

UNIVERSITÀ DELLA CALABRIA

DOTTORATO DI RICERCA

IN

BIOCHIMICA CELLULARE ED ATTIVITÀ DEI FARMACI IN ONCOLOGIA

XXIV Ciclo

**Caratterizzazione degli effetti neuroprotettivi della leptina in
un modello sperimentale di ischemia cerebrale focale nel ratto**

Settore Scientifico Disciplinare: BIO/14 Farmacologia

Coordinatore

Chiar.mo Prof.

Diego Sisci

Relatore

Dott.ssa Diana Amantea

Dottorando

Dott. Francesco Petrelli

ANNO ACCADEMICO 2010/2011

INDICE

ABSTRACT	Pag.	1
SOMMARIO		2
CAPITOLO 1 - Introduzione		3
1.1 – L'ischemia cerebrale		
1.1.1 – Epidemiologia e fisiopatologia		3
1.1.2 – Modelli sperimentali di ischemia cerebrale		5
1.1.3 – Meccanismi di danno neuronale		8
1.1.4 – Ruolo della neuroinfiammazione nella fisiopatologia dell'ischemia cerebrale		13
1.2 - Ruolo dell'astroglia nella neuroprotezione		
1.2.1 – Morfologia e struttura degli astrociti		26
1.2.2 – Biologia funzionale degli astrociti		28
1.2.3 – Ruolo degli astrociti reattivi nella neuroinfiammazione e nella patogenesi dell'ischemia cerebrale		31
1.3 - Effetti biologici della leptina		
1.3.1 – Sintesi e funzioni della leptina		35
1.3.2 – Classificazione ed espressione dei recettori della leptina		37
1.3.3 – Meccanismi di trasduzione del segnale dei recettori della leptina		39
1.3.4 – Leptina e neuroprotezione		44
1.4 - Ruolo di STAT-3 e Akt nella sopravvivenza neuronale		
1.4.1 – Struttura, funzione e regolazione delle proteine STAT		48
1.4.2 – Ruolo di STAT-3 nello sviluppo del sistema nervoso		53
1.4.3 – Modulazione di STAT-3 in seguito ad ischemia		55
1.4.4 – Struttura e attivazione della proteina chinasi Akt		58
1.4.5 – Bersagli molecolari della proteina chinasi Akt		59
1.4.6 – Ruolo di Akt nel danno da ischemia cerebrale		61

CAPITOLO 2 – Scopo della tesi	63
CAPITOLO 3 – Materiali e Metodi	65
3.1 – Animali e trattamento farmacologico	65
3.2 – Ischemia cerebrale focale	65
3.3 – Analisi del flusso ematico cerebrale	68
3.4 – Neuropatologia e quantificazione del danno ischemico	69
3.5 – Valutazione del deficit neurologico	72
3.6 – Preparazione degli omogenati di tessuto cerebrale	73
3.7 – Frazionamento subcellulare	74
3.8 – Western Blotting	75
3.9 – Immunoistochimica	77
3.10 – Microscopia elettronica	80
CAPITOLO 4 – Risultati	83
4.1 – La somministrazione sistemica di leptina riduce il danno cerebrale indotto nei ratti da 24 h di MCAo permanente	83
4.2 – La somministrazione sistemica di leptina non modifica il flusso ematico cerebrale nei ratti sottoposti ad MCAo permanente	85
4.3 – Effetti a lungo termine della somministrazione sistemica acuta di leptina sul volume di infarto cerebrale e sul deficit neurologico indotti da MCAo	86
4.4 – Modulazione dei livelli di p-STAT3 e p-Akt nella corteccia cerebrale dei ratti ischemici trattati con leptina	88
4.5 – Modulazione dei livelli di p-STAT3 e p-Akt nelle frazioni nucleari e citosoliche della corteccia cerebrale dei ratti ischemici trattati con leptina	90
4.6 – Analisi regionale e cellulare dell’espressione di p-STAT3 nel cervello dei ratti ischemici trattati con leptina	93
4.7 – Modulazione di TIMP-1 nella corteccia cerebrale dei ratti trattati con leptina sottoposti a 24 h di MCAo permanente	97
4.8 – Caratterizzazione e localizzazione cellulare dell’espressione di homer-1b/c e di homer-1a nel cervello di ratto in età perinatale (P7) e adulto (P30)	98

4.9 – Analisi morfologica e morfometrica di astrociti a contatto con sinapsi glutammatergiche nella corteccia cerebrale di ratti sottoposti a MCAo	101
CAPITOLO 5 – Discussione	104
BIBLIOGRAFIA	116
PRODUZIONE SCIENTIFICA	167

ABSTRACT

In addition to its effects in the hypothalamus to control body weight, leptin is involved in the regulation of neuronal function, development and survival. Recent findings have highlighted the neuroprotective effects of leptin against ischemic brain injury; however, to date, little is known about the role played by signal transducer and activator of transcription (STAT)-3, a major mediator of ObR transduction pathway in the brain, in the beneficial effects of the hormone. Our data demonstrate that systemic acute administration of leptin produces neuroprotection in rats subjected to permanent middle cerebral artery occlusion (MCAo), as revealed by a significant reduction of brain infarct volume and neurological deficit up to 7 days after the induction of ischemia. By combining a subcellular fractionation approach with immunohistofluorescence, we observe that neuroprotection is associated with a cell type-specific modulation of STAT3 phosphorylation in the ischemic cortex. The early enhancement of nuclear phospho-STAT3 induced by leptin in the astrocytes of the ischemic penumbra may contribute to a beneficial effect of these cells on the evolution of tissue damage. The increased expression of homer-1a that we observe in astrocytes up to 7 days after stroke, further underscores their beneficial role. Moreover, 3D reconstruction of electron microscopy images, followed by morphometric analysis, revealed that after stroke reactive astrocytes show a reduced bilateral coverage, whereas the percentage of contacts with the interface button-axon of the glutamatergic synapses remains unchanged. The elevation of phospho-STAT3 induced by leptin in neurons after 24h MCAo is associated with an increased expression of tissue inhibitor of matrix metalloproteinases (TIMP)-1 in the cortex, suggesting its possible involvement in the neuroprotection produced by the adipokine.

SOMMARIO

La leptina, oltre ad avere effetti sull'ipotalamo per il controllo del peso corporeo, è coinvolta nella regolazione della funzionalità, dello sviluppo e della sopravvivenza neuronale. Studi recenti hanno evidenziato i suoi effetti neuroprotettivi nel danno ischemico cerebrale, ma fino ad oggi il ruolo del fattore di trasduzione ed attivatore trascrizionale (STAT)-3, il principale mediatore della via di trasduzione del segnale di ObR nel cervello, non è stato chiarito. I nostri dati dimostrano che la somministrazione sistemica acuta di leptina è neuroprotettiva in ratti sottoposti ad occlusione permanente dell'arteria cerebrale media (MCAo), come documentato dalla riduzione significativa del volume di infarto cerebrale e del deficit neurologico fino a 7 giorni dopo l'induzione di ischemia. Mediante analisi di immunofluorescenza e tecniche di frazionamento subcellulare abbiamo osservato che la neuroprotezione da leptina è associata con la modulazione dei livelli di fosforilazione di STAT-3 in differenti tipi cellulari nella corteccia cerebrale ischemica. Infatti, poche ore dopo l'insulto la leptina aumenta i livelli di p-STAT3 nel nucleo degli astrociti della penombra ischemica contribuendo così agli effetti benefici di queste cellule sull'evoluzione del danno. L'aumentata espressione di homer-1a che osserviamo negli astrociti fino a 7 giorni dopo l'induzione di ischemia, sottolinea ulteriormente il loro ruolo benefico. Mediante ricostruzione 3D di immagini di microscopia elettronica, combinata con analisi morfometrica, abbiamo osservato che gli astrociti reattivi mostrano un ridotto *coverage* bilaterale, mentre la percentuale di contatto con le sinapsi glutammatergiche rimane invariata. Inoltre, l'aumento di p-STAT3 indotto dalla leptina nei neuroni dopo 24h di MCAo è associato con un aumento dell'espressione dell'inibitore tissutale delle metalloproteasi della matrice (TIMP)-1 nella corteccia, suggerendo un suo coinvolgimento nella neuroprotezione indotta dall'adipochina.

1.1 – L'ISCHEMIA CEREBRALE

1.1.1 – Epidemiologia e fisiopatologia

L'ischemia cerebrale è la seconda causa di morte e la prima causa di disabilità a lungo termine nel mondo, associata pertanto ad importanti conseguenze cliniche e socioeconomiche che sottolineano il bisogno di terapie efficaci. Infatti, è stato stimato che ogni anno 15 milioni di persone sono colpite da questa patologia, che causa morte in circa 5 milioni di pazienti e invalidità permanente in altri 5 milioni (Roger et al., 2011; Internet Stroke Center 2011).

I farmaci oggi a disposizione (antiaggreganti piastrinici e trombolitici) migliorano solo parzialmente l'esito clinico dei pazienti in quanto mirano a ripristinare il flusso ematico cerebrale, ma non hanno alcun effetto sulla degenerazione neuronale responsabile dei sintomi della malattia. Attualmente, l'unico trattamento farmacologico approvato dalla FDA per l'ictus ischemico acuto si basa sull'utilizzo dell'attivatore tissutale del plasminogeno ricombinante (rtPA) per la dissoluzione del coagulo (Higashida et al., 2003), che deve essere somministrato entro poche ore dall'inizio dell'ischemia in strutture ospedaliere attrezzate. Sfortunatamente, meno del 5% dei pazienti colpiti da ischemia ha la possibilità di ricevere un trattamento con rtPA a causa della ristretta finestra temporale (intervallo di tempo entro cui è possibile intervenire farmacologicamente) e a causa di altre complicanze associate allo stesso ictus. Inoltre, anche in presenza di una trombolisi efficace, la maggior parte dei pazienti svilupperà deficit neurologici e sarà esposta ad un alto rischio di emorragia intracerebrale (Hacle et al., 2008). Ciò sottolinea l'esigenza di individuare nuove terapie efficaci capaci di interferire con i meccanismi principali coinvolti nel danno cerebrale. L'ischemia cerebrale è

uno stato patologico caratterizzato da una diminuzione del flusso sanguigno cerebrale tale da non poter più soddisfare la domanda metabolica del tessuto. Fra le cause più comuni vi è l'ostruzione di un'arteria cerebrale che può essere determinata da diversi meccanismi, come ad esempio la trombosi o la formazione di emboli.

La trombosi è caratterizzata da una coagulazione intravascolare localizzata, generalmente secondaria all'aterosclerosi, per cui si produce una stenosi arteriosa con progressivo restringimento del lume vasale. La formazione di trombi interessa più comunemente la biforcazione carotidea, l'origine dell'arteria cerebrale media o i rami terminali dell'arteria basilare. La trombosi cerebrale è spesso preceduta dai cosiddetti attacchi ischemici transitori (TIA), che consistono nella diminuzione momentanea dell'irrorazione sanguigna del tessuto cerebrale.

L'embolia è una patologia vascolare occlusiva che si differenzia dalla trombosi in quanto l'ostruzione vasale è di tipo distale rispetto all'origine dell'embolo. I trombi cardiaci conseguenti a infarto del miocardio, malattia valvolare o fibrillazione atriale sono fra le sorgenti più comuni di emboli, come anche la frammentazione delle placche ateromasiche carotidee (tromboembolismi). I coaguli si distaccano dalle sedi di origine e vengono trasportati dal flusso sanguigno nei vasi cerebrali. Gli emboli generano poi un tipico fenomeno trombotico-occlusivo andandosi a incuneare all'altezza delle ramificazioni dei vasi o in aree di pregressa stenosi luminale. La regione di vascolarizzazione dell'arteria cerebrale media, diretta estensione dell'arteria carotidea interna, è la più frequentemente interessata da infarti embolici, l'incidenza dei quali è praticamente uguale nei due emisferi.

Il sangue è condotto al cervello dalle due arterie carotidi interne e dal sistema vertebro-basilare. Queste arterie confluiscono nel circolo di Willis, il quale si trova alla base del cranio e garantisce una continua e corretta perfusione cerebrale.

In funzione della diversa fisiopatologia è possibile distinguere due tipi di ischemia cerebrale:

1. l'ischemia globale, determinata dall'arresto completo e transitorio dell'apporto sanguigno all'interno del cervello;
2. l'ischemia focale, causata dalla diminuzione del flusso ematico in una regione limitata del tessuto nervoso, riferita alla sola zona di competenza del vaso occluso.

Nell'area ischemica si distinguono due zone: il *core* e la penombra. Il primo è il nucleo dell'ischemia focale caratterizzato da una drastica riduzione (85-90%) del flusso ematico e da una rapida insorgenza della morte delle cellule neuronali. Nel caso in cui il flusso non viene ripristinato in un tempo breve, a seconda della zona colpita, si può avere un danno irreversibile. La penombra, invece, è un'area intermedia posta tra il *core* e le regioni del cervello perfuse normalmente, in cui la riduzione del flusso ematico non supera il 60-65% grazie alla presenza di circoli collaterali. Nella penombra il danno cellulare si sviluppa lentamente, rendendo il tessuto più facilmente recuperabile mediante trattamento farmacologico.

1.1.2 – Modelli sperimentali di ischemia cerebrale

Lo sviluppo di numerosi modelli sperimentali di ischemia cerebrale focale ha consentito, negli ultimi venti anni, di migliorare la conoscenza sulla fisiopatologia dei meccanismi alla base del processo ischemico.

Modelli di ischemia cerebrale globale

Uno dei primi modelli utilizzati per indurre nell'animale un'ischemia di tipo globale è la decapitazione. Questa tecnica è stata utilizzata molti anni addietro per lo studio dei meccanismi biochimici ed i *pathways* molecolari alla base del processo di danno ischemico (Abe et al., 1983; Ikeda et al., 1986).

L'uso della "Neck tourniquet" si è protratto per molti anni (Siemkowicz & Gjedde 1980), ma a causa di una serie di fattori di complicazione, come la congestione delle vene e la compressione del nervo vago, determinava un'elevata variabilità di risultati.

La fibrillazione ventricolare è un'altra tecnica utilizzata per indurre negli animali da laboratorio un'ischemia cerebrale globale completa, generalmente nel tentativo di mimare una situazione clinica di arresto cardiaco (Berkowitz et al., 1991; Dean et al., 1987; Eleff et al., 1991; Koehler et al., 1983; Michael et al 1984; Safar et al., 1976).

Nel 1979 Pulsinelli e Brierley svilupparono nei ratti un modello d'ischemia globale reversibile, attraverso l'occlusione di quattro vasi (4-VO), ovvero le arterie carotidi comuni e le arterie vertebrali. Questa tecnica è efficace nel 50-70% degli animali operati, anche se gli effetti dell'ischemia sul cervello sono piuttosto variabili, a causa della presenza di microcircolazioni collaterali (Pulsinelli & Buchan 1988). In alternativa alla 4-VO, Eklof e Siesjo 1972 (a, b), idearono un modello d'ischemia cerebrale globale reversibile, che prevede l'occlusione bilaterale delle arterie carotidi comuni. Con questa metodica si può ottenere una riduzione completa del flusso sanguigno cerebrale nel gerbillo (Crockard et al., 1980; Kirino et al., 1982; Osbourne & Halsey, 1975), poiché la caratteristica anatomica di questa specie

animale è quella di avere un poligono di Willis incompleto per mancanza delle arterie comunicanti posteriori (Levine & Sohn 1969).

Modelli di ischemia cerebrale focale

La maggior parte dei modelli d'ischemia cerebrale focale prevede l'occlusione di uno dei maggiori vasi sanguigni cerebrali, l'arteria cerebrale media (MCA), in piccoli animali (Garcia et al., 1984; Hossmann et al., 1991) o in animali di grossa taglia (Bose et al., 1984; Symon et al., 1975). L'occlusione della MCA (MCAo) determina la riduzione del flusso cerebrale nello striato e nella corteccia, inoltre, il grado e la distribuzione della riduzione del flusso dipende dalla durata dell'occlusione, dal sito dell'occlusione lungo l'MCA e dalla quantità di vasi sanguigni collaterali. L'occlusione prossimale o distale della MCA può essere permanente o transitoria. Tamura et al., (1981) idearono un modello di MCAo permanente nei ratti, attraverso una craniotomia subtemporale. Questo modello determina un infarto cerebrale nell'area della corteccia e del caudatoputamen. Bederson et al., (1986) modificarono la tecnica descritta da Tamura, dimostrando come il sito preciso dell'occlusione e l'estensione della MCA, potrebbero influenzare i risultati neurologici e neuropatologici. Un'altra variazione di questo modello prevede, oltre all'occlusione dell'MCA, il blocco dell'arteria carotide comune ipsilaterale (Chan et al., 1993). L'occlusione della MCA è stata condotta sia mediante elettrocoagulazione (Mohamed et al., 1985; Takagi et al., 1995; Tamura et al., 1981 a; Tyson et al., 1984), sia tramite l'utilizzo di metodiche fotochimiche, ma entrambe le tecniche non consentono di effettuare la ri-perfusione del tessuto. In alternativa è stato proposto un metodo che determina la formazione di emboli, mediante l'inserimento di frammenti simili a coaguli di sangue all'interno delle carotidi (Kaneko et al., 1985; Kudo et

al., 1982; Clark et al., 1991; De Ley et al., 1989; Meyer et al., 1962), ma il principale svantaggio di questa tecnica risiede nella scarsa riproducibilità dell'area di infarto. Infine, un modello semplice e relativamente non invasivo di MCAo si basa sull'introduzione di un filamento di nylon nell'arteria carotide interna fino a bloccare l'origine dell'arteria cerebrale media (Koizumi et al., 1986; Longa et al., 1989). La possibilità di realizzare questo modello anche nel topo (Dalkara et al., 1995; Hattori et al., 2000) ha consentito e consente, mediante l'impiego di animali transgenici, di studiare il coinvolgimento di specifici geni nel danno/neuroprotezione (Chan et al., 1993; Eliasson et al., 1997; Huang et al., 1994; Iadecola et al., 2001a, b; Yang et al., 1994). In questo modello la riperfusione può essere facilmente eseguita estraendo lentamente il filamento.

