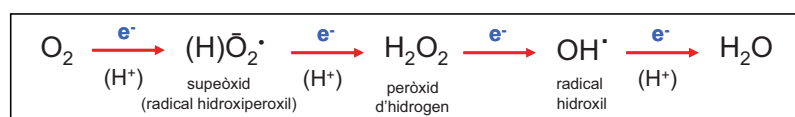


Figura 12. Producció de ROS durant la reducció seqüencial de l'oxigen molecular.

Durant la reperfusió, quan es reestableix l'O₂, les defenses antioxidants endògenes es col·lapsen degut a la sobreproducció de ROS per part dels enzims prooxidants citosòlics i per part del mitocondri, s'inactiven els sistemes de destoxificació i es consumeixen els antioxidants en el teixit cerebral isquèmic.

La isquèmia també s'associa amb la lactacidosis. L'acidificació del citoplasma deguda a la producció d'àcid làctic, produeix l'alliberació de les reserves de Fe²⁺ (Rehncrona et al., 1989), que participen en la generació de ROS.

2.2.4.2. GENERACIÓ DE ROS PER SISTEMES ENZIMÀTICS PROOXIDANTS

Diferents enzims prooxidants contribueixen al dany per estrès oxidatiu en la isquèmia cerebral. Segons el ROS que generen, els enzims prooxidants es poden classificar en tres grups (Taula 5).

Enzim pro-oxidant	gen / proteïna	ROS generat	Activació Ca ²⁺ -depenent	Expressió	Tipus cel·lular
Xantinadeshidrogenasa/ oxidasa	XD/XO	\dot{O}_2	+	c	Endoteli
NADPH oxidasa	NOX	\dot{O}_2	-	c	Leucòcits
Ciclooxigenasa-1	COX-1	\dot{O}_2	-	c	N, A, M, E
Ciclooxigenasa-2	COX-2	\dot{O}_2	-	i	N, A, M, E
5-lipooxigenasa	5-LOX	\dot{O}_2	-	c	N, A, M
Nítric òxid sintasa neuronal	NOS1	NO [·]	+	c	Neurones
Nítric òxid sintasa induïble	NOS2	NO [·]	-	i	L, M, A, E
Nítric òxid sintasa endotelial	NOS3	NO [·]	+	c	Endoteli
Mieloperoxidasa	MPO	HOCl	-	c	M
MAO	MAO	H ₂ O ₂	-	c	N, A, E

Taula 5. Sistemes enzimàtics prooxidants.

+, Ca²⁺-dependent; -, Ca²⁺-independent c, constitutiva; i, induïble; L, leucòcits; M, microglia activada/ macròfags; A, astròcits; E; cèl·lules endotelials

Xantina deshidrogenasa/oxigenasa (XD) - La xantina deshidrogenasa (XD) es concentra principalment a l'endoteli dels vasos sanguinis cerebrals (Terada et al., 1991). Aquest enzim catalitza l'oxidació de xantina a hipoxantina i després a àcid úric. La XDH transfereix electrons al NAD per generar NADH, i no produeix ROS. La XDH es pot convertir en la forma oxidasa (XO) de manera irreversible per proteòlisi limitada (Della Corte i Stirpe, 1968), o de manera reversible per oxidació dels grups tiol (Della Corte i Stirpe, 1972); i aleshores produeix \dot{O}_2 transferint els electrons directament al O₂. Aquesta font de radical \dot{O}_2 s'ha demostrat en models d'isquèmia cerebral focal (Kinuta et al., 1989).

Metabolisme oxidatiu de l'àcid araquidònic - L'àcid araquidònic (AA) porta a terme diferents funcions biològiques, com la modulació de l'alliberació i recaptació de neurotransmissors, l'activació de canals iònics i de proteïnes quinases. L'àcid araquidònic també s'utilitza com a precursor dels quatre principals tipus d'eicosanoids (figura 13). L'àcid araquidònic s'allibera degut a l'acció de la fosfolipsasa A₂ (PLA₂) que trenca els fosfolípids de membrana. L'augment de Ca²⁺ intracel·lular durant la isquèmia activa les fosfolipases, en particular PLA₂, alliberant-se àcid araquidònic.

L'àcid araquidònic és metabolitzat per dues vies diferents: la de la ciclooxigenasa (COX) i la de la 5-lipoxigenasa (5-LOX), donant lloc a la producció de prostaglandines, i leucotriens respectivament. La COX i la 5-LOX són enzims que produeixen \bar{O}_2 com a subproducte. El metabolisme de l'AA és una font important de ROS en determinades condicions patològiques del sistema nerviós (Dugan i Choi, 1994). Alguns dels components derivats del metabolisme de l'AA són mediadors inflamatoris que contribueixen a la inflamació postisquèmica i també presenten efectes sobre el flux sanguini.

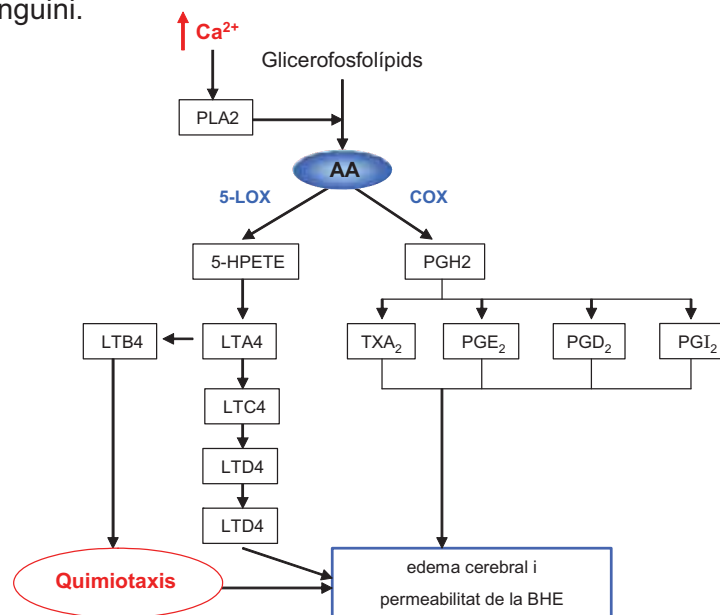


Figura 13. Metabolisme de l'àcid araquidònic (Adaptat de Wang et al., 2006).

La COX metabolitza l'AA a prostaglandina H₂ (PGH₂), un precursor de la prostaglandina. Existeixen dues isoformes de la COX: la COX1 que s'expressa constitutivament en molts tipus cel·lulars, i la COX2 que és una isoforma induïble. Després de la isquèmia cerebral focal, té lloc l'expressió de l'isoforma induïble de la ciclooxigenasa (COX-2) (Planas et al., 1995). L'augment de COX-2 s'observa principalment en la penombra isquèmica (Iadecola et al., 1999). L'activació de COX-2 participa en el desenvolupament del dany isquèmic, però sembla ser que el seu efecte

tòxic ve donat per la producció de prostaglandines, més que per la producció de superòxid (Manabe et al., 2004).

NADPH oxidasa (NOX) - La NOX és un enzim compost per dues subunitats unides a la membrana, gp91 i p22, tres subunitats citosòliques p67, p47 i p40 més Rac, una petita GTPasa. En resposta a determinats estímuls, com l'àcid araquidònic, les subunitats citosòliques es transloquen a la membrana on interaccionen amb les subunitats transmembranals i transfereix un electró del NADPH a l'oxigen, donant lloc a la producció de \dot{O}_2 . El complex NADPH-oxidasa és la major font de radical \dot{O}_2 de les cèl·lules inflamatòries infiltrades en el parènquima cerebral, encara que, també la microglia activada i l'endoteli poden produir radical superòxid a partir de la NOX. L'activació de NOX després de la isquèmia cerebral també pot contribuir al trencament de la BHE (Kahleset al., 2007).

Òxid nítric sintases (NOS) - L'òxid nítric (NO) és una molècula difusible, de vida mitja curta, que actua com a missatger fisiològic en diferents teixits i participa en processos de comunicació neuronal i en defensa de l'hoste. Es va identificar per la seva capacitat d'actuar com a relaxador de l'endoteli vascular (Faraci i Brian, 1994). El NO és generat a partir de la conversió de L-arginina a L-citrulina per l'enzim òxid nítric sintasa (NOS) (figura 14). El NO participa en la transducció de senyals activant la guanilil ciclasa que resulta en la producció de cGMP.

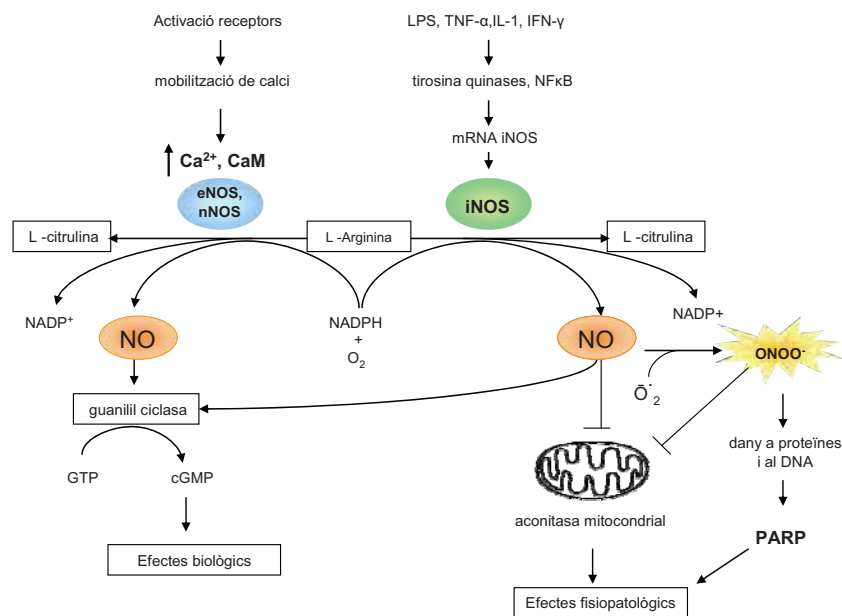


Figura 14. Producció de NO en la isquèmia/reperfusió.

En el cervell s'han caracteritzat tres isoformes de la NOS, produïdes a partir de tres gens diferents. Trobem dues isoformes constitutives (cNOS) que són dependents de calci; la primera es localitza en neurones, NOS tipus I (nNOS), i l'altre en cèl·lules endotelials, NOS tipus III (eNOS). Tant una com l'altre requereixen tetrahidrobiopterina, FAD, FMN, NADPH, O₂, Ca²⁺, i calmodulina (Facchinetti et al., 1998). L'isoforma independent de calci, la NOS tipus II (iNOS), no s'expressa en condicions basals, però s'indueix de manera transcripcional en la glia, macròfags i neurones en resposta a citoquines (Sparrow, 1995).

Després de la isquèmia cerebral, quan la concentració de calci intracel·lular és elevada, tant la nNOS com l'eNOS, s'activen i produeixen grans quantitats de NO. S'ha descrit un increment en l'activitat de nNOS 10 min després de la isquèmia focal que retorna a la normalitat als 60 min (Kader et al., 1993). L'activitat i l'expressió de l'eNOS també s'incrementen després de la isquèmia. L'eNOS és important en el manteniment de la reperfusió del teixit (Huang et al., 1996), aportant un efecte beneficiós.

El NO és també sintetitzat per la iNOS que s'expressa en resposta a factors inflamatoris, com les citoquines i el LPS. Algunes citoquines que participen en la inflamació després de la isquèmia indueixen l'expressió de la iNOS en les diferents cèl·lules del SNC. Després de la isquèmia, té lloc un increment en l'ARNm, la proteïna i l'activitat enzimàtica de la iNOS en cèl·lules neurals (Iadecola et al., 1995).

El NO pot reaccionar amb l'anió superòxid i produir peroxinitrit. L'anió peroxinitrit (ONOO⁻) és un mediador important del dany oxidatiu en la isquèmia. Aquest anió causa dany cel·lular per diferents mecanismes que inclouen: peroxidació lipídica, nitrosilació de tirosines, oxidació i nitrosilació de grups sulfidril i trencament de l'ADN (Beckman 1994). El peroxinitrit és un inhibidor potent de l'activitat aconitasa mitocondrial. El NO causa l'inhibició reversible dels enzims de la cadena de transport electrònic mentre el peroxinitrit inhibeix permanentment la funció mitocondrial.

Poli-ADP Ribosa Polimerasa (PARP) - La fragmentació de l'ADN estimula l'activitat poli-ADP ribosa polimerasa (PARP). Aquest enzim afegeix 100 unitats d'ADP-ribose a proteïnes nuclears com les histones, o a la mateixa PARP. Per cada molècula d'ADP-ribose transferida, una molècula de NAD⁺ es consumeix, i la seva regeneració gasta quatre molècules d'ATP. Donat que la PARP és un enzim abundant i que el NO actua sobre la cadena de transport electrònic mitocondrial, la seva activació dóna lloc a la disminució en els nivells de NAD⁺ i ATP, produint la depleció dels nivells energètics cel·lulars i en últim terme la mort cel·lular (Virág et al., 2003).

2.2.4.3. ROS GENERATS PER CÈL·LULES INFILTRADES

El leucotriè B₄, els ROS, el factor activador de plaquetes, que també es produït per l'acció de la PLA₂ sobre els fosfolípids de membrana, participen en l'activació i infiltració de neutròfils cap el parènquima cerebral (Grace, 1994), d'aquesta manera l'estrès oxidatiu potencia la reacció inflamatòria en resposta a la isquèmia. Els leucòcits activats generen una gran quantitat de ROS (Weiss, 1989), on s'inclou: l'Ö₂ produït pel complex NADPH-oxidasa, l'anió hipoclorit format per la mieloperoxidasa, i a més a més, els neutròfils també poden produir NO que pot interaccionar amb l'H₂O₂ i generar peroxinitrit (Ródenas et al., 1995). Aquests leucòcits activats alliberen una gran quantitat d'enzims proteolítics, incloent serina proteases, elastasa i metal·loproteïnases (MMPs) (Weiss, 1989). Les MMPs, colagenasa i gelatinasa, es secreten en forma inactiva i s'activen en resposta a ROS alliberats pels neutròfils. Els ROS, juntament amb les proteases alliberades pels neutròfils i les cèl·lules endotelials, alteren la permeabilitat vascular i contribueixen a la generació de l'edema.

2.2.5. VIES DE SENYALITZACIÓ ACTIVADES PER ROS

Fins fa relativament poc temps, es pensava que els ROS eren subproductes indesitjables, i alhora inevitables derivats de la respiració aeròbica i com abans fossin eliminats, millor per la cèl·lula. En canvi, actualment es coneix que petites concentracions de ROS poden actuar modulant l'activació de vies de senyalització. Les vies de senyalització activades per ROS s'anomenen *Vies de Senyalització Redox* (Sugawara i Chan, 2003). Aquestes vies contribueixen al funcionament cel·lular en condicions normals, i participen en la progressió del dany en condicions patològiques.

Els ROS poden activar les vies redox per dos mecanismes. El primer mecanisme és mitjançant canvis en l'estat redox de la cèl·lula i el segon mecanisme és regulant rutes de senyalització mitjançant oxidació directa de proteïnes. Per exemple, l'H₂O₂ pot inhibir l'activitat de tirosina fosfatases a partir de l'oxidació d'un residu de cisteïna essencial. L'H₂O₂ utilitza aquest mecanisme per regular respostes fisiològiques, com la proliferació, la diferenciació i la migració cel·lular (Goo Rhee, 2006).

Existeixen diferents sistemes encarregats de mantenir l'ambient reductor intracel·lular i revertir l'activació de les vies redox. Els més importants són: el glutatió (GSSG/GSH), el (NADP⁺/NADPH) i la tioredoxina (TrxSS/Trx (SH₂)) (Filomeni et al., 2005). L'estat redox dels grups tiol de les proteïnes representa un "interruptor molecular" capaç d'activar/desactivar reversiblement la proteïna. De manera que la regulació de les vies redox és, en part, anàloga a la regulació fosforilativa

(quinasa/fosfatasa) en la qual l'addició/extracció d'un grup fosfat induïx canvis reversibles en l'activitat de la proteïna.

2.2.5.1. VIES REDOX ACTIVADES EN LA ISQUÈMIA

Així, doncs, els ROS contribueixen a la lesió isquèmica causant dany molecular i activant diferents vies de senyalització redox. Les vies redox desencadenen senyals de supervivència i de mort cel·lular, l'equilibri entre aquests senyals determinarà el destí de la cèl·lula després de la lesió. Diversos estudis han demostrat que les principals dianes de les vies redox activades en resposta a la isquèmia, són el mitocondri, enzims de reparació de l'ADN i l'activació de vies de fosforilació i factors de transcripció que induïxen mort cel·lular isquèmica (Chan, 2001) (Figura 15).

Mitocondri

En la isquèmia cerebral, la funció mitocondrial és rellevant pel manteniment bioenergètic cel·lular, recaptació de calci i regulació de les vies necròtiques i apoptòtiques (Fiskum et al., 1999). La senyalització redox contribueix a produir l'alliberació del citocrom c de la membrana mitocondrial en el cervell isquèmic. El citocrom c és una proteïna soluble que es localitza a la perifèria de la membrana mitocondrial i és un component essencial de la cadena respiratòria (Boyer et al., 1977). S'ha demostrat que el citocrom c es transloca des del mitocondri cap al citosol en resposta a la isquèmia cerebral focal en rates (Fujimura et al., 1998). El mitocondri està relacionat tant en la necrosis com en l'apoptosi. En el nucli isquèmic, es produeix una disfunció mitocondrial completa, de manera que no es genera ATP, la qual cosa produeix mort necròtica. Però en la zona de penombra, s'activen vies de senyalització que conduiran al mitocondri a desencadenar l'apoptosi. Aquest procés s'inicia amb l'alliberament del citocrom c cap al citosol on activa caspases mitjançant l'interacció amb factors com Apaf-1 o caspasa 9 (Zou et al., 1997), i posteriorment activarà caspasa-3 (Chen et al., 1998) i la PARP (Endres et al., 1997).

Enzim de reparació de l'ADN

L'enzim endonucleasa APE/Ref-1 és una proteïna constitucional que s'expressa principalment al nucli, i té funció dual. Per una banda, presenta activitat endonucleasa apurínica/apirimidínica (APE) i repara l'ADN afegint bases en llocs on hi ha hagut escissió de nucleòtids. D'altra banda, és un factor nuclear sensible a l'estat redox cel·lular (Ref1, *Redox factor 1*) que regula l'activació de diferents factors de transcripció, com p53 (Gaiddon et al., 1999), AP-1 (Xanthoudakis i Curran, 1992) i NFκB (Mitomo et al., 1994). En resposta a la isquèmia, es produeix una ràpida

disminució d'aquest enzim, de manera que es produeixen danys irreparables a l'ADN que conduiran al desencadenament de l'apoptosi. La baixada de l'expressió d'APE/Ref1 està modulada per l'estrès oxidatiu, doncs, s'ha demostrat que els tractaments amb antioxidants impedeixen la reducció de l'expressió d'APE/Ref1 (Fujimura et al., 1999).

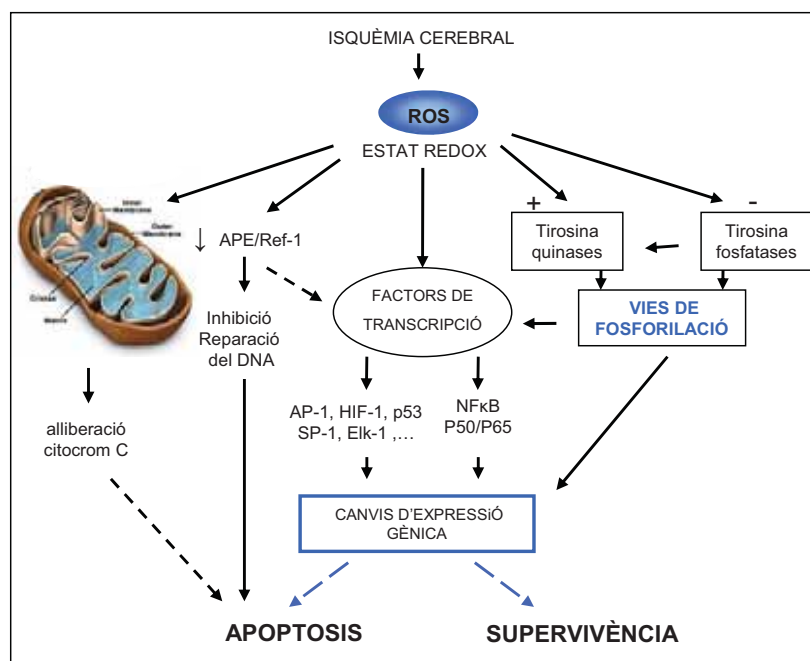


Figura 15. Vies redox activades en la isquèmia/reperfusió.

Vies de fosforilació i factors de transcripció

En resposta a la isquèmia, els ROS activen un gran nombre de vies de senyalització intracel·lulars. Els ROS modulen l'activació de rutes de fosforilació mitjançant el seu efecte sobre proteïnes quinases i fosfatases. Així, els ROS intracel·lulars poden modificar l'activitat de tirosina quinases, com la Src, Ras, JAK2, Pyk2, PI3K i EGFR, i proteïnes de la família MAPK, p38MAPK, JNK i ERK5. Els ROS poden inhibir l'activitat fosfatasa, i contribuir d'aquesta manera a l'activació de les tirosina quinases. Els ROS oxiden els residus de cisteïna presents en el domini actiu de les proteïnes fosfatases (Salmeen i Barford, 2005). Els ROS també poden influenciar l'expressió de proteïnes activant factors de transcripció, com el NFκB, l'*activator protein-1* (AP-1) i l'*hypoxia-inducible factor-1* (HIF-1).

La major part d'aquestes vies estan relacionades amb l'activació de senyals de mort, com les vies que activen Stat1, p38, JNK i p53; en canvi, altres rutes activades pels ROS, com la via de l'Akt i la via de Erk1/2, contribueixen a la supervivència cel·lular (figura 16) (Martindale i Holbrook, 2002).

Les vies de fosforilació són senyals que regulen múltiples funcions cel·lulars i participen en processos de proliferació, diferenciació i mort. Presenten una regulació molt acurada i poden activar-se en resposta a diferents estímuls. Moltes d'aquestes vies de fosforilació i factors de transcripció s'activen per l'acció de citoquines i participen en la resposta inflammatòria associada al dany isquèmic. De manera que la seva activació en la isquèmia/reperfusió és el resultat de l'integració dels diferents processos. En la isquemia, l'estrès oxidatiu i la resposta inflammatòria són els processos principals responsables de l'activació d'aquestes vies de senyalització basades en cascades de fosforilació, com la via JAK/STAT.

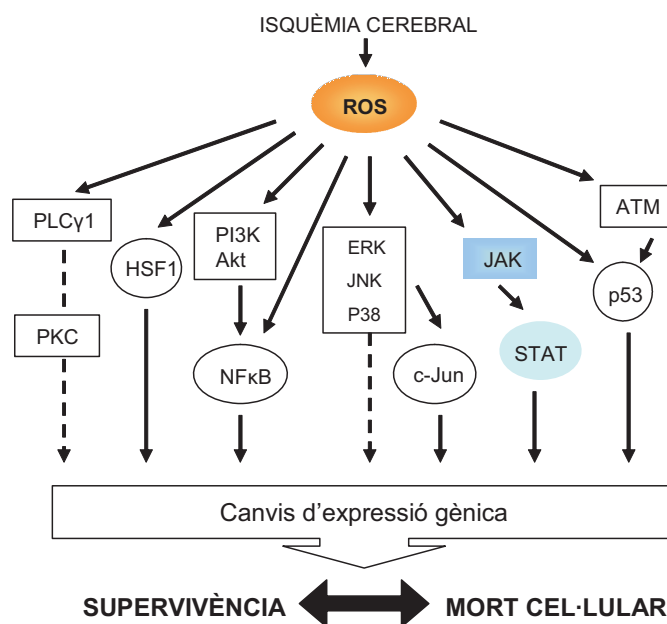


Figura 16. Rutes de fosforilació activades pels ROS en resposta a la isquèmia/reperfusió (Adaptat de Crack i Taylor, 2005).

2.2.6. ACTIVACIÓ DE LA VIA JAK/STAT PER L'ESTRÈS OXIDATIU.

Diferents estudis demostren que Stat1 i Stat3 s'activen en resposta a l'estrès oxidatiu (Simon et al., 1998, Carballo et al., 1999, Maziere et al., 1999 i Madamanchi et al., 2001). En el treball de Simon, portat a terme en fibroblastes i cèl·lules de carcinoma, s'observa l'activació de Stat1 i Stat3 cinc minuts després del tractament amb H₂O₂ 1mM, i aquesta activació és inhibida per l'acció d'antioxidants. L'activació de les STATs en aquest model està induïda pels peròxids, però no per l'anió superòxid o el NO, i s'associa amb un increment de l'activitat quinasa de Jak2 i Tyk2. Carballo et al. (1999) van demostrar que l'activitat de Stat3 està modulada per H₂O₂ en limfòcits humans, i proposen que aquesta activació ve donada per l'inhibició de les tirosina fosfatases intracel·lulars, que permetrien la fosforilació i entrada al nucli de Stat3.

El treball de Madamanchi et al., dóna suport a les observacions anteriors i descriu que Jak2 s'activa ràpidament en cèl·lules musculars tractades amb H₂O₂, i Stat1 i Stat3 es fosforilen i transloquen al nucli de manera depenent de Jak2. També s'ha observat que l'exposició a H₂O₂ indueix la fosforilació de Jak2 (Tawfik et al., 2005).