1.1.3 – Meccanismi di danno neuronale

I principali meccanismi cellulari e molecolari alla base del danno da ischemia, dovuti ad una riduzione transitoria o permanente del flusso sanguigno cerebrale, possono essere così schematizzati:

- Disfunzioni energetiche e metaboliche
- Glutammato ed eccitotossicità
- Tossicità mitocondriale calcio-mediata e radicali liberi
- Morte cellulare

Disfunzioni energetiche e metaboliche

La produzione di energia nel tessuto cerebrale avviene esclusivamente attraverso il consumo di ossigeno e glucosio, quindi dipende essenzialmente dai processi della fosforilazione ossidativa. Durante l'insulto ischemico si ha una riduzione dell'apporto di questi substrati metabolici al tessuto con la conseguente caduta dei livelli energetici di adenosina 3-fosfato (ATP) nelle cellule nervose (Lipton, 1999; Folbergová et al., 1992; Sun et al., 1995). Inoltre, la diminuzione dei livelli di glucosio ed ossigeno, che implica un aumento della glicolisi anaerobica, determina anche un abbassamento del pH per la produzione di acido lattico. Queste condizioni non permettono alle cellule nervose di mantenere la loro integrità osmotica.

La diminuzione dei livelli di ATP determina:

1. una ridotta funzionalità delle pompe, in particolare della Na^+/K^+ ATPasi e, conseguentemente, dello scambiatore $\text{Ca}^{++}/\text{Na}^+$, fondamentali nel preservare le concentrazioni ioniche intra- ed extracellulari e quindi garantire il mantenimento del potenziale di membrana (Bonvento et al., 2002);
2. una ridotta funzionalità dei neurotrasportatori di membrana indispensabili per la ricaptazione dei neurotrasmettitori.

Glutammato ed eccitotossicità

Durante il fenomeno ischemico si ha una diminuita produzione di ATP necessaria per il corretto funzionamento della pompa Na^+/K^+ ATPasi, il potassio si accumula nello spazio

extracellulare e il gradiente del sodio, che guida il riassorbimento del glutammato, si riduce comportando un accumulo di tale amminoacido nello spazio sinaptico (Attwell et al., 1993; Madl & Burgesser, 1993; Rossi et al., 2000). La ridotta ricaptazione di glutammato associata al danno ischemico è evidente non solo nei neuroni, ma anche negli astrociti che svolgono un ruolo importante nel controllo delle concentrazioni extracellulari di questo amminoacido eccitatorio (Rossi et al., 2000). L'aumento del calcio intracellulare conseguente all'iperstimolazione dei recettori del glutammato di tipo N-metil-D-aspartato (NMDA), assume un ruolo fondamentale nell'insorgenza del danno ischemico (Silver & Erecinska, 1992). Oltre che attraverso l'attivazione dei recettori NMDA, l'aumento di calcio è dovuto all'apertura di canali al Ca^{2+} voltaggio-dipendenti di tipo L, alla stimolazione di recettori metabotropici (mGluR), all'inversione dello scambiatore $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ e al rilascio di calcio dai depositi intracellulari (Chen et al., 1997; Garcia et al., 2001; Limbrick et al., 2001; Wang et al., 2002).

Le proteine *scaffold* homer rivestono un ruolo fondamentale nella regolazione dei segnali intracellulari a livello delle sinapsi glutammatergiche. In particolare è stato dimostrato che tali molecole interagiscono con altre proteine *scaffold* (Shank e PSD-95) regolando così il traffico intracellulare ed il posizionamento dei recettori sulla membrana plasmatica, la struttura del citoscheletro, il rilascio di calcio, il rimodellamento dei dendriti e la distribuzione ed il segnale dei recettori mGlu di classe I, NMDA ed AMPA (Sala et al., 2001; Roche et al., 1999; Govek et al., 2004; Lu et al., 2007).

I recettori mGlu sono accoppiati a proteine G e mediante la formazione dell'inositolo 3-fosfato (IP_3) attivano i recettori per IP_3 con conseguente aumento dei livelli citosolici di calcio. La forma lunga di homer-1 (homer-1b/c) attraverso la formazione di dimeri permette il

legame di mGluR con i recettori per IP₃ facilitando così il meccanismo di rilascio del calcio dai depositi intracellulari. La forma corta di homer (homer-1a) agisce come “dominante negativo” non permettendo la formazione del complesso recettore mGlu-IP₃ inibendo così il rilascio di calcio glutammato-dipendente (Tu et al., 2008; Kammermeier et al., 2000; Kammermeier & Worley 2007; Kammermeier et al., 2008).

Nell'insorgenza del danno neuronale, il calcio riveste un ruolo importante attraverso l'attivazione di enzimi calcio-calmodulina dipendenti, come calpaine, fosfolipasi, endonucleasi ed ossido nitrico (NO) sintasi (NOS) (Dirnagl et al., 1999).

Le calpaine degradano le proteine che legano l'actina alla membrana plasmatica causando la perdita dell'ancoraggio del citoscheletro. La fosfolipasi A2 aumenta l'idrolisi dei fosfolipidi di membrana con conseguente rilascio di acido arachidonico. Quest'ultimo forma radicali liberi all'ossigeno (ROS) quando è sottoposto all'attacco enzimatico ossidativo da parte delle ciclossigenasi (COX) e delle lipossigenasi. L'attivazione di enzimi endonucleasici è responsabile della frammentazione del DNA osservata nei processi di morte cellulare. La NOS aumenta i livelli di nitrossido, responsabile della produzione di radicali liberi dell'azoto altamente reattivi e tossici per le cellule (Kondo et al., 1997).

Tossicità mitocondriale calcio-mediata e radicali liberi

L'accumulo di calcio intracellulare, in seguito all'insulto ischemico, determina gravi alterazioni a livello mitocondriale, con abbattimento del potenziale di membrana. Il disaccoppiamento del trasporto di elettroni dalla fosforilazione ossidativa causa l'inibizione della sintesi di ATP e il rilascio di elettroni ad alta energia che portano alla formazione di radicali liberi e rilascio del citocromo c (Cyt-c) dal mitocondrio (Green & Reed, 1998).

Nella cellula esistono una serie di sistemi di protezione contro i radicali liberi: di natura enzimatica, come la superossido dismutasi, la glutazione perossidasi e le catalasi, e di tipo non enzimatico, chiamati anche *scavengers* come il glutatione, l'acido ascorbico, il betacarotene, ecc. In condizioni di stress ossidativo, come quello osservato nell'ischemia cerebrale, questo sistema antiossidante endogeno non è in grado di neutralizzare le specie radicaliche. I radicali liberi dell'azoto e le specie reattive all'ossigeno reagiscono con proteine, DNA e lipidi, alterando la normale funzione di queste molecole e determinando la conseguente perdita dell'integrità delle cellule.

Le proteine vengono spesso modificate a livello di residui tiolici ed idrossilici, che potrebbero essere localizzati nel sito attivo della molecola. A livello del DNA i radicali interagiscono direttamente con la doppia elica modificando il normale appaiamento delle basi e causando, così, la rottura dell'elica. Nei lipidi, infine, i radicali interagiscono con il doppio legame presente prevalentemente negli acidi grassi polinsaturi dei fosfolipidi di membrana.

Morte cellulare

Le cellule del tessuto nervoso che sono compromesse da un'eccessiva attivazione dei recettori del glutammato, da un aumento del calcio intracellulare, dai radicali liberi e da un danno a livello mitocondriale, potrebbero andare incontro a morte cellulare sia per necrosi che per apoptosi. La decisione in parte dipende dalla natura, dall'intensità dello stimolo e dal tipo di cellule (Dirnagl et al., 1999). Il principale meccanismo di morte cellulare in seguito ad ischemia cerebrale è la necrosi, soprattutto a livello del core, mentre a livello della zona di penombra si osservano prevalentemente meccanismi di morte apoptotica (Lipton 1999).

La necrosi è caratterizzata da un rigonfiamento citoplasmatico dovuto alla perdita dell'integrità della membrana plasmatica, con la conseguente degradazione del citoscheletro, degli organelli e del nucleo. La cellula necrotica rilascia tutto il contenuto intracellulare nell'ambiente circostante instaurando così un processo infiammatorio.

Invece, l'apoptosi relativa all'alterazione della funzionalità mitocondriale dovuta al rilascio del Cyt-c è stata dimostrata nei neuroni dopo ischemia cerebrale focale (Green & Reed, 1998). Il Cyt-c, rilasciato dai mitocondri, si lega ad Apaf-1 e a dATP; in seguito interagisce con la pro-caspasi 9, formando un complesso proteico chiamato apoptosoma. Questo complesso attiva la pro-caspasi 9, la quale, a sua volta, cliva la pro-caspasi 3, attivandola (Green & Reed 1998). Inizia, così, la fase effettrice del processo apoptotico, che si conclude con la frammentazione del DNA ad opera di un'endonucleasi e la degradazione delle proteine intracellulari a causa dell'attività proteasica di enzimi attivati dalle caspasi.

1.1.4 – Ruolo della neuroinfiammazione nella fisiopatologia dell'ischemia cerebrale

Per molti anni, il sistema nervoso centrale è stato considerato un tessuto immuno-privilegiato, ovvero non suscettibile a processi infiammatori. Negli ultimi decenni è emerso come nel cervello possano manifestarsi reazioni infiammatorie in risposta a traumi, infezioni o patologie neurodegenerative (Lucas et al., 2006).

Nell'ischemia cerebrale, la flogosi è caratterizzata dall'accumulo di mediatori e di cellule infiammatorie; infatti, dati clinici e sperimentali hanno confermato che il cervello risponde ad un insulto ischemico con un prolungato processo infiammatorio caratterizzato da una rapida attivazione di cellule residenti (astrociti e microglia), rilascio di mediatori chimici

ed infiltrazione di cellule infiammatorie (neutrofili, linfociti, monociti/macrofagi e cellule dendritiche (Becker, 1998; Davies et al., 1998; Hallenbeck, 1996; Morioka et al., 1993; Zhang & Yenari, 2004).

Negli ultimi dieci anni, numerose evidenze sperimentali hanno dimostrato che il processo neuroinfiammatorio oltre ad avere un effetto dannoso per il cervello risulta importantissimo per la fase di recupero e di riparazione del tessuto danneggiato (Ceulemans et al., 2010).

Mediatori chimici della neuroinfiammazione

In condizioni basali, i diversi mediatori dell'infiammazione sono espressi in concentrazioni molto basse nel sistema nervoso centrale, ma la loro espressione aumenta rapidamente in risposta ad un danno o ad un'infezione.

In condizioni patologiche, come nell'ischemia cerebrale, la microglia e gli astrociti si attivano rapidamente. Nello stato attivo la microglia produce citochine, chemochine, metalloproteasi, nitrossido, radicali liberi e altri mediatori tossici che contribuiscono ad estendere il danno alle cellule vicine (Lakhan et al., 2009, Huang et al 2006, Wang et al., 2007).

Le citochine stimolano l'espressione di chemochine e molecole di adesione, le quali favoriscono l'adesione sull'endotelio vasale delle cellule infiammatorie e la loro successiva infiltrazione nel tessuto ischemico (Huang et al., 2006, Bajetto et al., 2001, Mennicken et al., 1999). In particolare, in seguito ad ischemia, si assiste ad un aumento della sintesi e del rilascio delle citochine proinfiammatorie IL-1 β , il TNF- α , e IL-6 da parte della microglia residente (Hossmann et al., 2006; Nilupul Perera et al., 2006; Lai & Todd, 2006).

L'interleuchina-1 (IL-1) è tra le principali citochine proinfiammatorie coinvolte in numerose condizioni patologiche come l'ischemia, l'epilessia e altre malattie a carattere neurodegenerativo. L'interleuchina-1 esiste in due isoforme IL-1 α e IL-1 β (Rothwell & Luheshi, 2000). È stata, inoltre, identificata una terza proteina appartenente a questa famiglia anche se con funzioni diametralmente opposte, l'antagonista competitivo del recettore per l'IL-1 (IL-1ra), che blocca l'azione della citochina (Dinarello, 1998).

L'IL-1 α e l'IL-1 β hanno un'elevata omologia nella loro sequenza amminoacidica, pur essendo il prodotto di due geni differenti. Esse sono sintetizzate come precursori proteici, la pro-IL-1 α è biologicamente attiva e viene clivata dalla calpaina per formare la proteina matura (Huisin et al., 2004). Invece, la pro-IL-1 β è biologicamente inattiva e, a seguito del clivaggio della sua estremità ammino-terminale, dà luogo alla citochina matura. Uno degli enzimi responsabili dell'attivazione della proteina è la caspasi-1, un tetramero composto da due subunità ad alto peso molecolare (20 KDa) e da due più piccole (10 KDa).

L'enzima è anche noto come "interleukin converting enzyme" (ICE), per la sua capacità di favorire la conversione della pro-IL-1 β nella citochina matura biologicamente attiva (Cerretti et al., 1992; Thornberry et al., 1992).

Diversi studi hanno dimostrato che l'IL-1 β svolge un ruolo cruciale nell'induzione e nella progressione del danno cerebrale da ischemia. La somministrazione sistemica o intracerebroventricolare del IL-1ra ricombinante riduce il danno ischemico di circa il 50% nel ratto (Mulcahy et al., 2003; Yang et al., 1997). Inoltre, nei topi in cui manca il gene per l'IL-1ra si ha un aumento del 70% del volume di infarto rispetto agli animali *wild-type* (Pinteaux et al., 2007). Anche la somministrazione di anticorpi anti-IL-1 β è risultata neuroprotettiva nei ratti. Infine, la somministrazione di inibitori per la caspasi-1 (Ac-YVAD.cmk), l'enzima

fondamentale per il processo di maturazione dell'IL-1 β , riduce il danno cerebrale prodotto da ischemia focale permanente (Rabuffetti et al., 2000) o transitoria (Hara et al., 1997). Similmente, in topi *knockout* per la caspasi-1 è stato dimostrato che tale enzima è fondamentale per lo sviluppo del danno ischemico (Friedlander & Yuan, 1998; Schielke et al., 1998). Ad oggi non è comunque completamente chiaro se la neuroprotezione indotta dall'inibizione della caspasi-1 sia mediata dalla riduzione di IL-1 β oppure dall'interazione con altri processi di morte cellulare. Infatti, ci sono studi che escludono il coinvolgimento della caspasi-1 nelle fasi precoci del danno da ischemia-riperfusion (Amantea et al., 2007).

Questo studio dimostra che nei ratti sottoposti ad MCAo transitoria l'aumento dell'espressione dell'IL-1 β non è associato con l'aumento dell'attività della caspasi-1. Inoltre, la produzione della citochina in seguito ad ischemia/riperfusion dipende dall'attività delle MMP. Infatti la somministrazione sistemica di un inibitore delle MMP, GM6001, riduce il processo di maturazione dell'IL-1 β (Amantea et al., 2007).

Entrambe le forme dell'IL-1 svolgono la loro azione attraverso il legame al recettore di tipo 1 (IL-1R1), il quale, associato con una proteina accessoria chiamata IL-1RAcP (*Receptor accessory protein*), promuove la formazione di un complesso di segnalazione intracellulare che porta all'attivazione di iKB chinasi (IKK) e, di conseguenza, all'attivazione delle vie di trasduzione delle *mitogen-activated protein Kinases* (MAPK). In particolare, è stato dimostrato che l'inattivazione o la delezione del gene che sintetizza per il recettore IL-1R1 diminuisce il danno causato da ipossia/ischemia e preserva le funzioni neurologiche (Basu et al., 2002).

Inoltre, IKK è capace di attivare fattori trascrizionali quali NF-kB e AP-1 (Activator protein 1) che promuovono la trascrizione di geni diversi, come citochine infiammatorie (IL-1

e IL-6), chemochine (CXCL8, CCL2), molecole di adesione endoteliale (E-selectine), molecole di adesione intracellulare (ICAM1), enzimi che producono molecole effettrici (NOS, COX2), molecole costimolatorie che attivano la risposta immunitaria (CD80) e alcuni tipi di metalloproteasi (Burns et al., 2003).

Un altro mediatore importante del processo infiammatorio associato all'ischemia è il TNF α (Tumour Necrosis Factor α). I livelli di TNF α sono aumentati notevolmente nel cervello in seguito ad ischemia, con *patterns* di espressione simili a quelli dell'IL-1 β . Il TNF α aumenta rapidamente in seguito ad un insulto ischemico (Liu et al., 1994; Murakami et al., 2005; Offner et al., 2006). L'espressione del TNF α è stata osservata inizialmente nei neuroni (Liu et al., 1994), ma successivamente anche nella microglia, negli astrociti e nelle cellule del sistema immunitario (Offner et al., 2006).

Tale citochina ha un duplice effetto sui neuroni: sia di tipo protettivo sia di tipo dannoso, questo è dovuto alla presenza di due distinti recettori, p55 e p75. Entrambe le isoforme recettoriali sono state rilevate nel sistema nervoso centrale.

Infatti, l'inibizione del TNF α riduce il danno ischemico cerebrale (Yang et al., 1998), mentre la somministrazione del TNF α ricombinante lo peggiora ulteriormente (Barone et al., 1997). Tuttavia, il TNF α , in alcune circostanze, protegge il cervello dall'ischemia, come dimostrato in topi *knockout* per i recettori del TNF α , nei quali si evidenzia un aumento dell'infarto cerebrale (Bruce et al., 1996).