L'evidència que la via de senyalització JAK/STAT està modulada per els ROS queda palesa, però el mecanisme molecular responsable no està clar.

2.3. RESPOSTA INFLAMATÒRIA A LA ISQUÈMIA. ACTIVACIÓ DE JAK/STAT.

2.3.1. INFLAMACIÓ EN EL SNC

La resposta inflamatòria és un procés molt complex on intervenen components del plasma i productes cel·lulars que dirigeixen la resposta de les cèl·lules inflamatòries. La inflamació és un procés fisiològic dirigit a la reparació i aïllament del dany, tot i així, quan aquest procés no està controlat, la inflamació perd la seva funció reparadora i pot ser causa de dany (Nathan, 2002). Sovint en el SNC, la inflamació produeix danys enlloc de contribuir a la reparació tissular.

En el sistema nerviós central madur, la major part de les neurones són postmitòtiques i per tant no poden ser regenerades, per això l'ambient en el SNC està cuidadosament regulat per evitar el dany neuronal. Tot i l'absència de cèl·lules immunes i de components del plasma degut a l'elevada especialització del teixit, el SNC porta a terme respostes immunitàries innates davant d'infeccions sistèmiques i localitzades (Nguyen et al., 2002), o en resposta al dany tissular (Owens et al., 2005). Les cèl·lules residents al SNC participen activament en la inflamació i són capaces d'iniciar i portar a terme una ràpida i efectiva resposta fins que el sistema immune adaptatiu perifèric sigui reclutat. En el SNC, neurones, astròcits, microglia i cèl·lules endotelials s'activaran i contribuiran al desenvolupament de la resposta inflamatòria juntament amb les cèl·lules immunes "professionals".

2.3.2. EL PROCÉS INFLAMATORI EN LA ISQUÈMIA

La isquèmia/reperfusió desencadena un procés inflamatori a nivell del parènquima cerebral i de l'endoteli vascular que envolta l'infart. En el teixit isquèmic, la inflamació s'inicia per la presència de cèl·lules necròtiques, a la generació de ROS i a la producció de citokines. Aquests senyals iniciadors donen lloc a l'activació de la microglia i astroglija que alhora secretaran més citokines. Aquestes citokines produiran canvis en l'endoteli vascular: s'indueix l'expressió de molècules d'adhesió a

la membrana cel·lular, s'activen leucòcits i plaquetes que inicien la trombosis, i augmenta la permeabilitat de l'endoteli per permetre l'infiltració dels leucòcits. Tots aquests canvis estan regulats per l'acció de citokines i quimioquines que actuen de mediadors inflamatoris. Un cop al parènquima cerebral, els leucòcits i la glia activada alliberen agents citotòxics incloent més citokines proinflamàtores, metal·loproteïnases de la matriu extracel·lular (MMPs), òxid nítric i més ROS. Aquests productes indueixen més dany cel·lular, i desencadenen el trencament de la BHE i la matriu extracel·lular (figura 17) (Rosenberg, 1999; Siesjo i Siesjo, 1996).

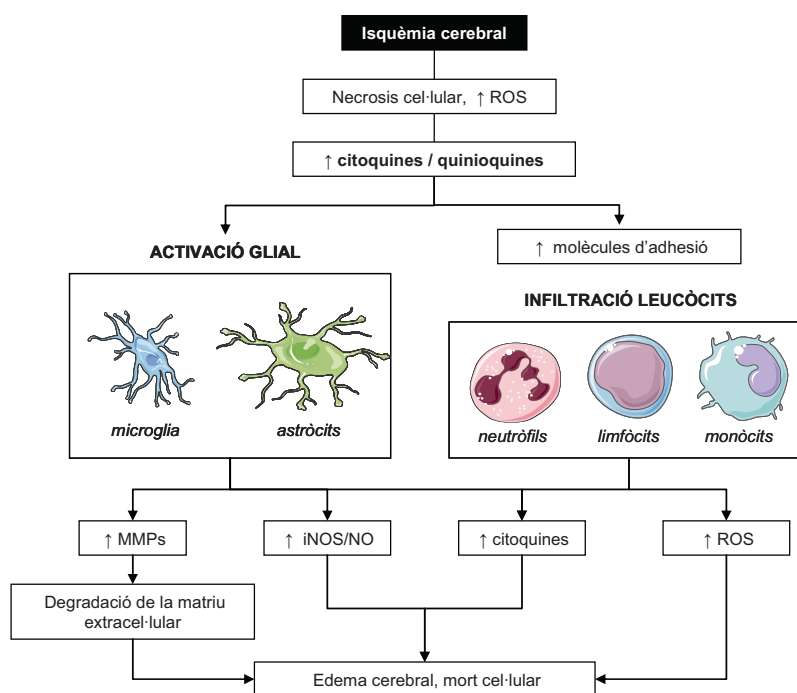


Figura 17. Procés inflamatori en resposta a la isquèmia (Adaptat de Wang et al., 2007).

2.3.2.1. ACTIVACIÓ MICROGLIAL

Les cèl·lules microgials, són cèl·lules d'origen mieloide residents en el SNC, que actuen de guardians de la funció neuronal i són capaces de respondre davant d'alteracions homeostàtiques participant en mecanismes d'immunitat innata i adaptativa. La microglia quiescent presenta una morfologia ramificada, en resposta a determinats estímuls, com el dany generat durant la isquèmia cerebral, la microglia prolifera i experimenta canvis morfològics i funcionals. La microglia activada adquireix fenotip de macròfag, amb forma ameboide i capacitat fagocítica i migratòria. La microglia activada actuarà fagocitant cèl·lules en degeneració i restes de teixit mort. La microglia reactiva sintetitza i secreta mediadors inflamatoris com citokines, quimioquines i proteïnes del sistema del complement. En estat reactiu, la microglia és

immunocompetent i té capacitat per actuar com a cèl·lula presentadora d'antígens (*antigen presenting cells*, APC).

En la isquèmia cerebral, l'activació microglial presenta funcions beneficioses, com la resolució de la lesió per fagocitosis o la producció de factors tròfics. També té acció neurotòxica, doncs, desencadena el procés inflamatori, secreta NO, allibera proteases com les metal·loproteïnases (MMPs) (Cunningham et al., 2005) o el *tissue plasminogen activator* (tPA) (Sheehan i Tsirka, 2005) que degraden la matriu extracel·lular permetent l'accés de les cèl·lules inflamatòries.

2.3.2.2. MIGRACIÓ LEUCOCITARIA

L'endoteli és una estructura essencial de la BHE i té un paper important en la inflamació en el SNC. En condicions fisiològiques, l'endoteli presenta unions estretes que controlen l'entrada de cèl·lules des de la sang cap al parènquima cerebral.

La migració dels leucòcits cap a la regió isquèmica s'inicia amb el procés d'adhesió dels leucòcits a l'endoteli. Aquest procés consta de diferents passos, comença amb el rodament dels leucòcits per la superfície de les cèl·lules endotelials (*rolling*), fins que els leucòcits s'aturen degut a les múltiples interaccions que els uneixen amb l'endoteli. Aleshores els leucòcits s'activen i les interaccions amb l'endoteli es reforcen. A continuació, els leucòcits creuen l'endoteli fins aconseguir la completa migració cap al parènquima cerebral. Les molècules d'adhesió cel·lular són responsables de l'infiltració leucocitària (Stoll et al., 1998).

2.3.3. MEDIADORS INFLAMATORIS EN LA ISQUÈMIA

2.3.3.1. MOLÈCULES D'ADHESIÓ CEL·LULAR

Existeixen 3 classes de molècules d'adhesió que regulen les interaccions entre els leucòcits i l'endoteli: les selectines, les integrines i les de la superfamília d'immunoglobulines.

Les selectines s'uneixen a carbohidrats i inicien l'interacció entre leucòcits i cèl·lules endotelials. L'E-selectina (CD62E) es sintetitza després de l'estimulació amb TNF- α i IL-1 i s'expressa en cèl·lules endotelials poques hores després de la isquèmia. La P-selectina (CD62P) s'expressa constitutivament en membranes de cèl·lules endotelials i plaquetes. L'activació de l'endoteli fa que la P-selectina s'expressi immediatament a la membrana externa. L'E- i la P-selectina interaccionen amb lligands de neutròfils i monòcits. L-selectina (CD62L) està present en limfòcits, neutròfils i monòcits i pot interaccionar amb l'E- i la P-selectines.

El reforçament de les unions entre leucòcits i l'endoteli s'aconsegueix gràcies als receptors de la superfamília de les immunoglobulines i a les integrines. La família de les immunoglobulines està composta per cinc molècules que s'expressen a la superfície de les cèl·lules endotelials: les *InterCellular Adhesion Molecule-1* i -2 (ICAM-1 i ICAM-2), la *Vascular Cell Adhesion Molecule-1* (VCAM-1), la *Platelet-Endothelial Cell Adhesion Molecule-1* (PECAM-1) i la *Mucosal Addressin* (MAdCAM-1). Els leucòcits i les cèl·lules endotelials cerebrals expressen ICAM-1 de manera constitutiva, i després de l'estimulació amb TNF- α , IFN- γ , o IL-1 β s'incrementa la seva expressió (Frijns i Kappelle, 2002). L'ICAM-2 és un receptor de l'endoteli que no augmenta la seva expressió. VCAM-1 s'expressa en cèl·lules endotelials en resposta a IL-1 i TNF- α . PECAM-1 s'expressa a l'endoteli i participa en la unió entre cèl·lules endotelials, en l'adhesió leucocitària i en la transmigració.

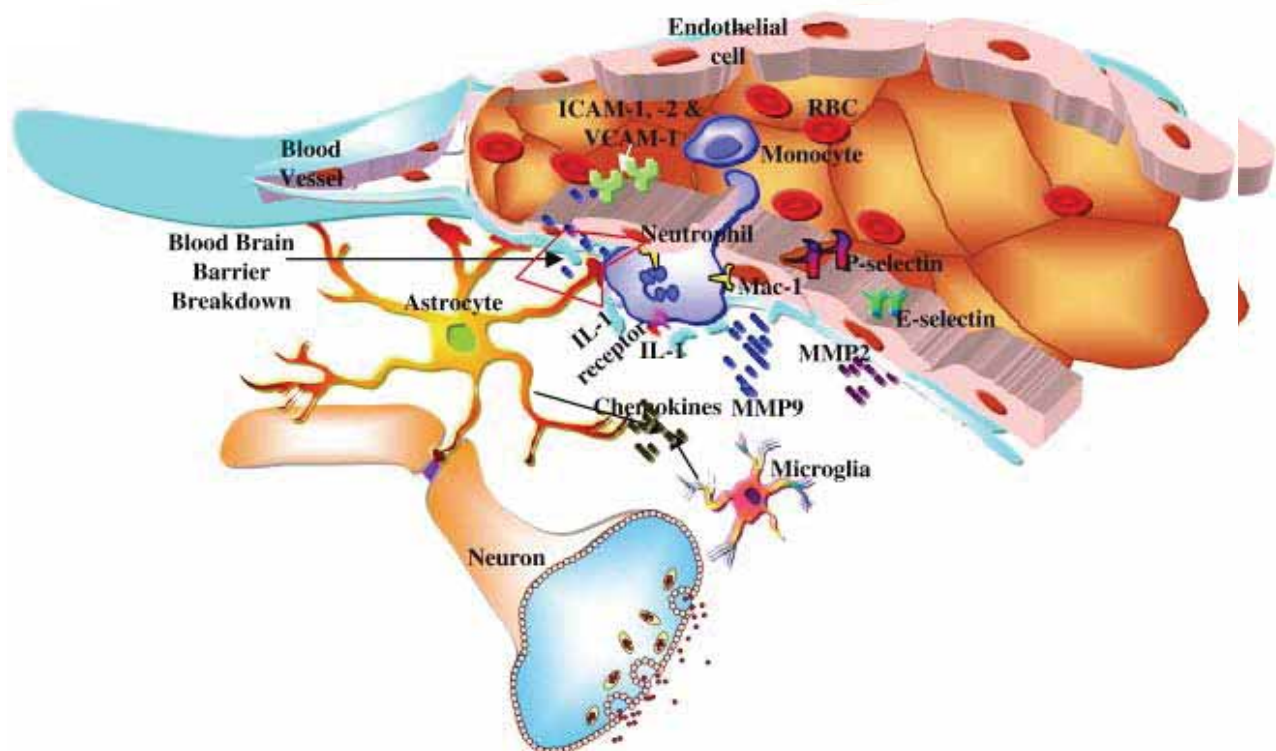


Figura 18. La inflamació en la isquèmia cerebral (Mehta et al., 2007).

Després del *rolling*, els leucòcits units a l'endoteli s'activen per l'acció de quimioquines i citoquines i indueixen l'expressió d'integrines. Les integrines $\beta 2$ s'expressen en leucòcits i interaccionen amb receptors de la família de les immunoglobulines. Existeixen 3 tipus d'integrines $\beta 2$ amb cadena β comú i 3 cadenes α diferents [CD11a (LFA-1), CD11b (mac-1) i CD11c]. La seva expressió en superfície s'incrementa per TNF- α i després de l'adhesió a l'E-selectina. Els leucòcits i monocits també expressen l'integrina $\alpha 4\beta 1$ o *very late antigen-4* (VLA-4), que s'uneix a VCAM-1. Les interaccions entre VLA-4/VCAM-1 i LFA-1/ICAM-1 són essencials per l'infiltració

de les cèl·lules T i per la producció de citokines per part de l'endoteli vascular. L'interacció entre CD40/CD40L també participa en l'adhesió i transvasació cel·lular. CD40 està present en l'endoteli cerebral, s'indueix en resposta a l'estimulació amb TNF- α , LPS o CD40L (Omari et al., 2003).

2.3.3.2. CITOQUINES

Les citokines són glicoproteïnes de baix pes molecular que actuen com missatgers intercel·lulars i són secretades per molts tipus cel·lulars. Per què les cèl·lules produeixin citokines cal que s'activin. Les citokines actuen a molt baixes concentracions sobre receptors cel·lulars específics, l'expressió dels quals sol estar regulada per les pròpies citokines. La unió de la citokina al seu receptor activa vies de senyalització on intervien proteïnes quinases i fosfatases. Aquestes vies de senyalització regulen l'expressió gènica activant factors de transcripció. Les citokines es consideren els mediadors principals de la resposta inflamatòria.

En el SNC, les citokines participen en la comunicació neurona-glia en processos de neuroinflamació, neurodegeneració o neuroprotecció. Després de la isquèmia, augmenta la secreció de citokines per part de les cèl·lules del sistema immunitari, la microglia, l'astroglia i les neurones (Sairanen et al., 2001). Els astròcits i la microglia són importants productors de citokines, incloent-hi citokines pro-inflamatòries (IL-1 β , IL-6, IL-12 i TNF), anti-inflamatòries (IL-10 i TGF- β), anti-virals (IFN de tipus I), factors de creixement (NGF, FGF, IGF-1 i GDNF) i quimioquines (IP-10, MCP-1, SDF-1 i RANTES).

Les citokines relacionades amb la inflamació en resposta a la isquèmia principalment són: interleuquina-1 β , (IL-1 β), TNF- α , interleuquina-6 (IL-6), interleuquina-10 (IL-10), TGF- α i IFN- γ (Han i Yenari, 2003). S'ha descrit que IL-1 β , IL-6 i IFN- γ incrementen el dany isquèmic, en canvi IL-6, IL-10 i TGF- β són neuroprotectores (Allan i Rothwell, 2001).

Algunes de les citokines més importants en el pròces inflamatori en resposta a la isquèmia exerceixen la seva acció mitjançant l'activació de la via JAK/STAT. L'IL-6, l'IFN- γ i l'IL-10 activen la ruta JAK/STAT.

IL-1: L'expressió d'IL-1 augmenta en resposta a la isquèmia/reperfusió en microglia, astròcits i neurones (Buttini et al., 1994). En aquestes cèl·lules, s'han trobat dues formes d'IL-1 (IL-1 α i IL-1 β) que actuen principalment sobre dos tipus de receptors (tipus I i tipus II). El receptor d'IL-1 de tipus I es troba en una gran varietat de tipus cel·lulars i interacciona amb IL-1 α i IL-1 β , en canvi, el receptor de tipus II es localitza a la superfície de neutròfils, limfòcits B i macròfags i té elevada afinitat per IL-

1 β . Els receptors de tipus I i de tipus II es regulen de diferent manera en la isquèmia cerebral. L'interacció entre IL-1 i el seu receptor indueix l'expressió de gens de resposta immediata, com c-jun i c-fos. Els nivells augmentats d'IL-1 després de la isquèmia correlacionen amb un increment de la severitat de l'infart. En models d'OACM en rata, l'injecció d'IL-1 β recombinant incrementa la formació de l'edema cerebral, el nombre de neutròfils en les àrees isquèmiques i l'adhesió entre els neutròfils i l'endoteli (Yamasaki et al., 1995). Els efectes perjudicials d'IL-1 inclouen l'alliberació d'àcid araquidònic, la potenciació de l'excitotoxicitat, l'activació microglial i l'augment de síntesi de NO (Rothwell i Relton, 1993). De manera que l'increment de l'expressió d'IL-1, en particular d'IL-1 β , indueix un augment de molècules d'adhesió, major infiltració de neutròfils i promou necrosi tissular.

TNF- α : S'ha observat un increment de TNF- α en el teixit cerebral, en el fluid cerebroespinal i en el plasma de pacients que han patit isquèmia cerebral. Diferents tipus cel·lulars del SNC poden produir TNF- α en resposta a diferents estímuls o lesions. Les cèl·lules endodials del plexe coroideu, els astròcits i la microglia activada/macròfags produeixen TNF- α després de la isquèmia, i les neurones, en resposta a LPS, la isquèmia i el dany cerebral. Els efectes del TNF- α tenen lloc mitjançant dos tipus de receptors específics anomenats TNFR1 (p55) i TNFR2 (p75). El receptor TNFR1 presenta un domini de mort, que indueix la transducció del senyal a través de FADD (*Fas associated death domain*) i activa proteases que participen en l'activació de l'apoptosi. La unió del TNF- α a TNFR1 produeix l'alliberació de ceramida i dóna lloc a l'activació de les quinases MAPK. TNF- α indueix l'activació del factor de transcripció NF κ B a través de TNFR1 i TNFR2. L'activació de NF κ B promou la transcripció de gens protectors, com l'enzim antioxidant MnSOD, calbindines i citocines antiinflamatòries, alhora que també indueix l'expressió de molècules perjudicials com la fosfolipasa A2, la COX-2, l'ICAM-1 i citocines proinflamatòries (Shohami et al, 1999). L'equilibri i la regulació diferencial de l'expressió d'aquests receptors afectarà el destí de cada cèl·lula.

Dades experimentals i dades clíniques, indiquen una correlació positiva entre el TNF- α i el tamany de l'infart. Igual que IL-1, TNF- α indueix l'expressió de molècules d'adhesió a les cèl·lules glials i a l'endoteli, afavorint l'adhesió de neutròfils i l'acumulació en els microvasos (Liu et al., 1994). TNF- α està relacionat amb alteracions de la BHE, en facilitar la transformació de l'endoteli a un estat adhesiu i trombogènic, i en l'activació de les cèl·lules glials. L'injecció intraventricular de TNF- α , com la d'IL-1 β , produeix un major volum d'infart i edema cerebral després d'OACM, mentre que l'injecció d'anticossos neutralitzants redueix el dany cerebral (Barone et al.,

1997). Tot i aixà, també s'han descrit efectes neuroprotectors del TNF- α en estudis *in vitro* i en ratolins KO. Aixà, el TNF- α presenta un efecte dual que dependrà del patró de mediadors i del moment exacte després de la lesió.

IL-6: IL-6 juga un paper central en la defensa de l'hoste i en la reacció inflamatòria, i s'expressa en resposta a diferents tipus de dany cerebral. En plasma de pacients que han patit isquèmia cerebral, s'observa nivells més elevats d'IL-6 que en els individus control (Fassbender et al., 1994). L'augment d'IL-6 en plasma i en fluid cerebroespinal indica un major volum d'infart i mal pronòstic (Vila et al., 2000). De totes maneres encara no s'ha aclarit si IL-6 té efectes beneficiosos o perjudicials. Els seus efectes antiinflamatoris es deuen al fet de que inhibeix la producció d'IL-1 i TNF- α per un mecanisme de retroalimentació negativa i alhora estimula la producció d'antagonistes d'aquestes citoquines: l'antagonista del receptor d'IL-1 i el receptor soluble de TNF- α (Hirano et al., 1992; Tilg et al., 1994). Part de la seva acció antiinflamatòria també ve donada pel fet que indueix l'expressió de proteïnes de fase aguda que desenvolupen funcions antiproteinases i antioxidants (Akira et al., 1993). D'altra banda, IL-6 indueix l'expressió de fosfolipasa A2 i en conseqüència s'estimula la producció de leucotriens, prostaglandines i el factor activador de plaquetes, tots ells relacionats amb la progressió del dany isquèmic (Raichle, 1983). La via JAK/STAT és la ruta de senyalització mitjançant la qual IL-6 exerceix la seva acció, de manera que tant els efectes beneficiosos com els perjudicials que se li atribueixen a IL-6 estan mediat per l'activació de la via JAK/STAT.

TGF- β : TGF- β és una factor de creixement que participa en la proliferació i diferenciació cel·lular i desenvolupa un paper important en els mecanismes de reparació tissular. TGF- β és un pèptid relacionat amb dany, ja que en condicions normals no està present en el cervell i la seva expressió s'incrementa a partir de 1-6 hores després de la isquèmia (Lehrmann et al., 1995). La major expressió de TGF- β es concentra a la zona de penombra (Krupinski et al., 1996). TGF- β té un paper neuroprotector ja que administrat abans de la isquèmia redueix el volum d'infart. Les accions beneficioses de TGF- β inclouen la reducció de l'adhesió dels neutròfils a l'endoteli, supressió de la producció de ROS, augment de l'angiogènesis a l'àrea de penombra i reducció de l'expressió d'altres citoquines com TNF- α (Pantoni et al., 1998).

IFN- γ : L'IFN- γ és una citoquina produïda pels limfòcits T CD4⁺ i CD8⁺ activats, i en menor quantitat per les cèl·lules NK (Ijzermans i Marquet, 1989). En condicions fisiològiques, l'IFN- γ no és produït per les cèl·lules del SNC, però s'allibera un cop s'ha

produït l'infiltració de limfòcits al parènquima cerebral. En resposta a la isquèmia cerebral augmenta l'expressió d'IFN- γ (Li et al., 2001). L'IFN- γ induïx l'expressió de gens proinflamatoris mitjançant l'activació de la via de senyalització de Stat1 i estimulant la quinasa p38. L'IFN- γ induïx l'expressió de la iNOS en la microglia de manera que presenta propietats citotòxiques. L'IFN- γ també induïx l'expressió del MHC de classe II, el MHC és essencial perquè els macròfags reconeguin antígens, de manera que l'IFN- γ i Stat1 podrien participar en la mort cel·lular després de la isquèmia.

IL-10: L'IL-10, és una citoquina antiinflamatòria que actua inhibint a IL-1 i TNF- α , suprimeix l'expressió i l'activació dels seus receptors. IL-10 és sintetitzada en el SNC i s'ha observat que augmenta la seva expressió en models experimentals d'isquèmia (Strle et al., 2001). Tant l'administració exògena (Spera et al., 1998), com la sobreexpressió gènica d'IL-10 (Ooboshi et al., 2005), mostren efectes beneficiosos en models d'isquèmia. Els pacients amb isquèmia cerebral aguda presenten una elevada concentració d'IL-10 en el fluid cerebroespinal (Tarkowski et al., 1997; Vila et al., 2003), i nivells baixos d'IL-10 es relacionen amb mal pronòstic. La senyalització d'IL-10 induïx principalment l'activació de Stat3 (Riley et al., 1999). De manera que els efectes antiinflamatoris d'IL-10 estan regulats per l'activació de Stat3.

2.3.3.3. QUIMIOQUINES

El reclutament de leucòcits implica la presència de factors quimiotàctics, com les quimioquines, i els seus receptors en els leucòcits. Les quimioquines són citoquines responsables de la quimiotaxis i de l'aproximació de les cèl·lules immunitàries perifèriques des de zones allunyades al punt d'inflamació. Les quimioquines són molècules de baix pes molecular i es divideixen en quatre famílies segons la posició dels residus de cisteïna: C, CC, CXC i CX3C. Les quimioquines actuen específicament sobre receptors de membrana de la superfamília de receptors de 7 dominis transmembrana acoblats a proteïna G (Bajetto et al., 2001) i activen quinases intracel·lulars.

Diferents treballs demostren l'increment de l'expressió d'algunes quimioquines en models animals d'OACM. La *Cytokine Induced Neutrophil Chemoattractant* (CINC), el *Monocyte Chemoattractant Protein* (MCP-1/CCL2) i el *Macrophage Inflammatory Protein* (MIP-1/CCL3) augmenten la seva expressió en el cervell i en el plasma després de la isquèmia (Chen et al., 2003). D'acord amb el seu paper perjudicial, l'inhibició d'aquestes quimioquines s'associa amb una disminució del dany (Garau et

al., 2005), mentre la sobreexpressió de MCP-1 en el cervell potencia el dany isquèmic i incrementa l'infiltració de cèl·lules inflamatòries (Chen et al., 2003) (figura 19).