Infine, l'interleuchina 6 (IL-6) è una citochina che svolge diverse funzioni nel sistema nervoso centrale, attraverso il suo recettore IL-6R può stimolare diversi *pathways* molecolari che inducono l'attivazione di specifici geni (Van Wagoner & Benveniste, 1999). In condizioni fisiologiche l'IL-6 è espressa nel cervello a basse concentrazioni; in seguito a danno

neuronale, i livelli della citochina aumentano notevolmente e questo permette all'IL-6 di indurre la sintesi di altri mediatori infiammatori, come l'IL-1, TNF α , prostaglandine (PG), IFN- γ e IL-4. Ma il ruolo dell'IL-6 come citochina pro-infiammatoria deve essere ancora chiarito, infatti topi *knockout* per l'IL-6 mostrano lo stesso volume di infarto di quelli *wild type* e questo suggerisce che essa non partecipa direttamente alla patogenesi dell'ischemia cerebrale (Clark et al., 2000).

Le chemochine sono una famiglia di piccoli polipeptidi di 8-10 kDa il cui ruolo principale è quello di regolare la migrazione dei leucociti in risposta ad uno stimolo infiammatorio (Emsley & Tyrrell, 2002). Numerosi dati dimostrano che in diversi modelli animali di ischemia cerebrale focale si ha un aumento dell'espressione di differenti chemochine (MCP-1, MIP-1 α , CINC) in seguito ad un insulto ischemico (Mennicken et al., 1999) e che la loro inibizione oppure silenziamento genico riduce il volume di infarto cerebrale (Garau et al., 2005).

Il processo di infiltrazione delle cellule infiammatorie nel parenchima cerebrale in seguito ad ischemia è mediato da differenti molecole di adesione (Sughrue et al., 2004), fra cui le selectine (P, E, L), la superfamiglia delle immunoglobuline (ICAM-1 e VCAM-1) e le integrine (CD11 a-c) (DeGraba et al., 1998; Emsley & Tyrrell, 2002). Differenti studi hanno dimostrato che inibendo l'adesione dei leucociti all'endotelio vascolare si riduce il danno neuronale ischemico (Clark et al., 1995 e 1997). Inoltre, animali *knockout* (KO) per le molecole di adesione hanno un ridotto volume di infarto cerebrale in seguito ad insulto ischemico (Connolly et al., 1997; Kitagawa et al., 1998, Soriano et al., 1999) (fig.1.1)

In numerose malattie neurodegenerative e nell'ischemia, le cellule attivate in seguito ad un danno rilasciano anche delle citochine antinfiammatorie come per esempio TGF- β

(Trasforming growth factor- β) e l'IL-10 che inibiscono l'espressione delle citochine proinfiammatorie e diminuiscono l'infiammazione favorendo il processo di riparazione del tessuto danneggiato (Wang et al., 2007; Vitkovic et al., 2001).

In realtà solo due dei cinque membri della famiglia del TGF- β sono importanti nell'ischemia cerebrale il TGF- β 1, prodotto prevalentemente dalla microglia e dai macrofagi anche se la sua espressione è rilevabile anche nei neuroni e nei linfociti T (Vitekovic et al., 2001, Liesz et al., 2009), ed il TGF- β 2 rilasciato prevalentemente dagli astrociti e dai neuroni (Stoll et al., 2004). Queste molecole sono importanti nel controllo di diversi processi cellulari in particolare la proliferazione, la differenziazione, l'apoptosi e la migrazione (Kim et al., 1996; Zhu et al., 2000). Dopo l'ischemia, i TGF- β 1/2 riducono l'attivazione microgliale, diminuiscono l'espressione e l'efficacia di altre citochine, sopprimono il rilascio di radicali liberi dell'ossigeno e dell'azoto, promuovono l'angiogenesi nella penombra ischemica, diminuiscono le dimensioni dell'edema riducendo l'aderenza dei neutrofili alle cellule endoteliali (Pantoni et al., 1998, Pang et al., 2001).

Infine, un'altra molecola antinfiammatoria rilasciata dalla microglia e dagli astrociti attivati in seguito ad un insulto ischemico è l'IL-10, la quale inibisce la produzione e l'espressione di citochine e dei loro recettori diminuendo così lo stato infiammatorio. Infatti, è stato dimostrato che la somministrazione dell'IL-10 riduce il danno dopo MCAo (Kadhim et al., 2008; Vitkovic et al., 2001; Wang et al., 2007).

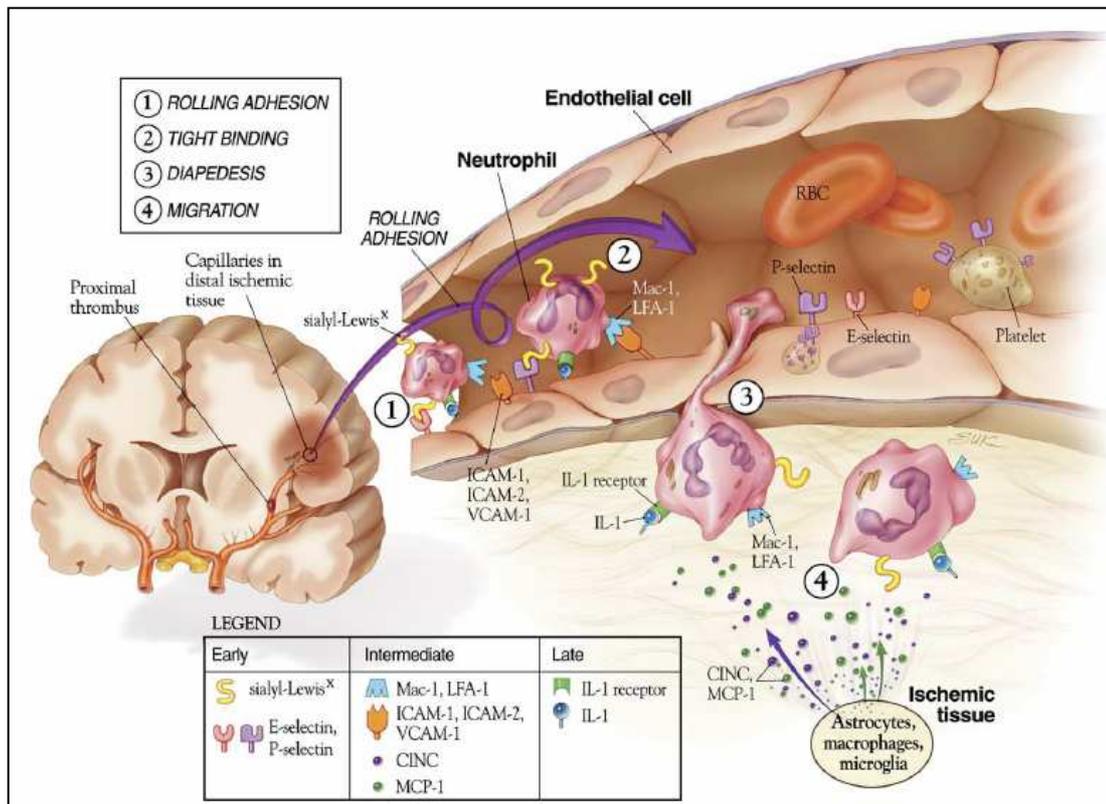


Fig. 1.1 – Rappresentazione dell’occlusione di un’arteria cerebrale da parte di un trombo e dell’attivazione della cascata infiammatoria. L’aumento dell’espressione della P-selectina e della E-selectina permette l’adesione e la diapedesi dei neutrofilii. L’ischemia determina il rilascio di IL-1 dalla microglia, dagli astrociti e dai macrofagi, stimolando l’espressione delle ICAM sulla superficie delle cellule endoteliali. I neutrofilii aumentano l’espressione delle integrine, Mac-I e LFA-1 che legandosi alle ICAM consentono l’infiltrazione di queste cellule nel parenchima cerebrale. (Huang et al., 2006)

Alcuni mediatori che si liberano durante il processo infiammatorio, fra cui citochine e chemochine, promuovono l’espressione e aumentano l’attività delle metalloproteasi della matrice (MMP). Tali enzimi prodotti dalle cellule microgliali, dagli astrociti o dai leucociti innescano una serie di reazioni che contribuiscono ulteriormente ad esacerbare la cascata neuroinfiammatoria (Yong, 2005). Diversi studi su modelli di ischemia cerebrale transitoria o permanente hanno dimostrato il ruolo delle MMP, delle gelatinasi (MMP-2 e MMP-9) in particolare, nel danno alla barriera emato-encefalica contribuendo così in maniera significativa alla formazione ed allo sviluppo dell’edema cerebrale e di emorragie (Romanic

et al., 1998; Rosenberg et al., 1998; Heo et al., 1999; Asahi et al., 2000). Il trattamento con inibitori o anticorpi neutralizzanti le MMP determina una diminuzione del volume di infarto e previene la distruzione della barriera emato-encefalica nei roditori, dopo occlusione transitoria o permanente dell'arteria cerebrale media (Romanic et al., 1998; Asahi et al., 2000; Gasche et al., 2001).

Inoltre, le MMP possono interagire direttamente con fattori di crescita, recettori per fattori di crescita, chemochine, TNF α , IL-1 β , NO e radicali liberi dell'ossigeno, modulando diversi fenomeni biologici che comprendono la neurotossicità, la sopravvivenza, la crescita o la rigenerazione cellulare. Per esempio il TNF α viene sintetizzato sotto forma di precursore che può essere clivato e attivato dalle MMP (Yong, 2005). Invece, l'IL-1 β può essere sia attivata che degradata dal taglio proteolitico di questi enzimi (Ito et al., 1996).

Il principale meccanismo di regolazione delle MMP è mediato dagli inibitori tissutali endogeni (TIMP), di cui se ne conoscono 4 tipi (TIMP-1-4). Oltre alla loro azione di regolazione dell'attività delle MMP, i TIMP regolano altri importanti meccanismi cellulari come la proliferazione e l'apoptosi, ma anche processi di angiogenesi e rimodellamento della matrice extracellulare. Recenti lavori hanno descritto l'importanza dei TIMP e delle MMP nella regolazione della morte neuronale attraverso la modulazione dell'eccitotossicità (Jourquin et al., 2003), dell'attività delle calpaine (Copin et al., 2005), dell'attivazione dei recettori di morte (Wetzel et al., 2003), della biodisponibilità dei fattori neurotrofici (Lee et al., 2001) e della formazione di sostanze neurotossiche (Gu et al., 2002). In particolare, nell'ischemia cerebrale, le MMP sono coinvolte nella maturazione dell'IL-1beta (Amantea et al. 2007) e più di recente è emerso che possono anche partecipare direttamente all'induzione della morte neuronale attraverso la degradazione di PARP-1 (Yang et al., 2010)

Ruolo delle cellule infiammatorie

Il processo infiammatorio nell'ischemia cerebrale, come dimostrano numerosi esperimenti sia su modelli animali (Somera-Molina et al., 2009) che su pazienti è caratterizzato da una rapida attivazione delle cellule residenti (microglia ed astrociti) con una successiva infiltrazione di cellule infiammatorie circolanti che includono neutrofili, linfociti T, monociti/macrofagi ed altri tipi cellulari.

La microglia rappresenta il 5-20% delle cellule gliali totali rappresenta il tipo cellulare principalmente coinvolto nella risposta immunitaria del cervello (Zhang et al., 1997; Schubert et al., 2000). Queste cellule, nella fase quiescente, sono caratterizzate da un piccolo soma e da peduncoli che si dipartono dal corpo cellulare (Frank-Cannon 2009; Lai et al., 2006; Neumann et al., 2006), una volta attivate assumono una morfologia ameboide simile a quella dei macrofagi (Wang et al., 2007; Lai et al., 2006; Basu et al., 2002).

Evidenze sperimentali hanno dimostrato che la microglia residente è attivata da una serie di mediatori chimici rilasciati dalla necrosi neuronale (per esempio ATP). Infatti, dopo l'insulto ischemico si ha un aumento dei livelli extracellulari di ATP nel parenchima cerebrale dovuto alla depolarizzazione neuronale ed alla permeazione della membrana plasmatica (Melani et al., 2005; Schock et al., 2007; Burnstock et al., 2008). L'ATP viene anche rilasciata dalle cellule endoteliali e dalle cellule infiltranti che invadono il tessuto danneggiato. L'eccesso di ATP attiva i recettori P2X7 presenti sulla microglia con ulteriore rilascio di molecole proinfiammatorie (Iadecola & Anrather del 2011).

Queste cellule attivate rilasciano ROS, IL-1 β , TNF- α , IL-6 e MMP-9 potenziando la risposta infiammatoria, aumentando l'infiltrazione di leucociti circolanti ed un maggiore danno all'integrità della BEE (Christov et al., 2004).

Dati recenti hanno dimostrato che durante l'ischemia l'attivazione della microglia può essere benefica (Gary et al., 1998; Bruce et al., 1996; Sharp et al 2000; Kim et al., 1996). Il possibile ruolo neuroprotettivo della microglia sembra essere dovuto alla capacità di tali cellule di eliminare una serie di eccitotossine dallo spazio sinaptico e di fagocitare i neutrofilo circolanti (Rothwell et al., 2000). Queste cellule rilasciano anche una serie di molecole (fattori di crescita, neurotrofine, TGF- β 1) che facilitano il processo di recupero del tessuto ischemico danneggiato promuovendo la sopravvivenza delle cellule nervose (Gary et al., 1998; Bruce et al., 1996; Sharp et al 2000; Kim et al., 1996).

Le altre cellule della glia attivate dopo insulto ischemico sono gli astrociti, che svolgono attività di sostegno e di regolazione del sistema nervoso centrale. L'attivazione degli astrociti prende il nome di astrogliosi, durante la quale abbiamo il rilascio di una serie di molecole proinfiammatorie (ROS, proteasi, NOS) che potenziano la risposta flogistica causata dall'ischemia (Kaushal & Schlichter, 2008; Denes et al., 2007, 2009; Weston et al., 2007; Ekdahl et al. 2009).

Recenti studi hanno dimostrato che gli astrociti perivascolari rappresentano il primo elemento cellulare a rispondere all'ischemia. Queste cellule riescono a modulare il flusso ematico cerebrale locale e addirittura, durante le fasi precoci, tentano di recuperare il tessuto. Infatti, gli astrociti perivascolari sono in diretto contatto, mediante i loro processi, con le cellule endoteliali, i periciti che ricoprono la superficie dei vasi ed i neuroni. Queste cellule possono regolare il flusso ed il diametro dei vasi mediante il rilascio di specifici mediatori chimici come le prostaglandine (PGE), il nitrossido (NO) l'acido arachidonico (AA) ed ATP (Zierath et al., 2010; Pradillo et al., 2005) e rispondere così all'esigenze metaboliche del tessuto nervoso.

L'astrogliosi inizia 10 minuti dopo l'occlusione dell'arteria e dura fino a 4 giorni dall'insulto (Zhu et al., 2000). Come vedremo successivamente, queste cellule partecipano anche al rilascio di molecole che aiutano il processo di recupero del tessuto danneggiato e contribuiscono alla sopravvivenza neuronale (Nowicka et al., 2008; Petty & Lo 2002). Dopo l'attivazione delle cellule della glia, durante il fenomeno ischemico si verifica un'intensa infiltrazione di leucociti in particolare di neutrofili, macrofagi e linfociti T. Nel processo ischemico transitorio i neutrofili raggiungono il tessuto ischemico dopo 5 h di riperfusione (Nilupul Perera et al., 2006), mentre nell'MCAo permanente si ha un picco a 12 h dall'insulto ischemico (Kim et al., 1996).

Queste cellule attraversano l'endotelio vasale mediante le molecole di adesione ed un cambiamento repentino della loro morfologia (alterazioni citoscheletriche) con la conseguente diapedesi finale (Huang et al., 2006). Una volta raggiunto il sito dell'infiammazione rilasciano una serie di mediatori tra cui citochine, MMP e proteasi che potenziano la risposta infiammatoria (Huang et al., 2006; Bajetto et al., 2001). Inoltre il rilascio di queste molecole, in particolare di enzimi proteolitici, potenzia il danno alla BEE e contribuisce alla formazione dell'edema post-ischemico. Infatti, l'inibizione dell'attività di questi enzimi migliora la sopravvivenza neuronale in modelli sperimentali di ischemia cerebrale (Wang et al., 2007; Beech et al., 2001)

L'utilizzo di specifici anticorpi contro le molecole di adesione (ICAM-1, P-selectina, CD11b/CD18) diminuisce il volume di infarto cerebrale, la dimensione dell'edema e riduce il deficit neurologico in modelli animali di ischemia cerebrale (Meisel et al., 2005; Kris & Lalancette-Hebert, 2009; Candelario-Jalil et al., 2009; Durukan et al., 2007; Kadhim et al

2008, Barone et al., 1999; Chu et al., 2006; Sughrue et al., 2004; Ginsberg et al., 2008; Gregersen et al., 2000).

Infine, numerosi studi confermano che anche i linfociti T sono coinvolti nella patogenesi dell'ischemia (Lambertsen et al., 2009; Pettigrew et al., 2008; Clausen et al., 2008). In particolare analisi citofluorometriche hanno evidenziato un aumento di queste cellule nel tessuto cerebrale dei topi ischemici dopo 3 giorni dall'inizio dell'occlusione dell'MCA (Clausen et al., 2008), anche se studi recentemente condotti su ratti hanno dimostrato un aumento dell'infiltrazione di queste cellule già a 24 h dall'insulto potenziando ulteriormente la risposta infiammatoria (Clark et al., 2008; Brabers & Nottet 2006). È interessante notare come la sottopopolazione dei linfociti T regolatori è invece coinvolta nelle fasi riparative del danno ischemico (Liesz et al., 2009).

L'attivazione della risposta infiammatoria sia locale che sistemica è pertanto cruciale nell'evoluzione del danno cerebrale ischemico. L'equilibrio che si instaura fra i vari mediatori solubili e cellulari è fondamentale sia per l'induzione di risposte dannose, ma anche per lo sviluppo della fase risolutiva e di quella riparativa tardiva.