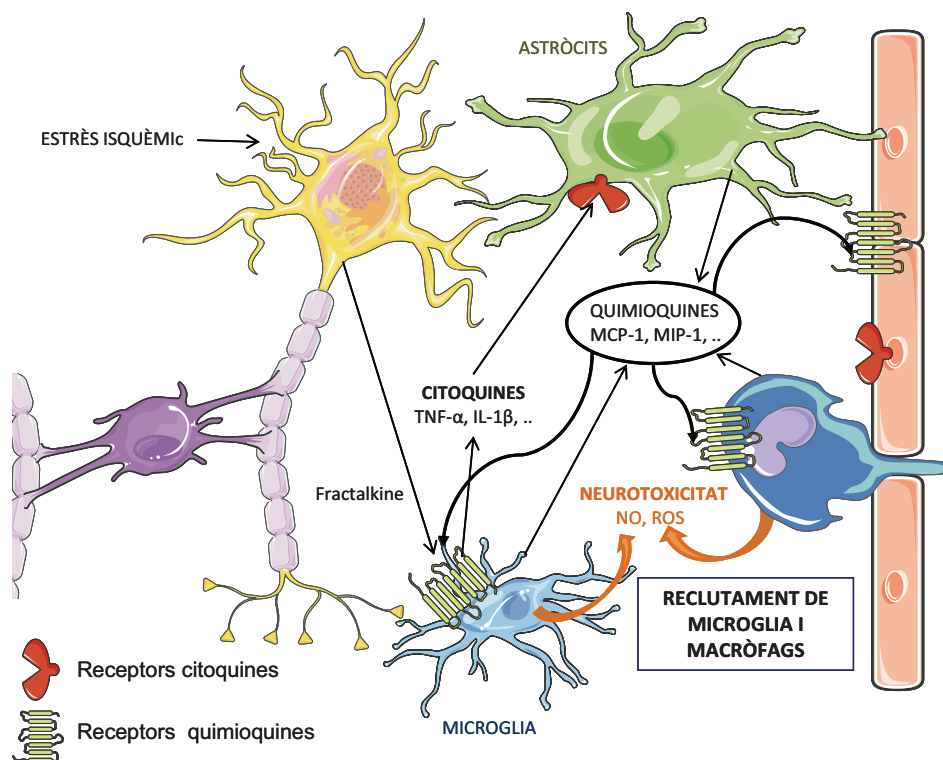


Figura 19. Interacció neurona-glia-endoteli en la resposta inflamatòria a la isquèmia.

A més a més de les seves propietats quimiotàctiques, algunes quimioquines afecten directament la permeabilitat de la BHE. S'ha observat que MCP-1 incrementa la permeabilitat de la BHE en models *in vitro*, i altera les unions estretes, suggerint que MCP-1 podria actuar "obrint" la BHE (Stamatovic et al., 2005). MCP-1 és secretada per astròcits i microglia activada/macròfags, mentre MIP-1 s'expressa en microglia activada/macròfags únicament. Els limfòcits activats també expressen quimioquines i incrementen l'expressió d'altres quimioquines com RANTES/CCL5, IP-10/CXCL10, MIP-1β/CCL4 en astròcits i macròfags perivasculars (Karpus et al., 1999).

Fractalkine, és una quimioquina secretada per les neurones. En resposta a la isquèmia augmenta la seva expressió en les neurones viables que envolten l'infart i en cèl·lules endotelials. L'expressió del seu receptor, CX3CR1 es localitza exclusivament en microglia/macròfags, de manera que fractalkine està relacionada amb la senyalització entre neurona i microglia (Tarozzo et al., 2002).

2.4. ACTIVACIÓ DE LA IMMUNITAT INNATA EN LA ISQUÈMIA CEREBRAL. INDUCCIÓ DE LA VIA JAK/STAT PEL SISTEMA IMMUNE INNAT

Existeixen evidències de l'activació del sistema immune innat participa en la fisiopatologia de la isquèmia/reperfusió perifèrica (Boros i Bromberg, 2006). En la fase aguda de la isquèmia s'activen mecanismes moleculars que participen en la resposta immune innata. En els últims anys, s'han identificat noves vies de senyalització efectores de la immunitat innata que podrien ser responsables d'iniciar el procés inflamatori que es desenvolupa en resposta al dany isquèmic.

2.4.1. LA RESPOSTA IMMUNITÀRIA EN EL SNC

El sistema immunitari es subdivideix en dues branques: el sistema immunitari innat i l'adaptatiu. Tots dos sistemes participen en les respostes infeccioses i autoimmunitàries del SNC. En general, la immunitat innata representa la primera línia de defensa contra microorganismes invasors i no és necessària una exposició prèvia al antígen. Entre els diferents tipus cel·lulars que porten a terme la resposta immune innata s'inclouen monòcits/macròfags, neutròfils, cèl·lules dendrítiques, cèl·lules NK, i dins del SNC; microglia, astroglià i macròfags perivasculars. D'altra banda, l'inducció de la immunitat adaptativa requereix senyals desencadenats per l'activació del sistema innat, per tal de facilitar la proliferació de limfòcits B i T específics d'antígen que són importants per la producció d'anticossos i la formació de les cèl·lules de memòria.

En la immunitat adaptativa, les cèl·lules B i T potencialment poden reconèixer un nombre infinit d'antígens degut a la reordenació a l'atzar dels gens que codifiquen pels seus receptors, en canvi, les cèl·lules del sistema immune innat, reconeixen una bateria d'antígens concrets degut a un conjunt de receptors predeterminat. Donada l'expressió limitada d'aquests receptors, les cèl·lules del sistema innat no són capaces de reconèixer tots els antígens possibles, però estan especialitzades en el reconeixement d'unes poques estructures conservades presents en molts organismes patògens. Són els anomenats patrons moleculars associats a patògens (*Pathogen Associated Molecular Pattern*, PAMP) i els receptors presents en el sistema immune innat que reconeixen aquestes estructures s'anomenen receptors de reconeixement de patrons (*Pattern Recognition Receptors*, PRRs). Una de les principals famílies de PRRs present a les cèl·lules glials, és la dels *Toll-like receptors* (TLRs) que participa en el reconeixement de productes derivats de bacteris, virus, fongs i protozous i posa en alerta el sistema immunitari iniciant el procés inflamatori.

2.4.2. TOLL-LIKE RECEPTORS (TLR)

La principal família que participa en el reconeixement de PAMPs és la dels *toll-like receptors* (TLRs) (Kopp i Medzhitov, 1999). Una de les primeres indicacions de que el cos està patint una infecció per un patògen invasor, és l'activació dels TLRs. Se'ls anomena "sentinelles del sistema immune innat" degut al seu paper clau en el reconeixement d'un ampli ventall de PAMPs, i també responen a agonistes endògens (Tsan i Gao, 2004).

Els TLRs són proteïnes transmembrana de tipus I que presenten un domini extracel·lular caracteritzat per repeticions riques en leucines (*leucine-rich repeats*, LRR) que formen una estructura semblant a una ferradura que interacciona amb els lligands. Els motius LRR són els responsables de l'interacció del TLR amb el seu lligand. A la regió citosòlica, els TLRs presenten un domini anomenat receptor de Toll i IL-1 (*Toll/interleukin 1 receptor*, TIR) (Takeuchi i Akira, 2001). Un cop s'hi uneix el lligand, els TLR es dimeritzen i indueixen canvis conformacionals que activen vies de senyalització (Akira et al., 2006) que conduiran a un augment de l'expressió de citoquines, quimioquines, enzims i altres molècules essencials per l'eliminació del patògen. Majoritàriament els TLRs s'expressen en teixits relacionats amb la funció immunitària, com la fel i els leucòcits perifèrics i en teixits exposats al medi extern, com els pulmons i el tracte intestinal. La seva expressió varia segons el teixit i el tipus cel·lular.

Fins a avui, s'han identificat 13 TLRs en ratolí i 10 en humà. Els anàlisis filogenètics mostren l'existència de 6 subfamílies de TLRs (Roach et al., 2005) amb diferents afinitats per una classe concreta de PAMP (figura 20).

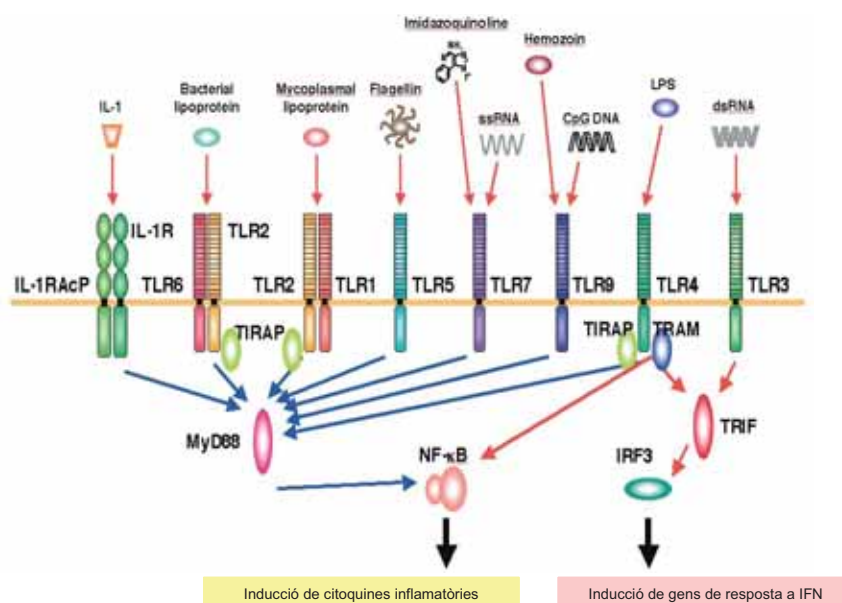


Figura 20. Família dels *Toll-like Receptors* (TLRs).

TLR1: La família de TLR1 comprèn TLR1, TLR2, TLR6 i TLR10, i reconeix motius lipídics bacterians.

TLR3: És una família formada per un únic membre. TLR3 reconeix l'ARN de doble hèlix (dsRNA) que es genera durant la replicació vírica. Els *small interfering RNA* (siRNA) són dsRNA de 19 o 21 parells de bases que s'utilitzen per silenciar l'expressió d'un gen específic mitjançant el mecanisme d'ARN d'interferència. Els siRNA poden tenir efectes inespecífics ja que poden ser interpretats per la cèl·lula com un senyal d'activitat gènica no desitjada i induir l'activació del sistema immune innat. S'ha observat que els siRNA poden activar TLR3, induir la síntesis d'IFN de tipus I i inhibir l'expressió gènica de manera independent de seqüència (Karikó et al., 2004).

TLR4: Reconeix el lipopolisacàrid bacterià (LPS), i algunes proteïnes de la càpside vírica.

TLR5: Reconeix la flagelina bacteriana, un monòmer del flagel dels bacteris.

TLR9: Aquesta subfamília està formada per TLR7, TLR8 i TLR9 i s'uneix a àcids nucleics. El TLR7 i el TLR8 reconeixen petites molècules antivirals, i recentment s'ha demostrat que l'ARN de cadena simple (ssRNA) ric en seqüències GU és el seu lligand natural (Heil et al., 2004). En el treball de Hornung et al. (2005) es demostra que els siRNA també poden induir l'expressió d'IFN- α a través de TLR7 en cèl·lules dendrítiques. El TLR9 reconeix l'ADN amb motius CpG no metilat d'origen bacterià o víric, en mamífers també troben motius CpG però normalment estan metilats i per tant no són reconeguts per TLR9.

TLR11: La família TLR11 comprèn TLR11, TLR12 i TLR13, els PAMPs que són reconeguts per aquesta família encara no estan ben caracteritzats, se sap que TLR11 reconeix bacteris patògens comunament associats a infeccions en el tracte urinari, com *E. Coli* uropatogènic (Zhang et al., 2004).

Els TLRs amplien la seva capacitat de reconèixer patrons moleculars específics heterodimeritzant-se. Per exemple, la formació de dímers de TLR2 i TLR6 és necessària en la resposta a lipoproteïnes diacilades, mentre que TLR2 i TLR1 interaccionen per reconèixer lipoproteïnes triacilades que són constituents de la paret cel·lular de diferents patògens bacterians (Ozinsky et al., 2000). L'especificitat de els TLRs també està influenciada per diverses molècules adaptadores, com MD-2 i CD14 que formen un complex amb TLR4 per respondre a LPS (Miyake et al., 2003).

Els TLRs també reconeixen agonistes endògens alliberats pel teixits danyats. La llista de lligands endògens que estimulen TLR4 inclou: fibronectina (Okamura et al., 2001), l'heparan sulfat (Johnson et al., 2002), la β -defensina (Biragyn et al., 2002), fragments hialurònics (Taylor et al., 2004,) i proteïnes de xoc tèrmic (HSPs) que

estimularien tant TLR2 com TLR4 (Ohashi et al., 2000). Els àcids grassos saturats són lligands de TLR2 (Lee et al., 2004). El TLR2 reconeix cèl·lules necròtiques (Paterson et al., 2003), i TLR3 pot ser estimulat per ARN de mamífer (Karikó et al., 2004). De manera que els TLRs participen en la resposta innata al dany i a l'autoimmunitat.