1.2 RUOLO DELL'ASTROGLIA NELLA NEUROPROTEZIONE

1.2.1 - Morfologia e struttura degli astrociti

Gli astrociti sono un'importante classe di cellule, dotate di prolungamenti lunghi e sottili che si irradiano dal corpo cellulare in tutte le direzioni. In base alla loro morfologia queste cellule si differenziano in astrociti fibrosi, formati da un numero ridotto di processi lunghi e molto estesi, e astrociti protoplasmatici, caratterizzati invece da un'elevata quantità di processi piccoli che si dipartono dal soma cellulare (Panickar & Norenberg, 2005).

Gli astrociti fibrosi si trovano prevalentemente nella sostanza grigia, mentre quelli protoplasmatici sono localizzati nella sostanza bianca del cervello. Gli astrociti contengono una serie di filamenti proteici citoplasmatici (90-100 Å) in particolare la proteina GFAP (glial fibrillary acidic protein) (Bignami et al., 1972; Eng et al., 1972, 2000), che insieme ad altre proteine formano la struttura citoscheletrica di queste cellule.

Li ha descritti per la prima volta Rudolf Virchow, nel 1946, e da allora, per più di un secolo, sono stati considerati quasi esclusivamente elementi di sostegno, come un'impalcatura tridimensionale che accoglie i neuroni. Le ricerche condotte negli ultimi decenni hanno clamorosamente smentito questa visione riduttiva, rivalutando il ruolo essenziale che queste cellule ricoprono nel funzionamento del cervello.

Gli astrociti sono cellule territoriali ed i loro processi si estendono alle cellule adiacenti formando dei veri e propri domini di strutture anatomiche organizzate, (Halassa et al., 2007; Oberheim et al., 2009; Nedergaard et al., 2003), le quali sono interconnesse tra di loro mediante le *gap junctions* a formare una rete sinciziale (Rouach et al., 2004).

Bushong et al., (2002) hanno calcolato che la superficie occupata da un astrocita è di circa $66.000 \mu\text{m}^3$; mettendo in relazione il loro studio con quello di Kirov et al. (1999) è emerso che un singolo astrocita può entrare in contatto con circa 140.000 sinapsi, illustrando così la straordinaria capacità di queste cellule di modulare l'attività neuronale. Da un punto di vista anatomico, i prolungamenti astrocitari separano fisicamente le cellule nervose dalla parete dei vasi sanguigni, ricoprendo quest'ultima con espansioni a forma di pedicelli (Kacem et al., 1998; Iadecola & Nedergaard, 2007); in questo modo contribuiscono alla formazione della BEE, che seleziona le sostanze autorizzate a passare dal sangue al cervello. I processi astrocitari si estendono fino a raggiungere le sinapsi, dove, gli unici spazi lasciati liberi dall'avvolgimento astrocitario sono quelli relativi ai contatti sinaptici, in modo che le molecole di neurotrasmettitori possano agire selettivamente su porzioni limitate della membrana cellulare. Gli astrociti esprimono sulla loro superficie un elevato numero di recettori per neurotrasmettitori, citochine e fattori di crescita, ma anche trasportatori e canali ionici (Gadea & Lopez-Colome, 2001; Danbolt et al., 2001; Huszti et al., 1998; Porter & McCarthy, 1997; Verkhratsky et al., 2000; John et al., 2003; Kacem et al., 1998).

Quindi, queste cellule sono capaci di rispondere ai vari neurotrasmettitori mediante l'aumento di calcio intracellulare (Ca^{++}), formando delle vere e proprie onde di Ca^{++} che si diffondono agli altri astrociti mediante la rete sinciziale (Cornell-Bell et al., 1990; Wang et al., 2006). Tale fenomeno oltre a portare modificazioni strutturali e funzionali, a breve ed a lungo termine, come modificazioni del citoscheletro, dell'attività enzimatica e del differenziamento, permette il rilascio di una serie di molecole dalle cellule (gliotrasmettitori) come, per esempio, il glutammato, la D-serina e l'ATP che possono modulare l'attività

sinaptica e l'eccitabilità neuronale. Questo processo viene oggi chiamato gliotrasmissione (Bélanger et al., 2009).

1.2.2 - Biologia funzionale degli astrociti

Gli astrociti non si limitano solo a definire la geometria con cui i neuroni devono venire a contatto, ma risultano fondamentali anche nel modulare l'attività funzionale e mantenere l'omeostasi delle cellule nervose (fig. 1.2). In particolare, gli astrociti esprimono sui loro processi una serie di trasportatori per vari neurotrasmettitori e neuromodulatori incluso il glutammato, l'acido- γ -ammino butirrico (GABA), la glicina e l'istamina (Gadea et al., 2001; Danbolt et al., 2001; Huszti et al., 1998).

Tali trasportatori partecipano alla rapida rimozione di questi neurotrasmettitori rilasciati nello spazio sinaptico in modo da garantire la giusta funzionalità neuronale. Numerosi studi in *vitro* ed in *vivo* dimostrano che la regolazione dei livelli extracellulari di glutammato deve essere finemente regolata in modo da evitare fenomeni di eccitotossicità che possono condurre le cellule a morte (Rosenberg & Aizenman, 1989; Selkirk et al., 2005; Rothstein et al., 1993). Gli astrociti partecipano attivamente alla ricaptazione del glutammato esprimendo sui i loro processi trasportatori sodio-dipendenti ad elevata affinità come GLT-1, GLAST, EAAC1 e EAAT4 (Danbolt et al., 2001)

Queste cellule oltre a garantire il normale funzionamento delle sinapsi mediante la rimozione ed il rilascio di molecole biologicamente attive partecipano anche all'eliminazione degli ioni in eccesso, in particolare potassio (K^+), mediante canali selettivi e all'azione della pompa Na^+/K^+ ATPasi (Kofuji & Newman 2004; D'Ambrosio et al., 2002). Gli ioni

potrebbero accumularsi negli spazi intercellulari come conseguenza dell'attività elettrica dei neuroni e potrebbero risultare potenzialmente tossici per i neuroni stessi, alterando il normale potenziale di membrana (Walz et al., 2000). Gli astrociti sono collegati fra loro tramite i canali microscopici delle *gap junctions* che formano una rete sinciziale e permettono di diluire gli ioni che vengono captati dall'ambiente extracellulare. Il suddetto meccanismo viene definito "*spatial buffering*" (Holthoff et al., 2000; D'Ambrosio et al., 2002).

Un'altra importante funzione degli astrociti è quella di riserva di glucosio sotto forma di glicogeno. Infatti, il glicogeno nel sistema nervoso centrale è conservato solo negli astrociti come riserva energetica per i neuroni stessi (Magistretti, 2008; Sokoloff et al., 1999; Drake et al., 2007). Anche se è stato dimostrato che anche i neuroni possiedono gli enzimi per la sintesi del glicogeno, la loro attività è repressa (Vilchez et al., 2007) perché il glicogeno è potenzialmente tossico per queste cellule (Swanson et al., 1992; Brown et al., 2003).

Negli astrociti il glicogeno viene rapidamente rimosso in risposta ad un'attività neuronale e viene rilasciato nello spazio extracellulare sotto forma di lattato, il quale può essere utilizzato dagli stessi neuroni per la produzione di energia (Brown et al., 2003, 2005, 2007).

Queste cellule nervose sono molto importanti per il mantenimento del pH nel microambiente cerebrale (Deitmer et al., 1996 e 2002; Obara et al., 2008) e quindi per garantire una serie di processi come il metabolismo energetico, la conduttanza di membrana e l'eccitabilità neuronale (Deitmer et al., 1996; Obara et al., 2008).

Infine, gli astrociti rivestono un ruolo fondamentale nella protezione dei neuroni contro lo stress ossidativo mediante l'elevata produzione di molecole antiossidanti (glutazione, ascorbato, vitamina E) e di enzimi con elevata attività antiossidante (glutazione s-

transferasi, glutatione perossidasi e catalasi) (Wilson et al., 1997; Desagher et al., 1996; Makar et al., 1994; Huang & Philbert, 1995; Bolanos et al., 1995).

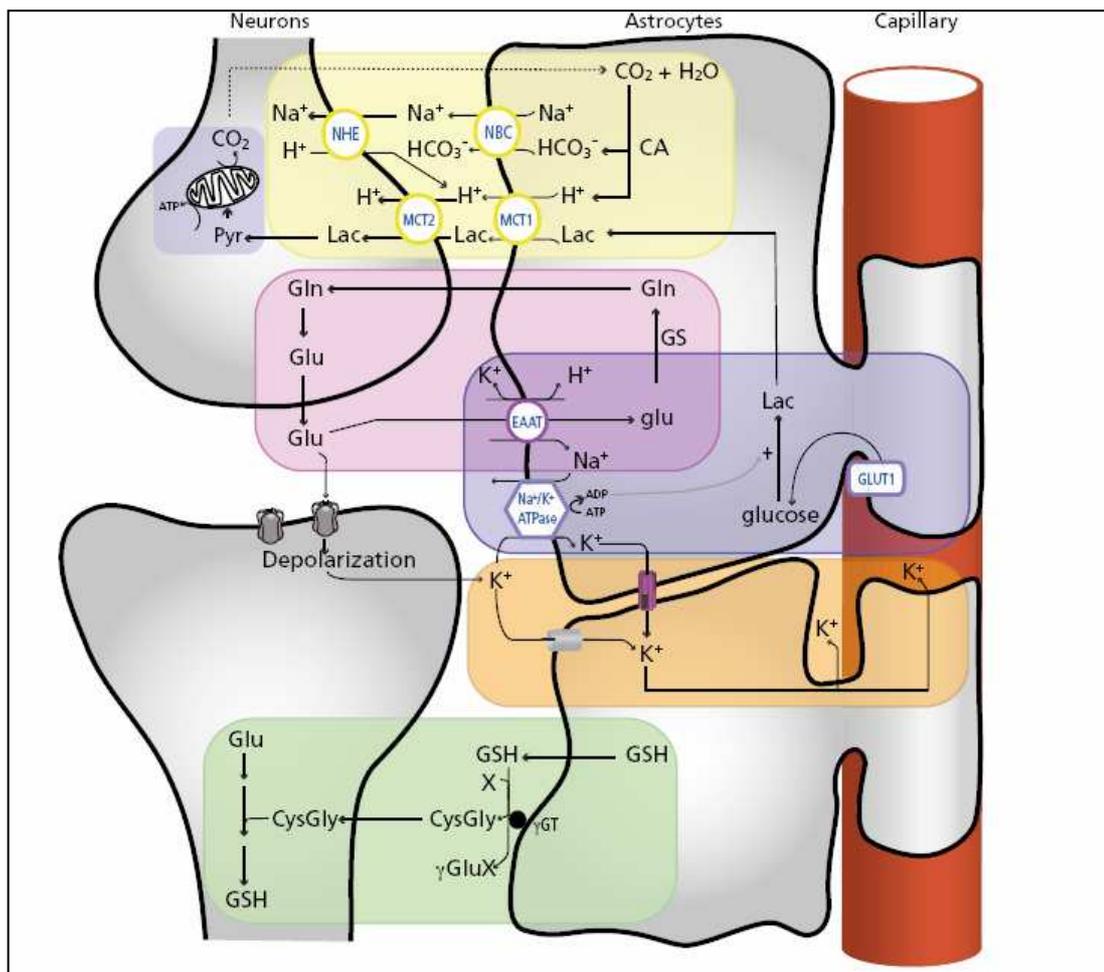


Fig. 1.2 – Rappresentazione schematica dei meccanismi principali di regolazione dell'omeostasi cerebrale da parte degli astrociti. Nel *box rosa* è rappresentato il ciclo glutammato-glutammina e la presenza di trasportatori EAATs per il glutammato responsabili della ricaptazione di questo neurotrasportatore.

Il *Box blu* rappresenta il ciclo del lattato che viene prodotto negli astrociti a partire dal glucosio e poi viene rilasciato nello spazio sinaptico e ricaptato dai neuroni mediante i trasportatori monocarbossilasi (MCT-1 e MCT-2).

Il *Box giallo* mostra come gli astrociti possono modulare il pH mediante la conversione della CO_2 in ioni H^+ e HCO_3^- attraverso l'enzima anidrasi carbonica (CA).

Il *Box arancione* evidenzia che gli astrociti rimuovono l'eccesso di potassio modulando l'eccitabilità neuronale. Il *Box verde* rappresenta il metabolismo del glutatione (Bèlanger & Magistretti 2009)

1.2.3 – Ruolo degli astrociti reattivi nella neuroinfiammazione e nella patogenesi dell'ischemia cerebrale

Oltre ad espletare funzioni fisiologiche, cioè necessarie al normale funzionamento del sistema nervoso centrale, gli astrociti si attivano anche quando si verifica una lesione.

In caso di trauma, ischemia ed in alcune patologie neurodegenerative (Sofroniew, 2005), alcuni astrociti mostrano un'alterata espressione genica, ipertrofia e proliferazione (Ridet et al., 1997). Inoltre tali cellule modificano la loro struttura citoscheletrica, aumentano la sintesi di molecole come GFAP, vimentina e nestina (Petito et al., 1990; Schmidt-Kastner et al., 1990). Questo processo viene oggi definito con il nome di gliosi reattiva.

Gli astrociti attivati rilasciano una serie di mediatori chimici come citochine, chemochine, ROS e fattori di crescita che contribuiscono a potenziare la risposta infiammatoria ed eventuali processi riparativi (Farina et al., 2007; Sofroniew et al., 2005). Inoltre queste cellule circondano l'area lesionata mediante un fenomeno chiamato "cicatrice gliale" che in passato veniva considerata dannosa poiché non permette l'arrivo di stanze trofiche e la rigenerazione di nuovi prolungamenti nervosi che vanno a sostituire quelli danneggiati (Sofroniew et al., 2005). Al contrario, mediante tecniche di genetica molecolare è stato possibile dimostrare che la diminuita proliferazione di astrociti reattivi porta alla mancata formazione della cicatrice gliale e ad un aumento del danno tissutale associato ad un aumento di cellule infiammatorie infiltranti con successiva perdita della capacità rigenerativa della BEE e di attivare la riparazione dei tessuti danneggiati (Sofroniew et al., 2005).

Durante un insulto ischemico, gli astrociti attivati rilasciano una serie di molecole come IL-1 β , il TNF α , IL-6, IL-10 e TGF- β che, come abbiamo visto già precedentemente, possono avere un duplice ruolo, sia di tipo dannoso potenziando la risposta infiammatoria e

l'infiltrazione di leucociti, sia di riparazione e protezione del tessuto danneggiato (Sofroniew et al., 2005). Infatti, gli astrociti partecipano in maniera evidente alla riparazione ed alla protezione del tessuto in seguito ad un danno mediante la ricaptazione del glutammato, il rilascio di fattori trofici, l'eliminazione dei ROS e partecipano insieme alle cellule endoteliali all'integrità della BEE.

Inoltre, diversi studi recenti hanno dimostrato che *in vitro* gli astrociti sono capaci di inattivare la microglia mediante il rilascio del TGF- β esercitando quindi un controllo a *feedback* negativo su queste cellule (Hailer et al., 2001; Min et al., 2006). Nonostante tutta questa complessa serie di eventi, l'astrogliosi reattiva è un processo cellulare ben conservato, ma la sua funzione ancora non è stata ben caratterizzata. Numerose evidenze sperimentali hanno dimostrato che gli astrociti, grazie alla loro capacità di produzione di fattori trofici, regolazione del metabolismo energetico, dell'omeostasi ionica, della neurogenesi e dell'angiogenesi, hanno un ruolo importantissimo nella fisiopatologia dell'ischemia cerebrale (Nedergaard & Dirnagl 2005).

Durante l'ischemia cerebrale focale è stato dimostrato che nella zona del *core* ischemico si ha un'elevata mortalità cellulare, mentre nella penombra gli astrociti sembrano essere più resistenti dei neuroni alla diminuzione di ossigeno (Chesler et al., 2005). La sopravvivenza neuronale nella penombra ischemica è fortemente condizionata dal funzionamento delle cellule astrocitarie (fig. 1.3). Inoltre, l'attivazione degli astrociti porta ad un aumento dell'espressione di GFAP che sembra avere un ruolo importante nel processo ischemico. In particolare è stato dimostrato che topi GFAP knockout in un modello di ischemia cerebrale transitoria hanno un maggiore volume di infarto corticale ed un'aumentata pressione intracranica (Nawashiro et al., 2000, 2002). Il ruolo protettivo degli astrociti reattivi

nello stroke è stato ben documentato da Li et al., (2008). In condizioni ischemiche, l'attivazione della via di trasduzione di STAT-3 negli astrociti è alla base degli effetti neuroprotettivi delle citochine che agiscono sul recettore gp130, lo stesso meccanismo molecolare utilizzato dal recettore della leptina ObR (Baumann et al., 1996; Choi et al. 2003b;). Inoltre, nel preconditioning ischemico, si ha un'elevata attivazione del fattore di trascrizione STAT-3 negli astrociti con effetti benefici sul danno ischemico (Kim et al., 2004). I livelli fisiologici di STAT-3 negli astrociti sono molto bassi ed aumentano solo inseguito all'insorgenza di un processo infiammatorio come avviene nello stroke (DiNapoli et al., 2010).

In conclusione, in contrasto con quanto si pensava in passato, recenti dati sperimentali hanno documentato un possibile ruolo neuroprotettivo dell'astrogliosi reattiva, la quale contribuisce alla riparazione del tessuto danneggiato (Liberto et al., 2004; Sofroniew et al., 2005; Chen et al., 2003; Dirnagl et al., 2005). La capacità di queste cellule nervose di reagire in seguito ad un danno cerebrale e di attivare una serie di meccanismi per proteggere e riparare il tessuto lesionato apre interessanti scenari per l'identificazione di nuovi *targets* farmacologici.