2.4.2.1. ACTIVACIÓ DE NFκB EN LA SENYALITZACIÓ DELS TLRs

Via dependent de MyD88

La via dependent de MyD88 és comú a tots els TLRs (a excepció de TLR3). *Myeloid differentiation primary response gene 88* (MyD88) és una proteïna citosòlica adaptadora que pot interaccionar amb la regió intracel·lular dels TLRs i iniciar la senyalització (figura 21.1). Els TLRs utilitzen la mateixa via de senyalització que el receptor d'IL-1 (IL-1R) ja que comparteixen el mateix domini citoplasmàtic anomenat TIR. El domini TIR del TLR s'uneix al domini TIR de la regió C-terminal de MyD88. La senyalització s'inicia quan MyD88 és reclutat pel TLR gràcies a l'interacció TIR-TIR. En la regió N-terminal, MyD88 presenta un domini que li permet associar-se a membres de la família *IL-1R-associated Kinasa* (IRAK). IRAK-1 queda ancorada amb MyD88 en un complex amb una altra proteïna anomenada *Toll interacting protein* (Tollip) (Burns et al., 2000).

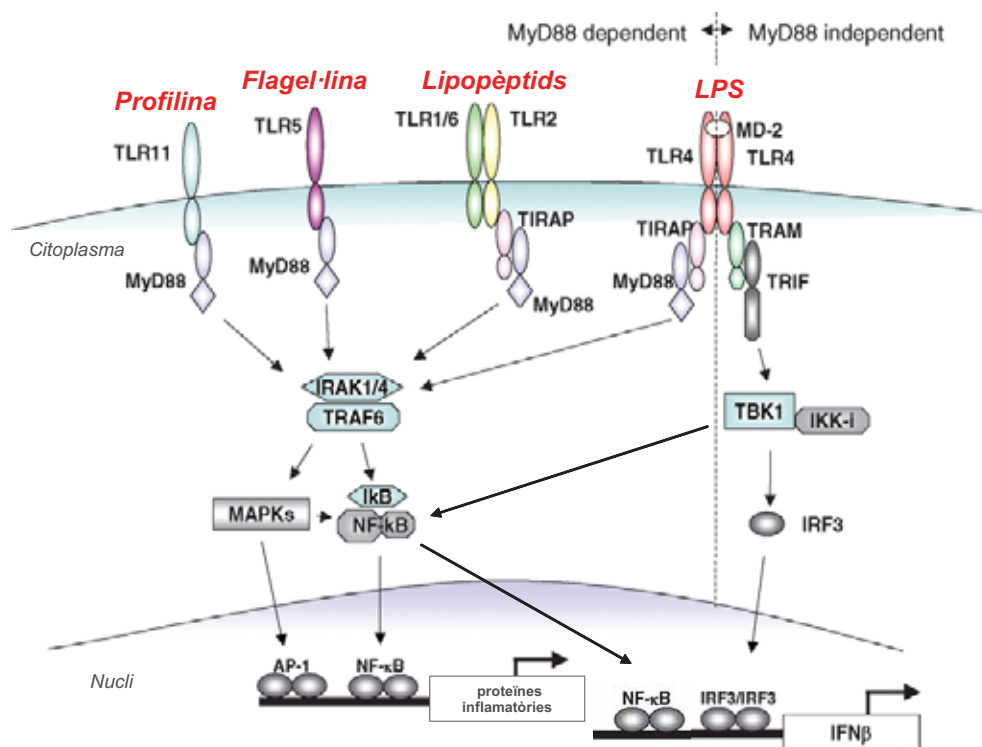


Figura 21.1. Vies de senyalització activades pels TLRs (Adaptat Ishii et al., 2005)

Aquest complex indueix la hiperfosforilació d'IRAK-1, tant per ella mateixa com per l'acció d'IRAK-4 que interacciona amb MyD88. La hiperfosforilació permet a IRAK-1 alliberar-se de MyD88 i Tollip i poder interaccionar amb l'adaptador *TNF receptor-associated factor 6* (TRAF-6). TRAF-6 és una ubiquitina lligasa (Deng et al., 2000) que associada a IRAK activarà a (*TGF-β*)-*activating kinase* (TAK1), que al seu torn iniciarà l'activació de les IκB kinases (IKK), IKKα i IKKβ. Les IKKs fosforilen directament proteïnes de la família IκB. L'IκB es troba normalment al citosol segrestant la subunitat p65 de NFκB (Li et al., 1998). La fosforilació d'IκB representa un senyal de poliubiquitinització, de manera que la proteïna IκB serà degradada pel proteosoma alliberant a p65 i permetent la translocació al nucli de NFκB, on induirà la transcripció d'una bateria de gens que codifiquen per proteïnes proinflamàtòries i molècules coestimuladores (O'Neill, 2002). Aquesta és la via de senyalització utilitzada per tots els TLRs, menys TLR3, per activar NFκB, encara que TLR4, a banda d'utilitzar aquesta via, també pot activar NFκB de manera semblant a TLR3 per la via independent de MyD88. Les proteïnes IRAK i TRAF-6 també porten a terme l'activació de p38 i JNK (Hacker et al., 2000).

Vies independents de MyD88

Encara que estan menys estudiades que la via dependent MyD88, alguns TLRs també utilitzen proteïnes adaptadores addicionals que presenten un domini TIR, com la *TIR-associated protein* (TIRAP, també anomenada Mal) (Hornig et al., 2001), la *TIR-domain-containing adaptor-inducing IFN* (TRIF, també anomenada TICAM-1) i *TRIF-related adaptor molecule* (TRAM; també anomenada TIRP o TICAM-2) (Seya et al., 2005). De manera que la resposta dels TLRs estarà mitjançada, com a mínim en part, per la diferent utilització d'aquestes proteïnes adaptadores que modularan l'activació de les vies de senyalització.

La senyalització per TLR4 és una de les més ben estudiades, activa dues rutes paral·leles, una anomenada TIRAP-MyD88 que permetrà l'activació de citoquines, i una altra anomenada TRAM-TRIF que induirà l'expressió de l'IFN-β i que també és responsable de l'activació de NFκB independent de MyD88.

TLR3, TLR7, TLR8 i TLR9 reconeixen àcids nucleics d'origen viral i indueixen l'expressió d'IFN, encara que els membres de la subfamília TLR9 només utilitzen MyD88 d'adaptador (Hemmi et al., 2000; Wagner et al., 2004), així que a diferència de TLR3 i TLR4, la subfamília TLR9 indueix IFN mitjançant la proteïna MyD88 (figura 21.2).

2.4.2.2 .INDUCCIÓ D'IFN DE CLASSE I PER L'ESTIMULACIÓ DELS TLRs

IRF3 i IRF7 són els factors de transcripció principals en la regulació de l'expressió dels IFN de tipus I. IRF3 s'expressa constitutivament i a nivell elevat en molts tipus cel·lulars, mentre que IRF7 s'expressa en molt poca quantitat en condicions basals. L'IRF3 és responsable de l'inducció gènica d'IFN- β . En resposta a l'estimulació de TLR3 i TLR4, IRF3 es fosforila en diferents residus de serina i treonina, això provoca un canvi conformacional de manera que el domini d'associació a IRF i el domini d'unió a l'ADN queden exposats. Aleshores, IRF3 es dimeritza i s'associa amb els coactivadors CBP i p300, que impedeixen que IRF3 sigui exportat al citosol. IRF3 activa el promotor d'IFN- β amb la cooperació d'altres factors de transcripció, principalment NF κ B. IRF3 també és responsable de l'inducció de les quimioquines IP-10 i RANTES (Nakaya et al., 2001).

L'estimulació d'IFN- β sobre el seu receptor activarà la via JAK/STAT i induirà l'expressió d'IRF7; IRF7 s'activarà en resposta a IFN de tipus I de manera similar a IRF3, i activarà els promotors dels gens de resposta a IFN- α/β . L'inducció d'IFN- α/β estableix un circuit de retroalimentació positiu que assegura uns nivells elevats d'IFN de tipus I i de gens de resposta a IFN. TLR3 i 4 indueixen IFN de classe I de manera independent de MyD88 i dependent de TRIF.

Inducció d'IFN- α/β mitjançant TLR4

L'inducció d'IFN- β (IFN- α no s'indueix) per l'estimulació de TLR4 per LPS és totalment independent de MyD88 (Hoshino et al., 2002), encara que depenent de TRAM-TRIF, mentre que la producció de citoquines proinflamatories depèn tant de MyD88 com de TRAM-TRIF (Yamamoto et al., 2003) (figura 21.1). La producció d'IFN- β en resposta a LPS, està mediada per l'activació de proteïnes quinases relacionades amb la família de les IKK que són responsables de la fosforilació d'IRF3. Aquestes 2 quinases són l'IKK induïble (IKKi) i la *TRAF family member-associated NF κ B (TANK)-binding kinase 1* (TBK1). Sembla ser que la quinasa indispensable seria TBK1 (Hemmi et al., 2004), encara que totes dues poden fosforilar una agrupació de residus serina/treonina presents a la regió C-terminal d'IRF3, i aquesta fosforilacions serien suficients perquè IRF3 s'internalitzi al nucli i s'uneixi a l'ADN. S'ha vist que IKKi i TBK1 també poden fosforilar a IRF7 de manera semblant (Sharma et al., 2003). De manera que l'inducció d'IFN- β per TLR4 està mediada per l'activació de la via de senyalització TRAM-TRIF-TBK1-IRF3.

Inducció d'IFN- α/β mitjançant TLR3

Com ja s'ha esmentat, TLR3 reconeix dsRNA, un intermediari de la replicació vírica, i és necessari per l'inducció d' IFN- α i IFN- β i de citokines proinflamatòries en resposta a l'estimulació exògena amb dsRNA sintètics (Alexopolou et al., 2001).

Igual que TLR4, el TLR3 indueix l'expressió d'IFN- α i IFN- β de manera independent de MyD88, mitjançant la via TRAM-TRIF-TBK1-IRF3 (figura 21.2). A diferència de l'inducció d'IFN per TLR4, l'activació de l'expressió d'IFN- α/β estimulada per dsRNA encara s'observa en cèl·lules deficientes en IRF3 (Sakaguchi et al., 2003), i aquesta inducció residual queda totalment abolida quan s'estimula un doble KO per IRF3 i IRF7, de manera que IRF7 és també necessari per l'inducció d'IFN de tipus I en resposta a TLR3.

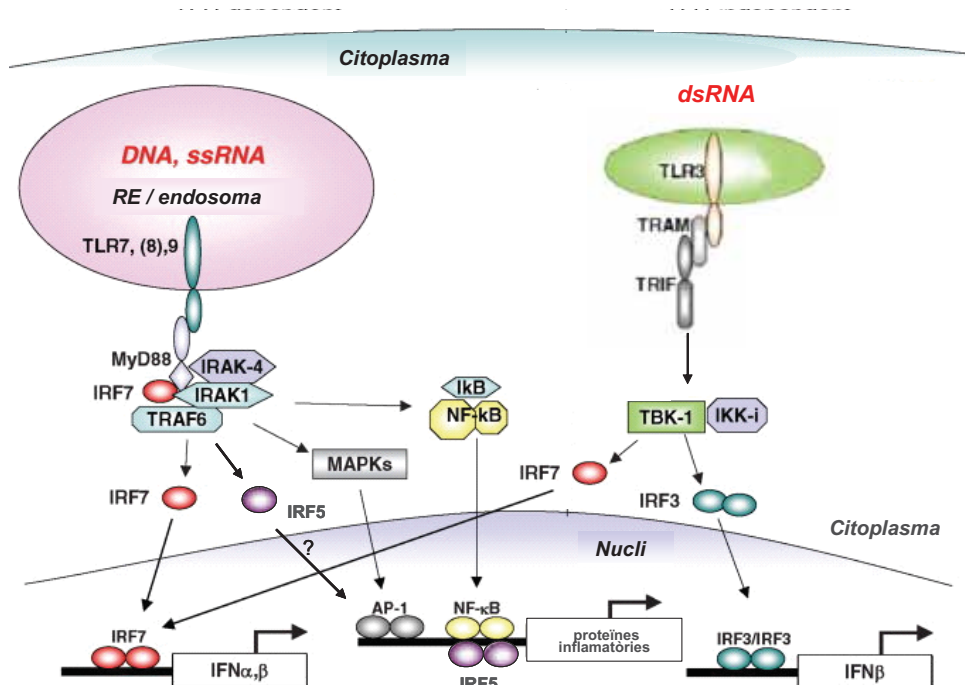


Figura 21.2. Vies de senyalització activades pels TLRs (Adaptat d'Ishii et al., 2005).

Així que els mecanismes d'inducció d'IFN en resposta a TLR4 i TLR3 són diferents:

- D'una banda, TLR4 només indueix l'expressió d'IFN- β , mentre que TLR3 activa tant IFN- β , com IFN- α (Hoshino et al., 2002). El mecanisme que dona lloc a aquesta diferenciació no es coneix.
- TLR4 està localitzat a la membrana cel·lular mentre que TLR3 es situa a la membrana d'òrgànuls intracel·lulars, com els endosomes, reticle endoplasmàtic, o fagolisosomes. L'acidificació endosomal és necessària per la senyalització de TLR3 (Funami et al., 2004).

- IRF-3 s'uneix al promotor ISRE quan s'estimula per TLR3, en canvi, TLR4 i més d'IRF3 necessita la presència de la subunitat p65 de NFκB (Rel A) per induir l'expressió del gen d'IFN-β.

Inducció d'IFN-α/β mitjançant la subfamília de TLR9

Alguns virus indueixen l'expressió d'IFN-α/β a partir de l'activació del TLRs de la subfamília de TLR9 (TLR7, TLR8 i TLR9) (Lund et al., 2004). A diferència de TLR3 i TLR4 que indueixen l'IFN de manera dependent de TRIF, la subfamília de TLR9 utilitza exclusivament l'adaptador MyD88. Els factors de transcripció IRF-5 i IRF-7 són activats directament per MyD88 i regulen l'inducció dels gens de citocines proinflamatories i d'IFN-α/β, respectivament. L'activació d'IRF5 està mitjançada per MyD88 i TRAF6, encara que el mecanisme no està plenament descrit. Sembla ser que per activar la transcripció gènica de les citocines, IRF5 necessita la cooperació de NFκB. IRF-7 també interacciona amb MyD88 i s'activa via IRAK-TRAF-IRF7 per produir la màxima expressió dels interferons de tipus I. Segons el tipus cel·lular i la naturalesa dels lligand, els complexos que es formen al voltant de MyD88 poden ser diferents i induir respostes transcripcionals diferents.

Les rutes de senyalització activades en la resposta immune innata indueixen l'expressió de citocines les quals són responsables de l'inducció de la via JAK/STAT.

2.4.3. ACTIVACIÓ DEL SISTEMA IMMUNE EN LA ISQUÈMIA/REPERFUSIÓ

Estudis recents relacionen l'activació dels TLRs amb malalties no infeccioses del SNC, com la isquèmia cerebral, o la degeneració axonal (Owens et al., 2005).

Les cèl·lules glials, incloent-hi astròcits, microglia i oligodendròcits, expressen TLRs, així com totes les proteïnes que formen part de les vies de senyalització activades pels TLRs (Konat et al., 2006). Les neurones també poden expressar TLRs en determinades condicions patològiques (Maslinska et al., 2004). A banda dels PAMPs, altres molècules poden activar el sistema immune innat mitjançant l'estimulació dels TLRs (Karikó et al., 2004). Es tracta de les molècules anomenades *endogenous TLR agonists*, d'origen endògen, que són alliberades per les cèl·lules lesionades (figura 22).

En la isquèmia cerebral, l'activació del sistema immune innat és un component important de la resposta inflamatòria. Les cèl·lules necròtiques que moren en desposta al dany tissular durant el procés isquèmic alliberen molècules endògenes que són reconegudes pels TLRs, d'aquesta manera els *centinelles* del sistema immune innat s'assabenten de que està tenint lloc un procés de mort cel·lular. L'activació dels TLR en la glia resident desencadena la resposta immune en el SNC i s'induirà l'expressió

de mediadors inflamatoris com citoquines i quimioquines. L'activació dels TLRs contribueix a desenvolupar el procés inflamatori que segueix al dany en el SNC.

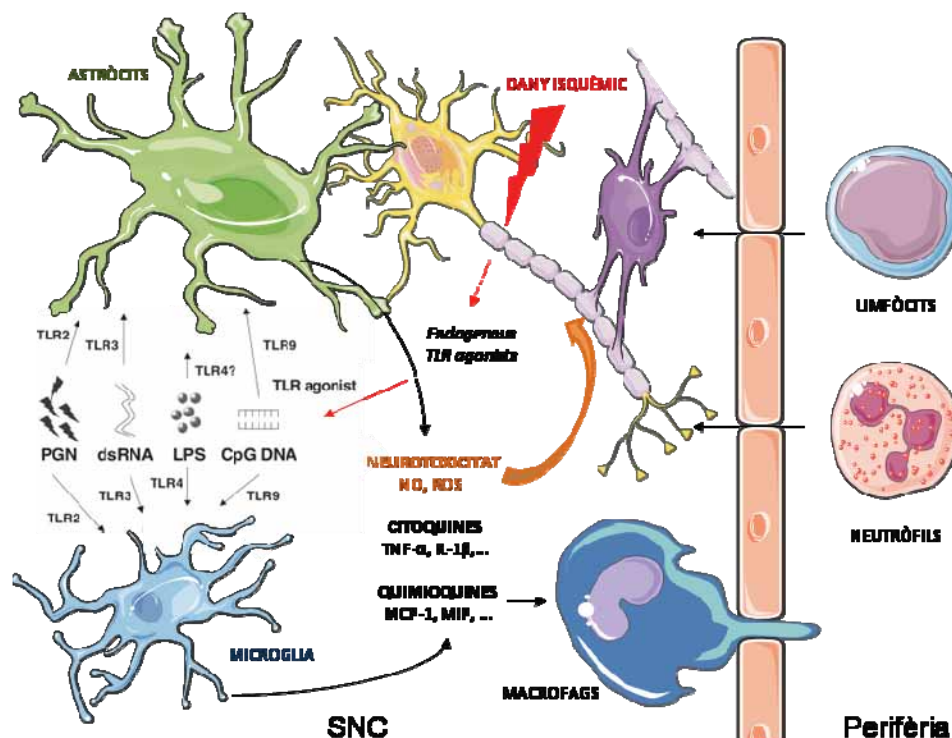


Figura 22. Activació del sistema immunitari innat en la isquèmia/reperfusió.

L'activació dels TLRs en resposta al dany isquèmic explicaria el fenomen de preconditionament amb LPS. Estudis *in vivo*, ha demostrat que el subministrament d'una dosi inferior al llindar sistèmic del LPS protegeix front un atac isquèmic posterior (Puisieux et al., 2000; Bastide et al., 2003; Karikó et al., 2004). El mecanisme molecular responsable del preconditionament isquèmic per LPS no està gaire estudiat, però sembla ser que TLR4 jugaria un important paper en la reprogramació de la resposta immunitària en la isquèmia subsequents. Cal estudiar el paper de TLR4, així com dels lligands endògens que són alliberats pel teixit isquèmic.

Estudis recents han demostrat que l'expressió de TLR2 i TLR4 incrementa en neurones després de la isquèmia/reperfusió, i el dany cerebral i els dèficits neurològics deguts a l'infart són menors en els ratolins KO d'TLR2 i TLR4 (Tang et al., 2007; Caso et al., 2007). Un altre treball, demostra un increment en l'expressió de TLR2 en la microglia després de la isquèmia (Lehnardt et al., 2007).

A més a més dels TLRs, existeixen altres PRRs que participen en la resposta immune a la isquèmia. El receptor *scavenger* de classe B, CD36, és una glicoproteïna de superfície que s'expressa en microglia/macròfags i endoteli. CD36 reconeix una multitud de lligands, incloent lipoproteïnes oxidades de baixa densitat (LDL), cadenes

d'àcids grassos, β -amiloide fibril·lar i membranes de cèl·lules apoptòtiques (Febbraio et al., 2001). S'ha observat que la seva expressió s'incrementa en resposta a la isquèmia i que els ratolins deficients en CD36 presenten menor volum d'infart i reducció de la producció de ROS (Cho et al., 2005).

La via clàssica del complement podria estar implicada en el dany isquèmic (de Simoni et al., 2004), encara que un treball recent demostra que les proteïnes del complement C3a i C5a, són necessàries per la neurogènesi després de la isquèmia (Rahpeymai et al., 2006).

3. ACTIVACIÓ DELS ASTRÒCITS EN LA ISQUÈMIA CEREBRAL

Durant dècades, tota l'atenció del procés isquèmic s'ha centrat en les neurones, actualment se sap que els astròcits, la microglia i els oligodendròcits poden participar activament, tant en la degradació del teixit isquèmic, com en la protecció de la funció cerebral i la potenciació de la supervivència i la regeneració. Després de la isquèmia, les cèl·lules glials experimenten canvis morfològics i funcionals.

3.1. PAPER DE L'ASTROGLIA EN EL SISTEMA NERVIÓS CENTRAL

Els astròcits, les cèl·lules glials predominants, són molt més nombrosos que les neurones. La proporció astròcit-neurona, varia segons la regió del cervell i de l'espècie animal; una major proporció s'observa a mesura que s'avança a l'escala filogenètica (Bass et al., 1971). Els astròcits porten a terme algunes funcions essencials per l'activitat neuronal, incloent el metabolisme i la recaptació de glutamat, la neurotransmissió, el manteniment de l'homeòstasi, la producció de factors neurotròfics i la formació de la BHE (taula 6).

Segons la seva morfologia i organització els astròcits es subdivideixen en tres tipus: astròcits radials, fibril·lars i protoplàsmics. Els astròcits radials es localitzen envoltant els ventricles i s'orienten perpendicularment a la superfície ventricular. Presenten prolongacions molt llargues sense ramificacions. Els astròcits fibril·lars no presenten gaires prolongacions, però les poques que tenen són llargues i presenten la característica morfologia estrellada. Els astròcits protoplàsmics, en canvi, presenten prolongacions curtes amb moltes ramificacions. Els astròcits protoplàsmics es localitzen a la matèria gris, mentre que els fibrosos predominen a la matèria blanca. Els astròcits localitzats en el límit entre la matèria blanca i la gris poden presentar una morfologia intermitja.

La proteïna àcida fibril·lar (GFAP) i S-100 β (una proteïna citosòlica que s'uneix a Ca²⁺) són els marcadors d'astroglia més utilitzats (Ludwin et al., 1976). La

GFAP forma part dels filaments intermedis citoplasmàtics i és una de les proteïnes més sintetitzades del cervell (Bignami et al., 1972).

Funcions dels astròcits	
Manteniment de l'ambient extracel·lular	Captació de K^+
	Homeostasi de Ca^{2+}
	Destoxicació d'amoni
	Eliminació de radicals lliures
	Segrest de metalls
Producció de factors de creixement	Regulació del pH extracel·lular
	NGF, BDNF, GDNF, FGF-2, TGF- β , VEGF, PDGF IL-6 i TNF- α
Resposta immune	Quimioquines (RANTES, MIP , IP-10)
	Inhibidor de l'activador de plasminogen -1
	Eritropoietina
	Lipocortina-1
Suport a les neurones	Reserva de glicogen
	Font d'intermediaris del cicle TCA
	Precursors de neurotransmissors
Sinaptogènesis i neurogènesis	Recaptació de neurotransmissors

Taula 6. Resum de les funcions més importants que porten a terme els astròcits

Els astròcits es comuniquen entre ells mitjançant les *gap junctions*. Les *gap junctions* comuniquen els citoplasmes d'astròcits adjacents i permeten el pas de molècules de baix pes molecular (≤ 1 kDa). La funció de les *gap junctions* no és ben coneguda però sembla ser que participarien en el manteniment de l'homeòstasi, i en condicions d'estrès permeten la resposta funcional d'astròcits allunyats de la lesió primària (Enkvist and McCarthy, 1992).

Els astròcits participen en la formació i el manteniment de la barrera hematoencefàlica (BHE). Presenten perllongacions, anomenades peus astrocitaris que contactan amb les cèl·lules de l'endoteli vascular i formen la BHE que separa el parènquima cerebral de l'ambient extern.

Tot i que la major part dels astròcits comparteixen característiques morfològiques similars, els astròcits, entre ells, presenten diferents funcions en diferents regions del SNC. Aquesta heterogeneïtat s'observa en la varietat de receptors de membrana i canals iònics, en la diferent capacitat de recaptació de neurotransmissors, en la quantitat *gap junctions*, i en l'expressió de neuropèptids que poden presentar els astròcits (Cholewinski et al., 1988; Hansson 1990; Wilkin et al.,

1990; Schwartz i Taniwaki, 1994). De manera que existeixen molts tipus diferents d'astròcits, tants com de neurones.

3. 2. EFECTES DE L'ASTROGLIA EN LA SUPERVIVÈNCIA NEURONAL DURANT LA ISQUÈMIA/REPERFUSIÓ

Durant la isquèmia, inicialment els astròcits estan relacionats amb funcions neuroprotectores que poden contribuir a la recuperació neurològica.