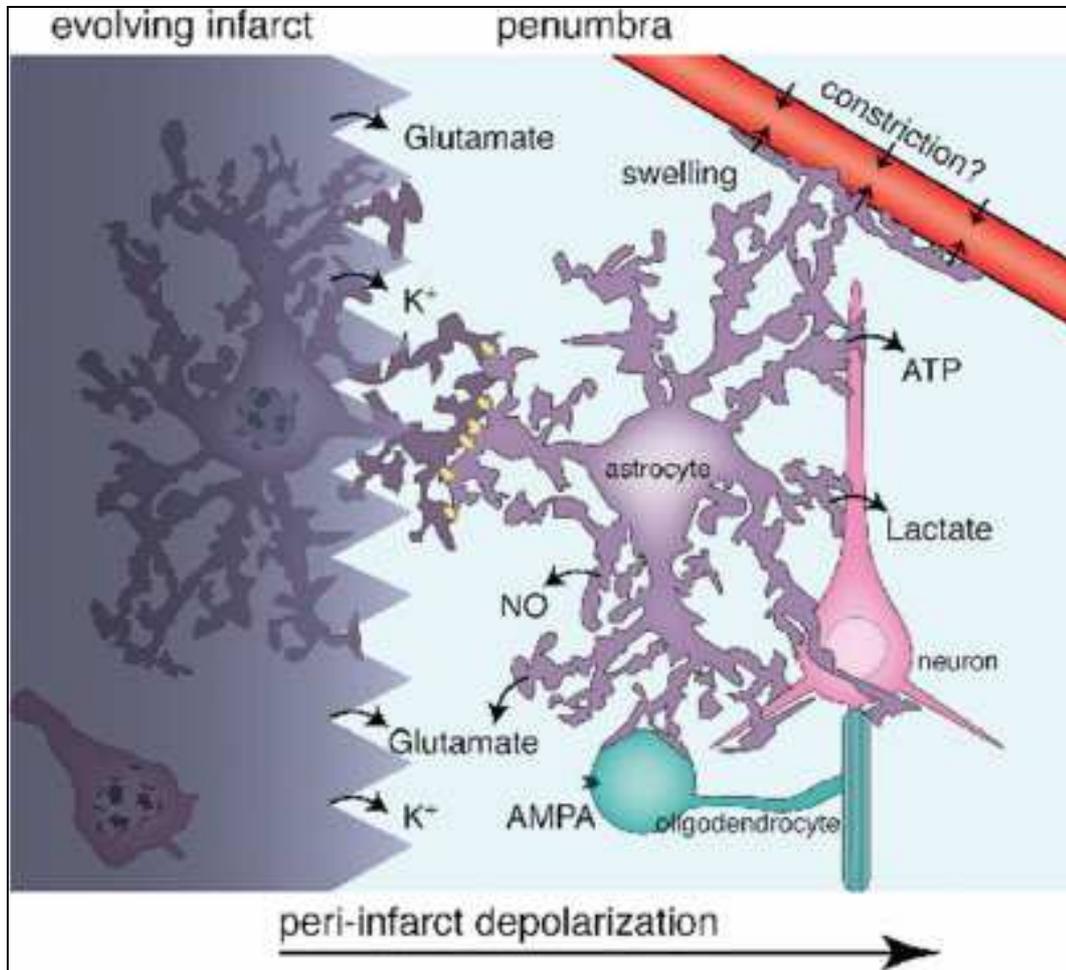


Fig 1.3 – Modello schematico del ruolo dell’astrocita nel danno ischemico. La sopravvivenza dei neuroni è fortemente condizionata dal corretto funzionamento dell’astrocita nel recupero del glutammato, nel controllo dell’omeostasi ionica, nel metabolismo energetico e nel rilascio di fattori trofici. (Needergard 2005)

1.3 - EFFETTI BIOLOGICI DELLA LEPTINA

1.3.1 – Sintesi e funzioni della leptina

L'ormone leptina è stato originariamente scoperto nel 1994 per la sua importanza nella regolazione omeostatica del peso corporeo (Halaas et al., 1995). Tale proteina di 16 kDa è codificata dal gene *ob* (obese), sintetizzata principalmente nel tessuto adiposo ed è stata inizialmente collegata all'obesità per la sua capacità di regolare la massa corporea attraverso l'inibizione dell'appetito (Halaas et al., 1996; Pelleymounter et al., 1995).

L'adipochina, dopo essere rilasciata dalle cellule del tessuto adiposo nel sangue, raggiunge facilmente il cervello superando la barriera ematoencefalica (BEE), fino a concentrazioni pari a 7nM (12 ng/ml) nel liquido cerebro spinale (Kurrimbux et al 2004).

Nell'ipotalamo la leptina regola il consumo delle riserve energetiche dell'organismo modulando il sistema neuroendocrino (Ahima et al., 1996; Lord et al., 1998) (fig. 1.4). Dunque, bassi livelli di leptina circolanti nel sangue aumentano l'appetito e diminuiscono l'utilizzo delle riserve energetiche.

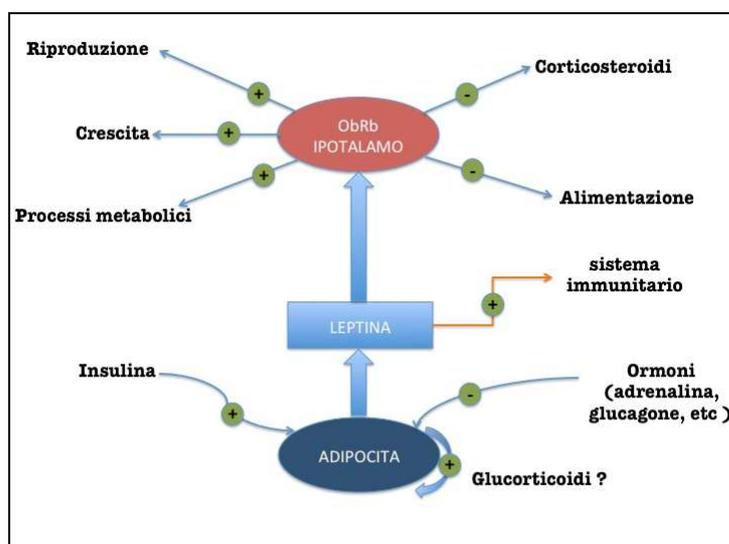


Fig. 1.4 - La leptina controlla le riserve energetiche dell'organismo mediante l'ipotalamo ed il sistema neuroendocrino.

La produzione della leptina negli adipociti è regolata da diversi indicatori dello stato nutrizionale dell'organismo come l'insulina, l'adrenalina, il glucagone ed ormoni della crescita. L'adipochina svolge le sue funzioni neuroendocrine mediante l'attivazione dei suoi recettori ObR presenti nell'ipotalamo.

Numerosi studi hanno dimostrato che l'incapacità di produrre leptina e la perdita della funzionalità dei suoi recettori determina obesità e complicazioni metaboliche (Ceddia et al., 2002) nei roditori. Inoltre, nei soggetti obesi, l'aumento della massa grassa è correlata con l'aumento dei livelli plasmatici della leptina (Considine et al., 1996) ed allo sviluppo della resistenza all'insulina (Tartaglia et al., 1995).

Oltre che nel tessuto adiposo, la leptina viene sintetizzata anche in altri tessuti ed organi. Questi includono la placenta e il feto (Hoggard et al., 1997), il muscolo scheletrico (Wang et al., 1998), il cuore (Purdham et al., 2004) e lo stomaco (Bado et al., 1998). Ci sono diverse evidenze secondo cui la leptina viene sintetizzata nello stesso cervello. Infatti, nei ratti, le regioni cerebrali che contengono elevati livelli di recettori per la leptina presentano nelle cellule neuronali anche l'mRNA della adipochina e la stessa proteina (Maresh et al., 2001). Rimane ancora da determinare se la leptina prodotta nel cervello sia funzionalmente indipendente da quella prodotta in periferia.

Oltre al suo ruolo nella regolazione dello stato energetico e nell'assunzione di cibo, questa proteina svolge numerosi altri effetti biologici significativi sulla riproduzione (Fujioka et al., 1999), sulla termogenesi (Hwa et al., 1996), sulla plasticità sinaptica (Shanley et al., 2001). In aggiunta, esperimenti *in vivo* e *in vitro* evidenziano anche una potente attività angiogenica (Sierra-Honigmann et al., 1998). L'espressione delle diverse isoforme dei recettori della leptina (Ob-R) è stata descritta in varie regioni cerebrali extraipotalamiche, tra cui la neocorteccia e l'ippocampo. Essa facilita i meccanismi di apprendimento e memoria nell'ippocampo (Shanley et al., 2001; Li et al., 2002), ed ha azione neurotrofica durante lo sviluppo della corteccia cerebrale.

Recentemente, è stato dimostrato che questa adipochina ha attività neuroprotettiva ed

antiapoptotica in diverse aree cerebrali rallentando così i processi neurodegenerativi (Weng et al., 2007; Zhang et al., 2007). Tali evidenze hanno posto le basi per un suo potenziale utilizzo come trattamento terapeutico dell'ischemia cerebrale e di patologie neurodegenerative.

1.3.2 – Classificazione ed espressione dei recettori della leptina

I recettori della leptina sono sintetizzati dal gene *db* (diabetes gene) identificato per la prima volta mediante tecnica di clonaggio. Esistono sei isoforme del recettore della leptina (Ob-R, a-f), ottenuti mediante fenomeni di *splicing* alternativo, con identici domini di legame per il ligando, ma che presentano diversi domini perimembrana ed intracellulari.

I recettori Ob fanno parte della classe I della superfamiglia dei recettori per le citochine (Baumann et al., 1996). Essi hanno una struttura simile al recettore del G-CSF (granulocyte colony-stimulating factor) e dei recettori delle glicoproteine 130 (gp 130) incluso gp 130, LIF (leukemia inhibitory factor) ed il recettore dell'oncostatina (oncostatinM). Le sei isoforme dei recettori Ob sono generalmente classificate in tre gruppi strutturali : forme corte (Ob-R a, c-d,f), lunghe (Ob-Rb) e solubili (Ob-Re). Oltre a presentare identici domini extracellulari e transmembrana, le isoforme lunga e corta condividono gli stessi primi 29 aminoacidi intracellulari, sebbene la sequenza sia diversa in relazione allo *splicing* alternativo degli esoni 3', contenente un "box1", ovvero un dominio di legame per la famiglia delle janus tirosin chinasi (JAK). Il recettore Ob-Rb, invece, contiene anche un sito "box 2" ed un sito di legame per la famiglia dei fattori di trascrizione STAT (signal transducers and activators of transcription). Le forme corte sono meno implicate nei segnali intracellulari attivati dalla leptina ma ricoprono un ruolo importante nel passaggio

dell'adipochina attraverso la barriera emato-encefalica. Infatti, le forme corte Ob-Ra e Ob-Rc sono abbondantemente espresse a livello dei microvasi della barriera emato-encefalica e potrebbero essere coinvolte nel normale trasporto della leptina (Tartaglia et al., 1995; Golden et al., 1997; Bjorbaek et al., 1998b).

La forma solubile del recettore, Ob-Re, media la biodisponibilità della leptina in generale (Tu et al., 2008). I recettori della leptina sono stati individuati in molte regioni del cervello (tab. 1), in particolare l'ipotalamo ventrale, a livello del nucleo arcuato, presenta la più alta densità di recettori. L'elevato numero di questi recettori nel nucleo arcuato ben si accorda con il ruolo funzionale della leptina nella modulazione dell'assunzione del cibo (Udagawa & Otani, 2007). Altre regioni in cui è espresso il recettore OB sono la corteccia piriforme, il talamo, il cervelletto, il mesencefalo, l'ippocampo, il tronco dell'encefalo e la neocorteccia (Mutze et al., 2006). Nella neocorteccia e nell'ippocampo, la leptina sembra essere coinvolta nei processi di regolazione della plasticità neuronale (Oomura et al., 2006; Harvey, 2007). Nuovi studi sono comunque necessari per comprendere a pieno le funzioni della leptina in altre aree cerebrali extra-ipotalamiche e come vedremo più avanti per poter sfruttare al massimo le eventuali potenzialità terapeutiche di questo ormone proteico.

Tab. 1 – Classificazione e localizzazione delle isoforme del recettore della leptina nel cervello (Signore et al., 2008)

RECELTTORE LEPTINA	isoforma	aa	LOCALIZZAZIONE	ATTIVAZIONE JAK/STAT	PATHWAY	FUNZIONE
ObRa	corta	894	BEE, plesso carotideo, corteccia piriforme, talamo, ipotalamo, corteccia insulare, cervelletto, cellule granulari. Bassi livelli nella corteccia cerebrale	bassa	STAT3 MEK/ERK	Trasporto leptina nelle cellule endoteliali, degradazione leptina
ObRb	lunga	1162	Corteccia piriforme, talamo, ipotalamo, ippocampo, sostanza nigra, corteccia cerebrale, cellule granulari cerebellari	alta	STAT3 MEK/ERK CREB PI-3K	Tutte le funzioni principali della leptina
ObRc	corta	892	BEE, plesso carotideo, cellule granulari cerebellari	bassa	nessuna	Trasporto leptina nelle cellule endoteliali, altro?
ObRd	corta	901	BEE, plesso carotideo	bassa	nessuna	Trasporto leptina nelle cellule endoteliali, altro?
ObRe	solubile	805	Secreta nel sangue	nessuna		Lega la leptina circolante e facilita il passaggio attraverso la BEE
ObRf	corta	896	BEE, plesso carotideo, cellule granulari cerebellari	bassa	nessuna	Trasporto leptina nelle cellule endoteliali, altro?

1.3.3 – Meccanismi di trasduzione del segnale dei recettori della leptina

I segnali intracellulari dei recettori della leptina sono simili a quelli dei recettori di classe I delle citochine (Bjorbaek et al., 1997). Questa classe di recettori non possiede attività enzimatica intrinseca, perciò ObR trasmette il segnale mediante la formazione di un complesso citoplasmatico con i membri di alcune tirosin chinasi, le JAK (Janus Kinases) che autofosforilano numerosi residui di tirosina sul recettore.

La via JAK/STAT comprende una famiglia di quattro tirosin chinasi non recettoriali

(JAK) e sette fattori di trascrizione di 85-95 kDa (STAT), che sono regolati dalla fosforilazione su specifici residui di serina e tirosina. Generalmente, la cascata di trasduzione del segnale JAK/STAT è attivata da interferoni, interleuchine o altre citochine i cui recettori mancano di attività chinasi intrinseca. I recettori per le citochine contengono un motivo ricco in prolina nel “box1” necessario per l’interazione e l’attivazione di JAK (Ihle et al., 1995). Inoltre, sequenze scarsamente conservate, definite “box2”, giocano anch’esse un ruolo importante nell’interazione con JAK e nella selettività delle diverse isoforme di STAT.

Il recettore Ob non ha un dominio intrinseco tirosin chinasi, per cui recluta chinasi citoplasmatiche, soprattutto JAK2, attraverso i motivi box1 e box2 (Ghilardi et al., 1997). Il box1 e gli amminoacidi 31-36 del dominio intracellulare sono indispensabili per questa attivazione, mentre gli amminoacidi 37-48 sembrano essere coinvolti nell’incremento del segnale (Kloek et al., 2002).

I fattori di trascrizione STAT si legano con il complesso Ob-R/JAK attraverso i domini SH2 e SH3 e vengono attivati mediante fosforilazione su specifici residui di tirosina. In seguito all’attivazione, si dissociano dal complesso e formano nel citoplasma omodimeri o eterodimeri traslocando nel nucleo, dove interagiscono con specifiche sequenze di DNA e promuovono la trascrizione genica (Darnell et al., 1997).

Numerosi studi hanno dimostrato che la fosforilazione della tirosina 1138 (Y1138) sul recettore Ob-Rb è fondamentale per l’attivazione del fattore di trascrizione STAT-3 (Stahl et al., 1995). Inoltre, il legame del ligando con il recettore Ob-Rb attiva STAT-3, STAT-5 e STAT-6 e non STAT-1, STAT-2 o STAT-4 (Ghilardi et al 1996). Per l’attivazione di STAT-5 indotta dalla leptina è necessaria la fosforilazione dei residui Tyr1077 o Tyr1138, invece per STAT-1 e STAT-3 solo l’amminoacido Tyr1138, mentre la fosforilazione della tirosina 985

(Y985) è essenziale per l'attivazione della via Ras/Raf/Erk (extracellular signal-regulated kinase). La fosforilazione di quest'ultimo residuo crea un sito di legame per il dominio C-terminale SH2 della tirosin fosfatasi SHP-2 portando all'attivazione della cascata p21Rasp/ERK. Le tirosin chinasi attivano ERK attraverso la proteina adattatrice Gab-2 (Li & Friedman, 1998), portando così all'attivazione di diversi geni tra cui *c-fos* che promuovono il differenziamento e la sopravvivenza cellulare (Banks et al., 2000) (fig. 1.5).

La via JAK/STAT è posta sotto un controllo a feed-back negativo da parte delle proteine definite soppressori del segnale delle citochine, SOCS (suppressor of cytokines signaling). I membri della famiglia delle SOCS sono indotti da diverse citochine che agiscono come regolatori negativi del loro segnale. La leptina induce l'espressione di SOCS-3 (Munzberg & Myers, 2005) il quale determina l'inibizione del segnale bloccando il sito di legame sulla Y985 del recettore della leptina stessa. Anche se recenti studi hanno dimostrato che l'espressione di alti livelli di SOCS-3 inibisce il segnale delle JAK in cellule che esprimono recettori mutati sulla Y985, suggerendo quindi l'esistenza di meccanismi molecolari alternativi (Bjorbaek et al., 2000).

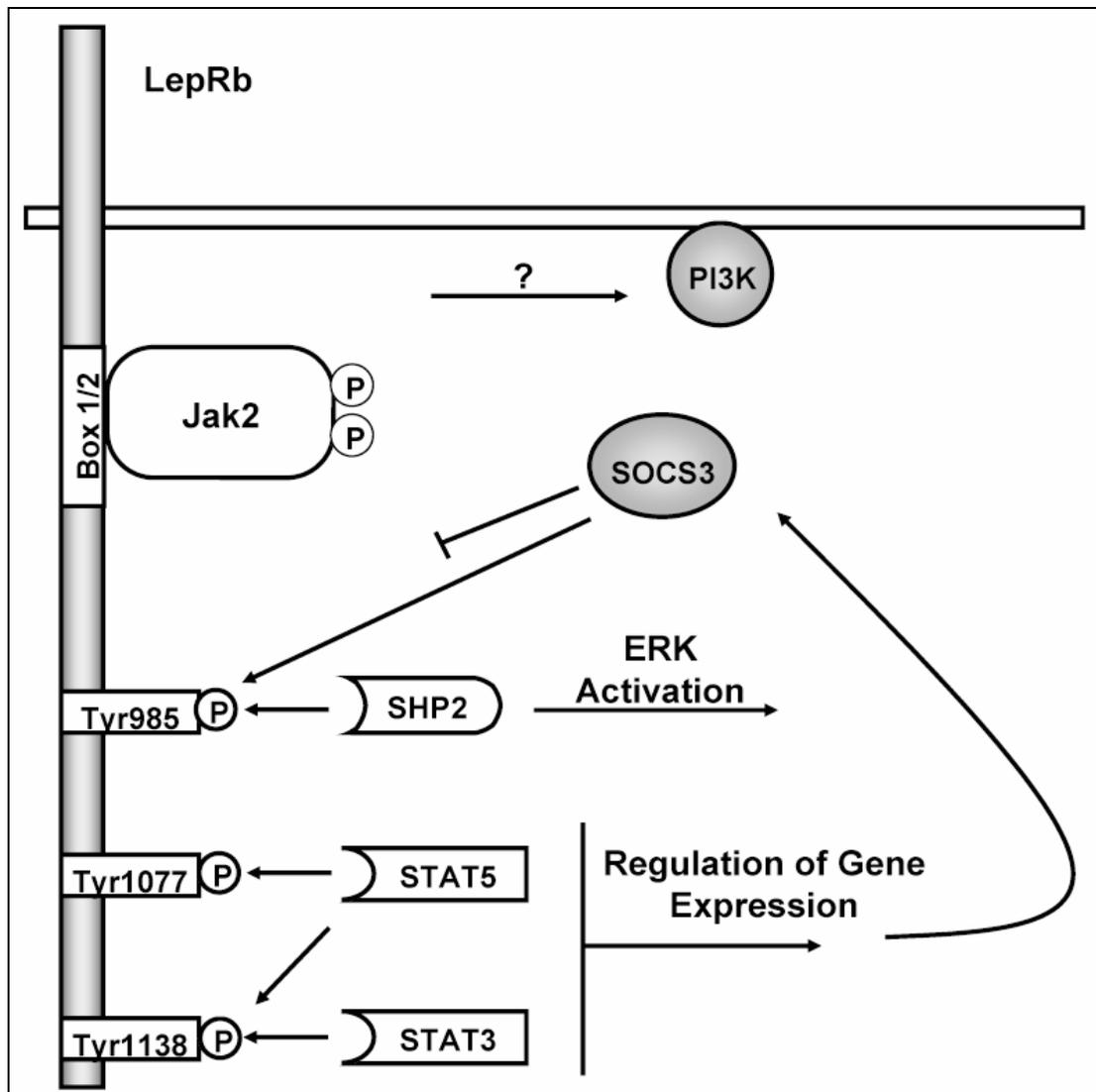


Fig. 1.5 – Struttura ed attivazione del recettore della leptina Ob-Rb. Il legame della leptina al recettore attiva la chinasi JAK2 legata nel dominio Box1 o Box 2 mediante fosforilazione della Tyr985.

La Tyr1077 e Tyr1138 invece, presenti sulla porzione citoplasmatica del recettore, sono dei siti di legame per le proteine contenenti il dominio SH2, come i fattori di trascrizione STAT. pTyr985 attiva ERK e la cascata del segnale delle MAPK (mitogen activated protein kinase), pTyr1077 attiva STAT-5 mentre pTyr1138 attiva sia STAT-3 che STAT-5. l'aumento dell'espressione di SOCS-3 ha un controllo a feedback negativo sullo stesso recettore (Robertson et al., 2005).

La leptina conduce anche all'attivazione del *pathway* della fosfatidil-inositolo-3 chinasi (PI-3K) molto probabilmente attraverso un *crosstalk* con il recettore dell'insulina (fig. 1.6). Infatti, i recettori della leptina oltre ad attivare le MAPK/ERK1/2 e JAK/STAT sono capaci di interagire con i componenti del segnale dell'insulina (Niswender et al., 2003, 2004). Questo *crosstalk* tra la leptina e l'insulina è anche dimostrato dal fatto che i due ormoni regolano le riserve energetiche dell'organismo e l'assunzione di cibo. Infatti, la somministrazione intracerebroventricolare di insulina nelle scimmie riduce il senso di appetito ed il peso corporeo (Woods et al., 1979).

Le funzioni dell'insulina sono mediate da recettori di membrane che, attraverso processo di fosforilazione, attivano delle molecole citoplasmatiche, le IRS (insulin receptors substrates), le quali a loro volta portano all'attivazione delle MAPK e di PI-3K.

I prodotti della PI-3K vanno ad attivare Akt (PKB), un'importante proteina coinvolta nei processi di sopravvivenza cellulare e di metabolismo dei carboidrati (Chan et al., 1999). Numerose evidenze sperimentali hanno dimostrato che la capacità di Ob-R di attivare PI-3K dipende dall'interazione con le proteine IRS. Quest'attivazione può avvenire mediante le JAK e solo in alcune tipi cellulari (Cohen et al., 1996; Attoub et al., 2000) (fig.1.6).

Alcuni studi dimostrano che la leptina aumenta i livelli di fosforilazione di Akt, al contrario altre evidenze sperimentali hanno constatato che questa adipochina non ha alcun effetto sulla fosforilazione di PKB (Kim et al., 2002; Sweeney et al., 2001). Tali osservazioni suggeriscono che la capacità dell'adipochina di attivare Akt dipende dai livelli citoplasmatici di cAMP, ma soprattutto dipende dalle condizioni sperimentali e dal tipo cellulare.

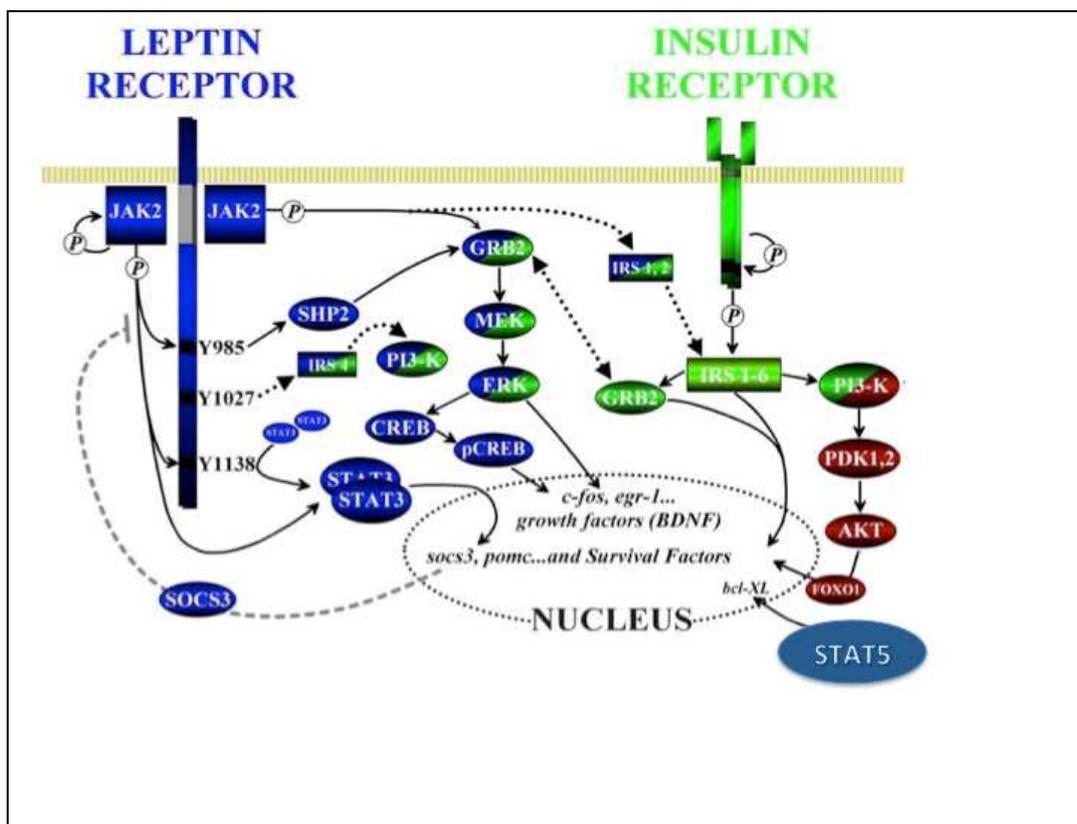


Fig 1.6. – Crosstalk tra il recettore della leptina ed il recettore dell’insulina. La leptina può avere un *crosstalk* diretto con i recettori dell’insulina attraverso l’attivazione di IRS1/2, mediato da JAK2, e IRS-4 mediante un legame diretto sul residuo Y1077. Il recettore dell’insulina può attivare a sua volta una serie di *pathways* incluso MEK/ERK, GRB2 e PI3-K stimolando così la sopravvivenza neuronale mediante l’aumento della fosforilazione di Akt (Signore et al., 2008).

1.3.4 - Leptina e neuroprotezione

Recenti evidenze indicano che la leptina ha importanti effetti neuroprotettivi, migliorando la sopravvivenza neuronale *in vivo* ed *in vitro* attraverso l’attivazione di diversi *pathways* molecolari.

Le prime evidenze che questo ormone potesse avere effetti neuroprotettivi sono stati suggeriti dalla riduzione del peso del cervello, dal rallentamento dei processi di mielinizzazione e dalla ridotta maturazione dei neuroni in topi che esprimono i recettori della

leptina mutati (Ahima et al., 1996).

Dicou et al., (2001) dimostrarono che la somministrazione sistemica della leptina riduce le lesioni corticali indotte dall'acido ibotenico. Inoltre, tale ormone protegge i neuroni corticali di topo in coltura dalla citotossicità N-metil-D-aspartato (NMDA)-mediata.

Russo et al., (2004), invece hanno dimostrato che questa proteina stimola la proliferazione di cellule di neuroblastoma SH-SY5Y e riduce l'apoptosi causata da deprivazione di serio. Alla base di tale meccanismo anti-apoptotico c'è l'attivazione delle vie JAK-STAT, PI-3K ed ERK attraverso una riduzione dell'espressione della caspasi 10 e del ligando inducente l'apoptosi correlato al TNF (TRAIL). Recenti lavori, su colture neuronali ippocampali dimostrano che la leptina protegge le cellule contro la morte neuronale indotta mediante deprivazione di fattori trofici e stress ossidativo (Guo et al., 2008). Tale protezione viene revertita dagli inibitori di JAK/STAT e di PI-3K ma non da quelli per MEK.

È stata inoltre dimostrata una funzione protettiva della leptina nei confronti del danno indotto da specifiche neurotossine; per esempio, inibisce la morte delle cellule SH-SY5Y indotta da MPTP (1-metil-1,2,3,6-tetraidropiridina) (Lu et al., 2006).

Studi recenti hanno apportato nuove evidenze circa il ruolo neuroprotettivo di questa molecola *in vivo* e nuovi spiragli sembrano aprirsi verso le sue potenziali applicazioni terapeutiche nei confronti di insulti neurotossici e neurodegenerativi.

Il ruolo neuroprotettivo della leptina sui neuroni dopaminergici è stato documentato in alcuni modelli sperimentali di Parkinson (Weng et al 2007). Gli autori di questo studio trovarono che la leptina diminuiva il danno provocato dalla 6-idrossidopamina (6-OHDA) su linee cellulari dopaminergiche di topo (MN9D) mediante l'attivazione di ERK1/2. In particolare, tale meccanismo si esplicava attraverso l'attivazione del fattore di trascrizione

CREB (cAMP responsive element binding), il quale riveste un ruolo fondamentale nella rigenerazione neuronale. Infatti, la somministrazione intracranica di leptina riduce la perdita dei neuroni dopaminergici tirosina idrossilasi positivi.

Gli effetti neuroprotettivi della leptina sono stati anche documentati in modelli sperimentali di ischemia cerebrale sia *in vitro* che *in vivo* (Zhang et al., 2007).

I primi effetti protettivi di questa molecola contro l'eccitotossicità glutammatergica furono osservati in neuroni di topo (Dicou et al., 2001). Fu dimostrato infatti che il pretrattamento di colture primarie di neuroni con leptina per 20 ore protegge i neuroni dalla morte cellulare indotta da NMDA, e l'inibitore di JAK2, AG490, antagonizza gli effetti neuroprotettivi dell'adipochina. Successive analisi hanno confermato che il pretrattamento di neuroni ippocampali di ratto con leptina per 24 ore incrementava il numero di neuroni che sopravvivevano al trattamento con NMDA (Guo et al., 2008).

In vivo, la neuroprotezione da leptina è stata osservata in differenti modelli animali di ischemia cerebrale globale e focale. Infatti, la somministrazione sistemica di questa adipochina protegge i neuroni dei topi sottoposti ad occlusione transitoria (Zhang et al., 2007) o permanente (Valerio et al., 2009) dell'arteria cerebrale media. Recentemente, è stato dimostrato che l'ossido nitrico (NO) potrebbe partecipare attivamente alla neuroprotezione e alla neurogenesi in modelli di ischemia cerebrale. La leptina ha un importante ruolo nella regolazione della produzione di NO (Fruhbeck 1999; Winters et al., 2000; Kimura et al., 2000) che potrebbe spiegare in parte l'effetto neuroprotettivo contro l'insulto ischemico neuronale (Tsuda, 2009), anche se Zhang et al., (2007) escludono che l'effetto neuroprotettivo della leptina sia dovuto a possibili modificazioni emodinamiche.

Infine, Zhang et al., (2007) dimostrarono in un modello di ischemia cerebrale globale

che l'aumento della fosforilazione di Akt ed ERK nei neuroni della CA1 è alla base della neuroprotezione.

1.4 – RUOLO DI STAT3 E AKT NELLA SOPRAVVIVENZA NEURONALE

1.4.1 – Struttura, funzione e regolazione delle proteine STAT

I fattori di trasduzione del segnale e attivatori della trascrizione (STAT) comprendono una famiglia di fattori di trascrizione genica che mediano una grande quantità di funzioni biologiche.

Sono stati identificati, sia nel genoma umano che in quello di topo, sette membri di questa famiglia, tutti codificati da differenti geni e possono essere così differenziati: STAT-1, STAT-2, STAT-3, STAT-4, STAT-5A, STAT-5B e STAT-6 (Copeland et al., 1995).

Le proteine STAT sono lunghe catene proteiche costituite da 700-850 amminoacidi e formate da diversi domini funzionali (fig.1.7); un dominio N-terminale, importante per la dimerizzazione e la successiva attivazione (Chakraborty et al., 1998); un dominio coiled-coil necessario per l'interazione con altri fattori di trascrizione e proteine regolatrici (Tanaka et al., 2005); un dominio di legame per il DNA (escluso STAT-2); una regione linker che è coinvolta nell'attivazione trascrizionale e nell'interazione proteina-proteina (Pfitzner et al., 1998); vicino a quest'ultima regione, si trova il dominio SH2 altamente conservato, che permette l'associazione con il recettore ed infine, abbiamo anche un residuo di Serina localizzato nel dominio di attivazione trascrizionale (TAD) (fig.1.7). Questo residuo potrebbe essere molto importante per la soppressione del segnale e quindi l'inibizione della trascrizione genica (Kim & Maniatis, 1996; Suzuki et al., 2003; Soler-Lopez et al., 2004), ma ancora non è chiaro quali chinasi siano coinvolte nel processo di fosforilazione di tale sito, molto probabilmente alcune MAP chinasi.

Questi domini di trans-attivazione permettono ai suddetti fattori di trascrizione di essere direttamente attivati da proteine come Akt (Lim & Cao, 2006) ed altre MAP chinasi.

								<u>pTyr</u>	<u>pSer</u>	<u>methylation</u>	<u>kDa</u>	
STAT1 α	1	136	316	488	576	683	712	750	Y701	S727	R31	91
		N	CC	DNA	LK	SH2	Y	TA				
STAT1 β	1	136	316	488	576	683	712		Y701	S727	R31	84
		N	CC	DNA	LK	SH2	Y					
STAT2	1	139	316	486	575	680	698	851	Y690	-	R32	113
		N	CC	DNA	LK	SH2	Y	TA				
STAT3 α	1	138	321	494	583	688	717	770	Y705	S727	R31	92
		N	CC	DNA	LK	SH2	Y	TA				
STAT3 β	1	138	321	494	583	688	722		Y705	-	R31	89
		N	CC	DNA	LK	SH2	Y					
STAT4	1	137	316	484	572	677	705	748	Y693	S721	R31	89
		N	CC	DNA	LK	SH2	Y	TA				
STAT4 β	1	137	316	484	572	677	704		Y693	-	R31	83
		N	CC	DNA	LK	SH2	Y					
STAT5A	1	145	332	497	592	685	706	794	Y694	S726/ S780	R31	94
		N	CC	DNA	LK	SH2	Y	TA				
STAT5B	1	145	332	497	592	685	711	787	Y699	S731	R31	92
		N	CC	DNA	LK	SH2	Y	TA				
STAT6	1	124	273	441	536	632	652	847	Y641	-	R27	110
		N	CC	DNA	LK	SH2	Y	TA				
STAT6b	111	124	273	441	536	632	652	847	Y641	-	-	95
		N	CC	DNA	LK	SH2	Y	TA				
STAT6c	1	124	273	441	536	565	632	652	847	-	-	102
		N	CC	DNA	LK	SH2	Y	TA				

Fig.1.7 – la proteina STAT umana e i suoi domini funzionali. N= dominio N-terminale coinvolto nella dimerizzazione/tetramerizzazione. CC= dominio coiled-coil coinvolto nell'interazione con altre proteine. DNA= dominio di legame al DNA. LK= dominio linker. SH2= dominio SH2. Y= siti di fosforilazione. TA= dominio di transattivazione. Meccanismi di *splicing* alternativo generano isoforme lunghe α e corte β , b e c. I numeri indicano i residui amminoacidici della proteina. Infine abbiamo pY, pS e R che rappresentano i siti di fosforilazione, di metilazione e il peso molecolare della proteina (kDa). (Lim & Cao, 2006).