La recaptació de glutamat de la fenadura sinàptica és necessària pel correcte funcionament de la neurotransmissió glutamatèrgica i per evitar l'exitotoxicitat desencadenada durant el procés isquèmic (Danbolt, 1994). La recaptació de glutamat es porta a terme pels transportadors de glutamat EAAT1 (GLAST) i EAAT2 (GLT-1). La recaptació té lloc contra gradient, de manera que requereix un elevat cost energètic. En el nucli isquèmic, on la isquèmia és completa, els astròcits no disposen de l'energia necessària per portar a terme el transport de glutamat i es produeix un augment massiu de la concentració de glutamat extracel·lular. Els transportadors de glutamat poden treballar en les dues direccions, així doncs, la depleció dels nivells d'ATP, no únicament comporta l'inhibició de la recaptació, sinó que, a més a més, es produeix una alliberació de glutamat des dels astròcits (Chen i Swanson, 2003).

Una altra funció dels astròcits que promou la supervivència neuronal, és la capacitat de recaptar l'excés de K^+ alliberat per les neurones. El K^+ extracel·lular que s'acumula durant la despolarització neuronal és ràpidament recaptat pels astròcits prevenint una major despolarització.

El glicogen és la principal reserva energètica del cervell i es troba enmagatzemat en els astròcits (Ignacio et al., 1990). Quan hi ha manca d'energia, el glicogen és metabolitzat a glucosa i la glucosa es catabolitzada a piruvat via glucolisis. El piruvat és aleshores convertit en lactat que és transportat des dels astròcits cap a les neurones on és utilitzat com a substrat energètic (Dringen et al., 1993). De manera que els astròcits són una important font d'energia per suplir les neurones durant la isquèmia (Swanson and Choi, 1993).

3. 3. RESPOSTA DELS ASTRÒCITS A LA ISQUÈMIA/REPERFUSIÓ

Després de la isquèmia, una porció dels astròcits del nucli isquèmic es manté viable i metabòlicament activa durant les primeres fases després de la reperfusió, ja que els astròcits poden resistir més estrès en comparació amb les neurones. Això pot ser degut a que els astròcits presenten major quantitat d'enzims i proteïnes relacionades amb els sistemes de defensa. Per exemple, els astròcits tenen grans quantitats de glutatió (Raps et al., 1989) i d'enzims antioxidants, i majors nivells

de proteïnes antiapoptòtiques com Bcl-2 (Gabryel and Trzeciak, 2001). A més a més, els astròcits presenten importants quantitats de substrats metabòlics (glicogen, glutamina i glutamat) que els permeten mantenir uns nivells elevats d'activitat metabòlica en absència de glucosa. Altres factors que podrien explicar la resistència a la isquèmia poden ser: augment de l'activitat piruvat carboxilasa, gran capacitat per utilitzar àcids grassos i cossos cetònics (Edmond et al., 1987), i gran capacitat gluconeogènica. Alguns o tots aquests factors podrien contribuir a la relativa resistència que mostren els astròcits davant del dany isquèmic. Tot i així, depenent de la gravetat de l'insult isquèmic la funció i la supervivència astrocitària també poden estar compromeses.

La resposta primària dels astròcits inclou l'edema astrocitàri, que té lloc inicialment en els peus astrocitaris que envolten els vasos (Kimelberg, 2005). A més a més, les *gap junctions* presents als astròcits poden contribuir a la propagació de l'onada de despolarització. L'onada de despolarització s'arriba a observar en la perifèria de l'infart on es poden detectar elevades concentracions de glutamat i K^+ després de la isquèmia (Busch et al., 1996).

Inflament dels astròcits

Els astròcits pateixen un inflament degut a l'entrada d'aigua que es conegut com a *swelling*. L'inflament astrocitàri és una de les respostes més evidents a la isquèmia i s'observa en els primers estadis (García et al., 1977). El *swelling* té lloc inicialment en els peus astrocitaris al voltant dels capil·lars, i amb el temps tota la cèl·lula esdevé inflada. El flux d'aigua cap al interior de l'astròcit és el resultat del moviment osmòtic de l'aigua després de la disfunció homeostàtica. La caiguda energètica durant la isquèmia fa que les bombes iòniques deixin de funcionar. Sembla ser que l'aquaporina-4, una proteïna transportadora d'aigua que predomina en astròcits, contribueix al procés de *swelling*. El trencament de la BHE desenvolupa l'edema vasogènic i un increment en l'entrada de proteïnes i aigua dona lloc al *swelling* (Klatzo et al., 1980). El *swelling* degut a la isquèmia causa edema citotòxic que resulta en un increment de la pressió intracraneal. Altres conseqüències del *swelling* són l'alliberació de glutamat, alteracions en la concentració d'ions extracel·lulars i pot arribar fins i tot a produir mort de l'astròcit per trencament de la membrana plasmàtica.

Astrocitosis reactiva

Després de la isquèmia, els astròcits supervivents que envolten el teixit danyat s'hipertrofien i inicien un procés de proliferació, aquests canvis es coneixen com a astrocitosis reactiva. El creixement del citoplasma s'associa a la generació de nous

processos citoplasmàtics, més llargs i prims. S'acumulen filaments intermedis, principalment GFAP. La principal característica dels astròcits reactius és l'increment de l'expressió de GFAP i vimentina. A més a més, s'incrementa el tamany del nucli, es dispersa de la cromatina i augmenta el nombre de mitocondris, ribosomes i complexos de Golgi. Tots aquests canvis morfològics són característics de cèl·lules metabòlicament actives. Els processos citoplasmàtics gials acaban envoltant l'àrea necròtica formant l'anomenada cicatriu glial. La funció més important dels astròcits reactius és la formació d'aquesta cicatriu que separa el teixit danyat del teixit sa, per evitar la propagació del dany. D'altra banda, la cicatriu glial inhibeix el creixement de les neurites i dels axons neuronals, impeding la regeneració de la regió isquèmica.

3. 4. ELS ASTRÒCITS I L'ESTRÉS OXIDATIU

L'estrès oxidatiu és una de les principals causes de dany en la isquèmia (Chan, 1996). Els antioxidants de baix pes molecular, com l'àcid ascòrbic, el glutatió i l' α -tocoferol, juntament amb els enzims antioxidants, constitueixen les defenses cel·lulars contra l'estrès oxidatiu. Els astròcits presenten elevades concentracions d'aquests antioxidants així com major nivells d'expressió del SOD, catalasa, glutatió reductasa i glutatió peroxidasa (Wilson, 1997). Aquesta elevada concentració d'antioxidants en els astròcits pot protegir a les neurones que els envolten en condicions d'estrès oxidatiu (Dringen, 2000). Estudis en cultius de neurones i astròcits demostren que els astròcits poden protegir a les neurones de la mort induïda per peròxid d'hidrogen (Desagher et al., 2000). Existeixen evidències de que el glutatió present en els astròcits pot ser responsable de la neuroprotecció. El glutatió és el principal antioxidant del cervell. Els astròcits contribueixen al contingut neuronal de glutatió per una ruta indirecte. El glutatió és alliberat pels astròcits i tallat en el dipèptid de cisteïna-glicina, que al seu torn allibera la cisteïna que serà recaptada per les neurones per sintetitzar glutatió novament (Dringen, 2001). Igual que el glutatió, l'ascorbat és un important antioxidant que reacciona directament amb els agents oxidants i pot servir com a cofactor per reduir el glutatió oxidat i l' α -tocoferol. Entre astròcits i neurones existeix un cicle de reciclatge d'ascorbat (Wilson, 1997). Els astròcits també expressen la forma induïble de la hemooxigenasa després de la isquèmia (Geddes et al., 1996). La hemooxigenasa és el primer pas del metabolisme del grup hemo i és important en la prevenció de l'utilització del ferro per la producció de ROS, particularment després d'un infart hemorràgic on s'allibera hemoglobina cap al parènquima cerebral.

3. 5. ELS ASTRÒCITS EN LA INFLAMACIÓ I LA IMMUNITAT

Els astròcits també són capaços de participar en la resposta immunitària i com que són molt més nombrosos que la microglia, és possible que l'astroglia sigui el component majoritari del sistema immune innat en el SNC (Dong and Benveniste, 2001).

Els astròcits responen a diferents PAMPs, com el lipopolisacàrid (LPS), el peptidoglicà o els motius CpG de l'ADN no metilat tant *in vivo* com *in vitro*, que indueixen un augment en l'expressió de citoquines i quimioquines proinflamatòries. Els astròcits expressen TLR2, TLR3, TLR4, TLR5 i TLR9 (Bowman et al., 2003; Farina et al., 2005), a més d'altres PRRs com *dsRNA-dependent protein kinase* PKR, les proteïnes NOD1 i NOD2, *receptors scavengers*, el receptor de manosa i factors i receptors del sistema del complement (Farina et al., 2007). Tots aquests PRR són importants pel reconeixement primari dels agents infecciosos i els senyals de perill endògens.

Els mediadors inflamatoris alliberats pels astròcits i la microglia després de l'activació dels PRR, activen les cèl·lules veïnes amplificant la resposta immune inicial, i modifiquen la permeabilitat de la BHE per permetre l'infiltració dels leucòcits que dirigiran la resposta adaptativa (taula 7). Els mediadors de la funció astrocitària participen en la inflamació i la immunosupressió, l'equilibri entre aquestes dues respostes és fonamental, la desregulació d'aquestes vies pot desencadenar un procés crònic de neuroinflamació o neurodegeneració. Així doncs, els astròcits són una important font de citoquines i quimioquines immunològicament rellevants, i per tant queda palesa l'importància d'aquest tipus cel·lular en la modulació de la resposta inflamatòria.

Quan té lloc una infecció en el SNC, les cèl·lules immunitàries perifèriques que s'infiltringen cap al parènquima cerebral també secreten citoquines proinflamatòries que contribueixen a mantenir l'activació astrocitària. Els astròcits responen a l'estimulació amb IFN- γ i TNF- α produint més citoquines i quimioquines inflamatòries (Meeuwssen et al., 2003), augmenten l'expressió de molècules necessàries per funcionar com a cèl·lules presentadores d'antigen i la capacitat de presentar antigen a les cèl·lules T (Soos et al., 1998).

El complex major d'histocompatibilitat (MHC) de classe II és fonamental per l'inducció de la resposta immune mitjançant la presentació dels antigens processats a les cèl·lules T. El MHC de classe II s'expressa normalment en cèl·lules APC del sistema immunitari, i pot ser induïda en alguns tipus cel·lulars, com els astròcits i la microglia. En astròcits, l'IFN- γ és l'inductor més potent de MHC de classe II (Dong i Benveniste, 2001). L'activació de les cèl·lules CD4⁺ T *helper* (Th) en el sistema nerviós

és molt important en la regulació de la resposta immune, en la inflamació i el procés de reparació. Existeixen dos tipus de limfòcits Th segons la bateria de citoquines que produeixen (Romagnani, 1997) i les seves funcions efectores. Els limfòcits Th1 produeixen IL-2, IFN- γ i TNF- β . Th1 és el fenotip proinflamatori que permet l'activació dels macròfags i la destrucció del teixit (Abbas et al., 1996). Les cèl·lules Th2 produeixen IL-4, IL-10 i IL-13, citoquines amb activitat antiinflamatòria que inhibeixen les respostes Th1 i l'activació de macròfags.

Mediadors de la funció astrocitària	
1. Citoquines: IL-1β, IL-10, IL-6, IL-12, TNF-α, IFN-α, IFN-β, GM-CSF, M-CSF, TGF-β, BAFF	<ul style="list-style-type: none"> - Increment de la permeabilitat de la BHE - Activació de les cèl·lules endotelials - Diferenciació i proliferació de microglia i monòcits - Activació astròcits - Diferenciació i supervivència de cèl·lules B - Immunosupressió - Alliberació de mediadors neuroprotectors
2. Quimioquines: MCP-1, CCL3, MIP-1β, CCL20, RANTES, IL-8, IP-10, CXCL12, CXCL 1, CXCL2 i CX3CL1	<ul style="list-style-type: none"> - Reclutament de monòcits , cèl·lules dendrítiques, limfòcits T i B i neutròfils - Regulació de la mielinització i l'activació microglial - Proliferació i supervivència dels astròcits - Migració de la microglia i els progenitors neurals
3. Factors neurotròfics : NGF, CNTF, BDNF, VEGF, IGF1 i LIF	<ul style="list-style-type: none"> - Supervivència, diferenciació i regeneració neuronal - Supervivència oligodendroglia - Remielinització i neurogènesis

Taula 7 . Factors mediadors de la funció astrocitària.

La microglia és una APC molt eficient dirigida a l'estimulació de cèl·lules Th1 i Th2. D'altra banda, els astròcits modulen respostes Th2 principalment (Aloisi et al., 2000). Els astròcits i microglia podrien participar de diferent manera en el desenvolupament de la resposta immune en el SNC, però el seu paper específic encara no està clar.