Le proteine STAT possono essere attivate da differenti segnali che comprendono citochine, incluso interferoni ed interleuchine, fattori di crescita ed ormoni (Bromberg, 2001; Schindler et al., 2002).

STAT-1 viene attivato soprattutto dagli interferoni (α , β e γ) ed è coinvolto nelle risposte anti-virali ed anti-batteriche, nell'inibizione della crescita e nell'attivazione dei processi apoptotici. Il fattore di trascrizione STAT-3 è attivato da citochine, fattori di crescita ed ormoni come l'interleuchina-6 (IL-6), il fattore di crescita epidermico (EGF), il fattore stimolante dei granulociti (G-CSF), il fattore di crescita di tipo I insulino-simile (IGF-1) e la leptina. (Bromberg, 2001, Zhang et al., 1998; David et al., 2002; Frank et al., 1997). STAT-4 è stimolato dall'interleuchina-12 (IL-12) e regola lo sviluppo delle Th1 (T helper 1), mentre STAT-6 è attivato dall'interleuchina-4 (IL-4) ed è coinvolto nella maturazione delle Th2 (T helper 2). STAT-5a e STAT-5b, invece, sono attivati soprattutto da ormoni della crescita.

Come mostra la figura 1.8, il principale meccanismo di attivazione di questi fattori di trascrizione è il *pathway* classico JAK/STAT, il quale viene attivato dai recettori delle citochine, dei fattori di crescita e della leptina. Queste molecole, legandosi ai propri recettori, determinano una dimerizzazione e la conseguente attivazione delle JAK, le quali transfosforilano i domini intracellulari dei recettori su specifici residui di tirosina creando così dei siti di legame per le proteine STAT. Tali fattori di trascrizione si legano al recettore mediante un dominio SH2 presente nella struttura stessa della proteina e in questo modo JAK fosforila ed attiva STAT, il quale trasloca nel nucleo e promuove la trascrizione di numerosi geni. In particolare STAT-3 viene attivato per fosforilazione su residui di Tyr705 e Ser727 (O'Rourke & Shepherd, 2002).

Il processo di fosforilazione ad opera della famiglia delle JAK chinasi sul residuo di

Tyr è fondamentale per l'attivazione (Soler-Lopez et al., 2004) di STAT mentre la fosforilazione sul residuo di Ser ad opera di ERK1/2, di p38 e di JNK ancora deve essere compreso a pieno.

Una volta attivati, i membri della famiglia STAT omodimerizzano o eterodimerizzano e, mediante l'ausilio di specifiche proteine, traslocano nel nucleo dove trascrivono numerosi geni mediante legame a sequenze consenso di 8-10 paia di basi (bp) sul DNA. I principali siti di consenso possono essere così suddivisi: SIE (sis-inducible element), GAS (gamma activated sequence) e ISRE (interferon stimulated regulating element). In particolare per STAT-3 questi siti consenso si trovano soprattutto nei promotori di geni che stimolano la sopravvivenza cellulare e mediano processi antiapoptotici come Bcl-xL, la Ciclina-D e TIMP-1 (Bromberg, 2001), mentre STAT-1 lega siti presenti su promotori di geni proapoptotici come la caspasi-1, la caspasi-2 e la caspasi-3 (Cattaneo et al., 1999; Chin et al., 1997; Kumar et al., 1997).

Il segnale di attivazione di STAT viene inibito da specifiche molecole proteiche che possono essere così suddivise: proteine contenenti un dominio SH2 citochina-inducibile (CIS), soppressori del segnale delle citochine (SOCS), proteine che legano JAK (JAB), inibitori di STAT, STAT inducibili (SSI), proteine inibitrici dell'attivazione di STAT (PIAS), fosfatasi ed infine proteine coinvolte nella degradazione mediante il sistema ubiquitina proteosoma (Kim et al., 1996) (Fig. 1.8). Una volta traslocato nel nucleo STAT attiva la sintesi di diversi geni tra cui anche quelli appartenenti alla famiglia degli inibitori SOCS, formata da otto membri totali SOCS-1/JAB/SSI-1, SOCS-2, SOCS-3, SOCS-4, SOCS-5, SOCS-6, SOCS-7 e CIS.

Queste proteine inibiscono STAT utilizzando tre differenti meccanismi (Starr &

Hilton 2003):

- il primo, SOCS-1 si lega direttamente a JAK ed inibisce la sua attività chinasi;
- Il secondo, SOCS-3 attraverso il legame diretto con JAK oppure legando prima il recettore fosforilato e poi bloccando la chinasi;
- Infine, CIS compete con STAT per il legame sul sito del recettore.

A differenza delle SOCS, i membri della famiglia delle PIAS (PIAS-1, PIAS-2, PIAS-3, PIASy, PIASx α e PIASx β) sono costitutivamente espressi a livello nucleare e disattivano il segnale interagendo direttamente con STAT fosforilato bloccando la capacità del fattore di trascrizione di legare il DNA (Doetsch et al., 1999). Infine due fosfatasi PTP-2 (SHP-2) e TC45 inattivano STAT mediante defosforilazione diretta.

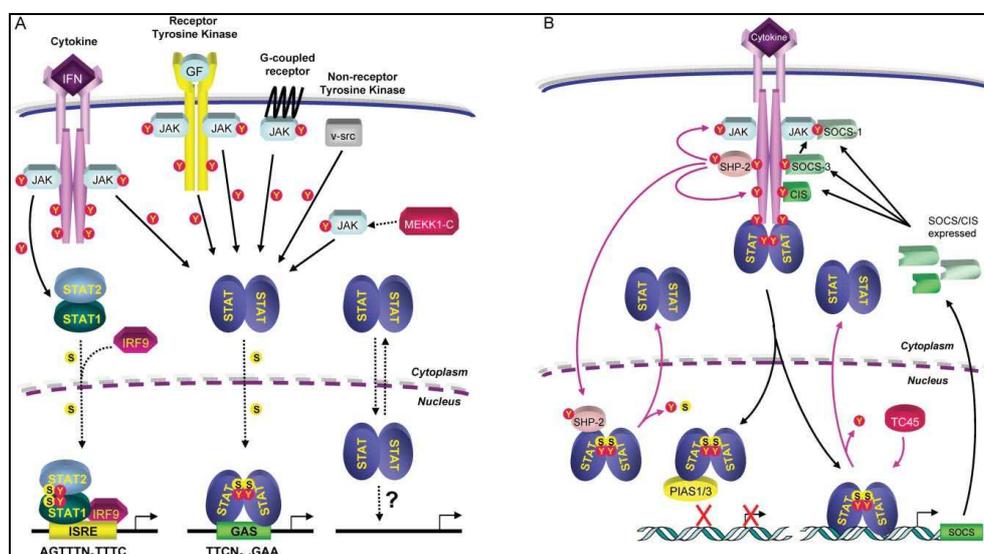


Fig. 1.8 – Attivazione ed inattivazione di STAT.

- A) STAT può essere attivato da differenti segnali come citochine, fattori di crescita, ormoni, recettori accoppiati a proteine G oppure proteine adattatrici come MEKK1-C. Una volta attivato STAT dimerizza e trasloca nel nucleo dove promuove la trascrizione genica mediante legame a sequenze promotrici presenti sul DNA (ISRE e GAS).
- B) Rappresentazione schematica dei meccanismi di inibizione mediati dalle proteine SOCS, PIAS, TC45 o SHP-2 (Lim & Cao, 2006).

1.4.2 – Ruolo di STAT-3 nello sviluppo del sistema nervoso

Nei roditori, l'espressione della proteina STAT-3 è stata rilevata nella corteccia cerebrale e nello striato a partire dal quattordicesimo giorno della fase embrionale (E14) e nell'ippocampo a E18. La proteina STAT-3 (De-Fraja et al., 1998) e il suo mRNA (Zhong et al., 1994) sono costitutivamente espressi a partire da E14 fino al terzo mese di vita. Invece, durante lo sviluppo postnatale, l'espressione di STAT-3 aumenta dal terzo giorno postnatale (P3) fino a P21 (Gautron et al., 2006). Nella fase di sviluppo del cervello di ratto, a partire da P3 fino a P10, STAT-3 è localizzato prevalentemente nel nucleo delle cellule del corpo calloso, della corteccia e delle cellule stellate, suggerendo così un ruolo importante di questo fattore di trascrizione nello sviluppo neuronale. STAT-3 è espresso nei neuroni e nelle cellule gliali sia durante lo sviluppo (Murata et al., 2000) che nel cervello adulto (Planas et al., 1997).

Oltre ad essere coinvolto nello sviluppo dei neuroni, questo fattore di trascrizione rappresenta un elemento fondamentale nella maturazione del fenotipo delle cellule gliali (Bonni et al., 1997; Rajan & McKay, 1998; Takizawa et al., 2001; Uemura et al., 2002; Yanagisawa et al., 1999). Esso induce una proteina specifica per la maturazione e la differenziazione degli astrociti, GFAP (glial fibrillary acid protein) (Takanaga et al., 2004). Infatti, studi *in vitro* dimostrano che STAT-3 ha un ruolo importante nella differenziazione delle cellule gliali derivanti dalle cellule progenitrici corticali (Bonni et al., 1997) mentre, *in vivo* è stato dimostrato che STAT-3 è un componente integrale dell'astroglione (He et al., 2005).

Da P21, l'attività di STAT-3 diminuisce nel cervello ad esclusione dei neuroni ipotalamici (Gautron et al., 2006; Stromberg et al., 2000) e in alcune cellule della zona

subventricolare (SVZ) e subgranulare (SGF) dell'ippocampo (Doetsch et al., 1999; Eriksson et al., 1998; Lois & Alvarez-Buyilla, 1993).

L'importanza di questo fattore di trascrizione nello sviluppo neurologico e nella sopravvivenza delle cellule nervose è ulteriormente dimostrata dal fatto che animali *knockout* per STAT-3 muoiono durante il periodo di gastrulazione (E 6,5) (Takeda et al., 1997).

Per studiare e capire il ruolo di STAT-3 nella sopravvivenza neuronale, numerosi ricercatori hanno utilizzando la tecnologia Cre-Lox che consente la delezione a tempi stabiliti del gene di interesse in cellule e tessuti specifici. Infatti, Alonzi et al., (2001) utilizzando uno specifico promotore *bal-1*, hanno eliminato il gene STAT-3 nel periodo successivo alla gastrulazione (E 6,5) (Alonzi et al., 2001). *Bal-1-cre* sono espressi in alcuni tessuti, incluso il cervello. Da tali studi si evince che gli animali *Knockout* per STAT-3, in risposta al fattore di crescita CNTF, non sono capaci di attivare i *pathways* fondamentali per la sopravvivenza neuronale. Inoltre, in questo modello sperimentale non viene attivata neanche PI-3K/Akt, suggerendo un'ulteriore funzione di STAT-3 nell'attivazione diretta di *pathways* citosolici (Alonzi et al., 2001). La costitutiva espressione di STAT-3 a livello nucleare durante la fase di sviluppo suggerisce che questo fattore di trascrizione è un importante mediatore nello sviluppo e nella maturazione del sistema nervoso centrale.

1.4.3 – Modulazione di STAT-3 in seguito ad ischemia

L'attivazione di STAT-3 nel cervello ischemico avviene con una tempistica precisa e coinvolge differenti tipi cellulari (tab. 2). La fosforilazione di questa proteina è stata osservata nei neuroni (Dziennis et al., 2007; Justicia et al., 2000; Satriomoto et al 2006; Suzuki et al., 2001), negli astrociti, nella microglia (Conway et al., 2006; Justicia et al., 2000; Planas et al., 1996) e nelle cellule endoteliali (Satriotomo et al 2006; Suzuki et al., 2001) della corteccia, dello striato e dell'ippocampo in differenti modelli *in vitro* ed *in vivo* di ischemia cerebrale.

In generale, la fosforilazione di STAT-3 è presente nei neuroni durante la fase acuta del danno, mentre negli astrociti, la microglia e le cellule endoteliali avviene soprattutto nella fase cronica. In alcuni modelli di ischemia cerebrale focale transitoria, all'inizio dell'ischemia (Suzuki et al., 2001), si ha una bassa attivazione neuronale di STAT-3 nella corteccia peri-ischemica mentre aumenta in maniera significativa dopo l'insulto ischemico (Suzuki et al., 2001; Dziennis et al., 2007). Mentre un'intensa attivazione nucleare è stata dimostrata dopo 24 h dall'MCAo, suggerendo infatti che STAT-3 è attivo e promuove la trascrizione genica (Dziennis et al., 2007).

Alcuni dati presenti nella letteratura dimostrano che STAT-3 nelle cellule gliali si attiva prevalentemente a partire da 24 h dopo MCAo transitoria (Kim et al., 2004; Satriotomo et al., 2006). Ma in alcuni casi, è stato dimostrato che la fosforilazione di questo fattore di trascrizione e la sua traslocazione nucleare negli astrociti avviene anche in tempi più precoci come per esempio hanno dimostrato Justicia et al., (2000) in un modello transitorio di MCAo. Nelle cellule della microglia invece, l'attivazione avviene a tempi più tardivi dall'inizio dell'insulto ischemico, questo dimostra che STAT-3 riveste un ruolo importante anche nel

processo infiammatorio instauratosi durante l'ischemia. In particolare, Satriotomo et al., (2006) hanno dimostrato che il silenziamento di STAT-3 nella microglia del core riduce il volume di infarto cerebrale prodotto da MCAo nei ratti ipertensivi (Satriotomo et al., 2006). Le cellule endoteliali dei vasi sanguigni cerebrali dei ratti sottoposti a occlusione transitoria dell'arteria cerebrale media (MCAo), attivano STAT-3 dopo 24 h dall'insulto ischemico (Satriotomo et al., 2006; Suzuki et al., 2001). La fosforilazione di STAT-3 nei neuroni, in alcuni modelli animali di ischemia cerebrale, è direttamente collegata alla sopravvivenza neuronale. Infatti alcuni studi dimostrano che il segnale di pSTAT-3 colocalizza con il *marker* neuronale MAP-2 (Dziennis et al., 2007; Suzuki et al., 2001) e con la proteina anti-apoptotica Bcl-2 (Dziennis et al., 2007), ma non con la caspasi-3 clivata (Yamashita et al., 2005). Al contrario invece, Wen et al., (2001) utilizzando un modello permanente di occlusione dell'arteria cerebrale media, dimostrarono che il segnale di pSTAT-3 colocalizza con le cellule TUNEL-positive, portando gli stessi autori del lavoro a sostenere che pSTAT-3 media la morte delle cellule nervose.

La sopravvivenza neuronale durante un insulto ischemico dipende molto dalle cellule gliali, le quali danno un supporto strutturale e funzionale (mediante il rilascio di fattori trofici e metaboliti) ai neuroni (Nedergaard et al., 2005). Numerosi dati dimostrano che si ha un aumento della fosforilazione di STAT-3 negli astrociti reattivi dell'ippocampo durante il *preconditioning* ischemico, e l'attivazione di STAT-3 è correlata con l'aumento dell'espressione di cIAP2, un membro degli inibitori dell'apoptosi, nelle cellule gliali della penombra (Solaroglu et al., 2006).

A differenza degli altri membri della famiglia STAT, il fattore di trascrizione STAT-3 riveste un ruolo cruciale nella sopravvivenza neuronale dopo un'insulto ischemico. Infatti

numerose molecole come fattori di crescita, estrogeni e citochine utilizzano STAT-3 per indurre la trascrizione di geni (Reg-2, bcl-2, bcl-xL; Pirn-1, cIap2 e GAP-43) importanti nella sopravvivenza cellulare e la riparazione del tessuto danneggiato. La comprensione approfondita dei meccanismi molecolari di STAT-3 nella neuroprotezione risulteranno quindi fondamentali per lo sviluppo di nuovi approcci farmacologico per il trattamento di patologie neurodegenerative come per esempio l'ischemia.

Tab. 2 Attivazione temporale e localizzazione cellulare di STAT-3 in seguito ad un insulto ischemico (Dziennis et al., 2008)

STAT	TIPO DI ISCHEMIA	SPECIE	TIPO CELLULARE	TEMPO DOPO RIPERFUSIONE	REGIONE	REF.
STAT3	MCAO	Ratto	microglia	4h, 7d, 15d	Corteccia e striato	Planas et al., 1996
STAT3	MCAO	Ratto	Neuroni Neuroni astrociti	1h 12h 1-12h	Espressione nucleare core ischemico	Justicia et al., 2000
pSTAT3	MCAO	Ratto	Neuroni Neuroni Endoteliali Neuroni Monociti/ macrofagi	3,5-168h Picco 3,4h 48h 3,5h, 24h, 48h 5h-168h	Penombra corteccia, Core (corteccia e striato), controlaterale corteccia	Suzuki et al., 2001
pSTAT3	pMCAO	Topo.	neuroni	6-24h	Zona periferica dell'area ischemica	Wen et al., 2001
STAT3	ISCHEMIA PRECONDIZIONATA	Ratto	astrociti	3d-7d	ippocampo	Kim et al., 2004
pSTAT3	ISCHEMIA GLOBALE	Ratto	astrociti	4h, 1d, 3d	ippocampo	Choi et al., 2003
pSTAT3	MCAO	Ratto femmina	Monociti/ macrofagi attivati Neuroni, astrociti	24h-72h	Core (corteccia e striato) zona perinfarto	Satriamoto et al., 2006
pSTAT3	MCAO		Neuroni non determinati	3h 32h	Corteccia, zona perinfarto corteccia	Dziennis et al., 2007

1.4.4 – Struttura e attivazione della proteina chinasi Akt

La proteina Akt è una serina-treonina chinasi chiamata anche proteina chinasi B (PKB). Strutturalmente è costituita da un dominio regolatore N-terminale simile a quello della plecstrina (PH, *Pleckstrin homology*) (Franke et al., 1994), una regione cerniera che connette il dominio PH al dominio chinamico con specificità serina-treonina (Ahmed et al., 1993) ed una regione C-terminale indispensabile per l'induzione e il mantenimento dell'attività chinamica (Chen et al., 1999). Nei mammiferi esistono tre isoforme di questa proteina ognuna delle quali è codificata da un distinto locus genico: Akt-1, Akt-2, Akt-3.

Akt-1 è espressa in modo ubiquitario, ad eccezione di rene e milza (Coffer & Woodgett, 1991), invece, l'espressione di Akt-2 è limitata agli organi intestinali, sessuali, ai muscoli ed al tessuto riproduttivo (Jones et al., 1991; Konishi et al., 1994). Akt-3 è espressa soprattutto nel testicolo, nel cervello e, in minor misura, nel tessuto muscolare e negli organi intestinali (Nakatani et al., 1999). L'Akt viene attivata dalle tirosin-chinasi accoppiate ai recettori dei fattori di crescita, il recettore del fattore di crescita dell'epidermide (EGFR), il recettore del fattore di crescita insulino-simile (IGFR) e quello del fattore di crescita nervoso (NGFR) sono esempi di recettori che attivano questa via (Kitagawa et al., 1999; Cappuzzo et al., 2006); il legame del fattore di crescita a questi recettori attiva la PI3K.

Il meccanismo di attivazione di Akt inizia con il legame di entrambi i fosfoinositoli 3-fosforilati al dominio PH (Franke et al., 1997). La specificità di questo legame è importante per l'attività di Akt nella cellula (Rameh & Cantley, 1999) e determina la sua traslocazione dal citoplasma alla membrana plasmatica. Qui la proteina Akt viene fosforilata e, quindi, attivata su due residui distinti: il residuo di treonina 308 in un'ansa flessibile a livello del

dominio chinasi (*t-loop*) ed il residuo di serina 473 all'estremità C-terminale. La fosforilazione del *t-loop* è mediata da una serina-treonina chinasi di 63 kDa chiamata PDK-1 (piruvato deidrogenasi chinasi 1) (Alessi et al., 1997; Stephens et al., 1998). Una volta fosforilato, il *t-loop* subisce un cambiamento di conformazione che permette l'accesso al sito attivo della molecola di ATP e del substrato (Toker & Newton, 2000). Il meccanismo di fosforilazione del residuo di Ser473 non è ancora stato chiarito, tuttavia, alcuni studi hanno dimostrato l'implicazione di una distinta chinasi come la PDK-2 (Hill et al., 2001).

1.4.5 – Bersagli molecolari della proteina chinasi Akt

L'Akt, dopo essere stata attivata, esercita effetti protettivi nei confronti della cellula sottoposta ad insulto e, in particolar modo, risulta fosforilata in numerosi insulti tossici inclusa l'eccitotossicità (Corasaniti et al., 2007; Kim et al., 2002), l'esposizione a radicali liberi (Matsuzaki et al., 1999) e l'ipossia (Chong et al., 2002). In particolare, Akt regola l'attività di numerose proteine promuovendo la sopravvivenza cellulare ed inibendo la morte cellulare programmata.

I meccanismi attraverso cui l'Akt inibisce il processo apoptotico sono:

- fosforilazione della proteina proapoptotica Bad sulla Ser 136. Nello stato defosforilato Bad forma un eterodimero con Bcl-xL e Bcl-2 nei mitocondri, inibendoli. Quando viene fosforilata si dissocia dal complesso formato con Bcl-2 e Bcl-xL, i quali possono nuovamente agire come molecole anti-apoptotiche. La proteina Bad, a questo punto, si lega alle proteine citosoliche *14-3-3* che la sequestrano nel citoplasma neutralizzandone l'attività proapoptotica (Zha et al.,

1996);

- fosforilazione della caspasi 9 sul residuo di Ser 196 e blocco della sua attivazione indotta dal rilascio del citocromo c dalla membrana mitocondriale (Cardone et al., 1998);
- fosforilazione del fattore di trascrizione CREB (*cAMP response element binding protein*) sulla Ser 133. La fosforilazione favorisce il legame con la proteina CBP (*CREB-binding protein*) e, di conseguenza, un aumento dell'attività trascrizionale e la regolazione dell'espressione di importanti geni coinvolti nella sopravvivenza cellulare come le citochine ed il BDNF (Shieh et al., 1998; Tao et al., 1998);
- attivazione del segnale anti-apoptotico del fattore di trascrizione NF- κ B (*Nuclear factor kappa-B*). L'NF- κ B è un regolatore della risposta immune, una deregolazione della sua attività è implicata nello sviluppo di patologie come il cancro, le malattie autoimmuni e l'ischemia cerebrale (Li & Verma, 2002). In assenza di stimoli, questo fattore è sequestrato nel citoplasma in associazione con diversi inibitori, raggruppati sotto il nome di I κ B, che ne impediscono la traslocazione nel nucleo. Akt fosforila ed attiva la chinasi IKK che fosforila a sua volta gli inibitori di NF- κ B, I κ B, promuovendone la degradazione; NF- κ B può dunque traslocare nel nucleo, legarsi al DNA e attivare la trascrizione di geni specifici, tra cui quelli che codificano per proteine anti-apoptotiche come Bcl-2 (White et al., 2000);
- inibizione del fattore di trascrizione Forkhead che controlla l'espressione di geni promuoventi l'apoptosi (White et al., 2000);
- inibizione di p53, proteina in grado di indurre apoptosi (Mazzoni et al., 1999). In

particolare, Akt fosforila MDM2, regolatore negativo di p53, che trasloca dal citoplasma al nucleo dove promuove la degradazione di p53 (Mayo & Donner, 2001);

- fosforilazione ed inattivazione della glicogeno sintasi chinasi-3 (GSK-3). Questo enzima, quando è attivo, fosforila ed inibisce eIF2B (fattore di iniziazione 2B), un fattore implicato nell'inibizione della via apoptotica (Pap & Copper, 2002).

1.4.6 – Ruolo di Akt nel danno da ischemia cerebrale

La via di trasduzione del segnale fosfatidilinositolo-3-chinasi (PI3K)/Akt che regola la plasticità neuronale è una delle principali vie biochimiche responsabili della sopravvivenza cellulare. Molti studi *in vivo* hanno dimostrato che l'attivazione di questa via gioca un ruolo importante nel recupero dei neuroni della penombra ischemica dalla morte cellulare (Fukunaga & Kawano, 2003). Studi di colocalizzazione hanno dimostrato che i neuroni fosfo-Akt (p-Akt) positivi non presentano frammentazione del DNA (Noshita et al., 2001), ciò suggerisce che l'attivazione dell'Akt contribuisce alla neuroprotezione. L'aumento dell'espressione di p-Akt è transiente ed è seguito da una drammatica riduzione della p-Akt nelle 24 h o più dopo l'ischemia, a seconda dei modelli sperimentali di ischemia cerebrale usati (focale o globale, transitoria o permanente) (Zhao et al., 2005). Altri studi hanno dimostrato un aumento dell'immunoreattività della proteina Akt, a 3-8 ore, nella penombra ischemica dei ratti sottoposti ad occlusione della arteria cerebrale media (Kitagawa et al., 1999). Il pretrattamento con fattori neurotrofici capaci di attivare la via PI3K/Akt determina

neuroprotezione mantenendo la fosforilazione dell' Akt e, quindi, la sua attività (Fukunaga & Kawano, 2003; Maiese et al., 2004).

Il gene PTEN (*phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10*) codifica per una fosfatidilinositolo-3,4,5-trisfosfato fosfatasi (PTPase) che svolge un ruolo importante nella regolazione dei livelli intracellulari di PIP3 (fosfatidilinositolo 2,4,5 trifosfato) defosforilando i prodotti delle PI3K in posizione 3' e agendo, in questo modo, come il principale regolatore negativo della via PI3K/Akt. Recentemente è stato dimostrato che l'attività di PTEN può essere ridotta dalla fosforilazione sul residuo di serina 380 a livello C-terminale (Odriozola et al., 2007). E' stato riportato che la delezione di PTEN previene il danno ischemico cerebrale (Shi et al., 2001). Inoltre, è stato ampiamente dimostrato che Akt inibisce il *pathway* apoptotico mediante la fosforilazione di Bad; la proteina blocca la formazione del canale con l'eterodimero *bax* impedendo così il rilascio del citocromo c dal mitocondrio. Akt inibisce anche l'attività proteolitica della caspasi 9 attraverso la fosforilazione sulla Ser196 (Cardone et al., 1998). Molte evidenze sperimentali, infatti, hanno dimostrato che la proteina Akt aumenta la sopravvivenza delle cellule nervose (in particolare neuroni piramidali) in seguito ad un insulto ischemico (Fukunaga et al., 2003) attraverso la fosforilazione diretta dei membri della famiglia di Bcl-2 e delle caspasi e mediante la regolazione della loro espressione (Fukunaga & Kawano, 2003).

SCOPO DELLA TESI

Il presente progetto di ricerca ha come argomento lo studio dei meccanismi alla base del danno cerebrale da ischemia ed, in particolare, dei suoi aspetti neurochimici e neuroinfiammatori. L'obiettivo di questo studio è quello di definire strategie di ricerca utilizzando metodologie innovative, al fine di sviluppare efficaci terapie per l'ictus cerebrale. Infatti, lo scopo di tale lavoro è quello di caratterizzare nuovi approcci di tipo farmacologico, in quanto quelli finora emersi dai precedenti studi di base, non si sono rivelati clinicamente rilevanti.

Studi recenti hanno messo in evidenza gli effetti neuroprotettivi della leptina, suggerendo un suo potenziale impiego nel trattamento delle patologie neurodegenerative. I meccanismi alla base della neuroprotezione sembrano piuttosto complessi e fino ad oggi non sono stati completamente chiariti.

Pertanto i principali obiettivi del presente lavoro di ricerca sono stati i seguenti:

- I. Caratterizzare la neuroprotezione da leptina *in vivo* in un modello sperimentale di ischemia cerebrale focale permanente nel ratto.
- II. Valutare gli effetti a lungo termine della leptina sul danno cerebrale e sul deficit neurologico indotti dall'ischemia focale permanente nel ratto.
- III. Analizzare i meccanismi molecolari alla base della neuroprotezione dell'adipochina mediante analisi di immunofluorescenza e di frazionamento subcellulare. Tali tecniche molecolari sono state utilizzate

per valutare l'eventuale contributo degli astrociti e dell'attivazione e traslocazione nucleare di STAT-3 e della modulazione di Akt.

- IV. Studiare il ruolo della proteina *scaffold* homer-1a e caratterizzare la funzione degli astrociti reattivi nei meccanismi alla base del danno ischemico, mediante tecniche avanzate di microscopia elettronica e ricostruzione di immagini 3D.

Sotto il profilo dei risvolti terapeutici, l'insieme dei risultati ottenuti consentirà di definire nuove conoscenze di tipo farmacologico-molecolare alla base dell'insulto ischemico, al fine di caratterizzare nuovi potenziali *targets* per il recupero e la riparazione del tessuto cerebrale danneggiato.

3 – MATERIALI E METODI

3.1 – Animali e trattamento farmacologico

Il presente lavoro di Dottorato è stato condotto su ratti maschi adulti (280-320g) del ceppo Wistar (Charles River, Calco, CO, Italy), stabulati in condizioni controllate di temperatura (22°C) ed umidità relativa (65%), sottoposti a condizioni d'illuminazione artificiale controllata, con un ciclo luce/buio di 12 ore, con libero accesso a cibo ed acqua.

Gli animali sono stati trattati con leptina ricombinante di ratto (ProSpec-Tany TechnoGene Ltd., Rehovot, Israel) (0,1 o 1 mg/kg) o con il veicolo (PBS, 1ml/kg) somministrati per via sottocutanea (s.c.) 6 h, 3 h o immediatamente prima dell'MCAo. Per valutare gli effetti della leptina sul peso corporeo, i ratti sono stati pesati immediatamente prima della chirurgia e ogni giorno fino al sacrificio.

Tutte le procedure sperimentali sono state eseguite in accordo con le direttive comunitarie del 24 novembre del 1986 (86/609/EEC), incluse nel D.M. 116/1992 del Ministero della Salute Italiano.

3.2 – Ischemia cerebrale focale

La maggior parte dei modelli d'ischemia cerebrale focale prevede l'occlusione di uno dei principali vasi sanguigni cerebrali, come l'arteria cerebrale media (MCA), in piccoli animali (Garcia, 1984; Hossmann, 1991) o in animali di grossa taglia (Bose et al., 1984; Symon et al., 1975).

L'occlusione della MCA (MCAo) determina una riduzione del flusso ematico cerebrale nello striato e nella corteccia. Inoltre, il grado e la distribuzione della riduzione del flusso dipende dalla durata dell'occlusione, dal sito dell'occlusione lungo l'MCA e dalla quantità di vasi sanguigni collaterali, situati intorno al territorio dell'arteria cerebrale media.

Esistono numerosi modelli di MCAo che prevedono l'occlusione nella porzione prossimale o distale della MCA in maniera permanente o temporanea (riperfusion).

Nel presente lavoro l'ischemia cerebrale è stata indotta mediante l'occlusione dell'arteria cerebrale media, usando la tecnica del filamento intraluminale, come descritto da Longa et al (1989). Questo modello sperimentale realizzato da Koizumi et al., nel 1980 e da Longa nel 1989, è uno dei più utilizzati per lo studio del danno cellulare e della neuroprotezione.

I ratti sono stati anestetizzati con isoflurano al 5% in aria durante la fase di induzione, poi mantenuti alla minima concentrazione efficace (1,5-2%) dell'anestetico durante la procedura chirurgica. La temperatura corporea è stata misurata con una sonda rettale e mantenuta a 37°C mediante l'uso di un tappetino riscaldato.

La procedura chirurgica di base consiste nell'occludere l'origine della MCA con un filamento intraluminale, introdotto attraverso la carotide interna (Fig. 3.1). Con l'ausilio di uno stereomicroscopio, l'arteria carotide comune (CCA) è stata esposta attraverso un'incisione a livello del collo. Per mantenere questa posizione sono stati separati i muscoli digastrico, sternomastoideo e omoioideo. L'arteria carotide esterna è stata recisa ad una distanza di 3 mm dalla biforcazione dell'arteria carotide comune e legata con un filo di seta per sutura (4-0). Successivamente, nel seguente ordine, sono state isolate e termocauterizzate

le branche dell'arteria occipitale, dell'arteria carotide esterna, l'arteria superiore tiroidea e quella faringea ascendente (Fig. 3.2).

La fase successiva prevede l'impianto di due clip atraumatiche, una sulla CCA e l'altra sull'arteria carotide interna, per evitare la fuoriuscita di sangue al momento dell'inserimento del filamento. Un filamento di nylon ricoperto di silicone (diametro 0.28 mm, Docol corporation, Redlands, CA, USA) è stato, quindi, inserito nell'arteria carotide esterna e fatto avanzare lentamente nella carotide interna per circa 18 mm dalla biforcazione carotidea, fino ad incontrare una leggera resistenza, indicativa dell'avvenuta occlusione all'origine dell'MCA, in corrispondenza del circolo di Willis. Il filo di seta è stato tirato per fissare il nodo attorno al filamento per evitarne così lo spostamento e prevenire il sanguinamento. Dopo aver richiuso la ferita con punti metallici, la somministrazione dell'anestetico è stata interrotta. I ratti sham sono stati sottoposti alle stesse procedure chirurgiche, senza l'occlusione dell'arteria cerebrale media.

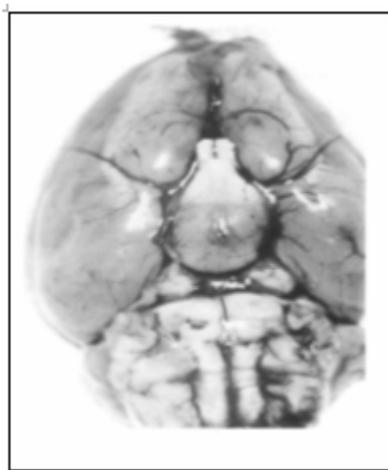


Fig. 3.1 – Cervello di ratto dopo occlusione dell'MCA con un filamento di nylon inserito nella carotide interna.

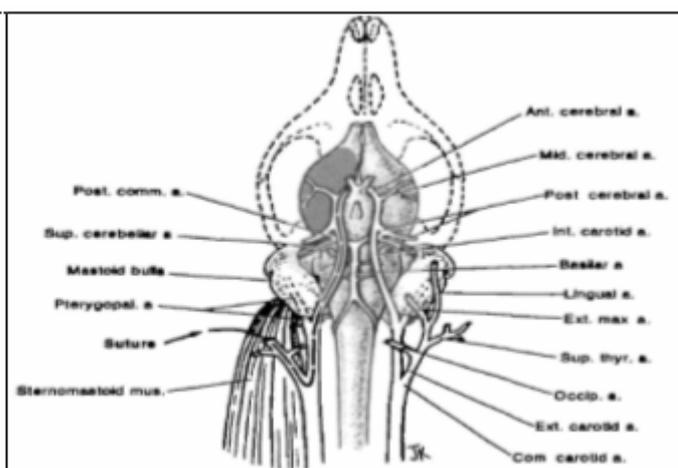


Fig. 3.2 – Anatomia cerebrovascolare di ratto.

Tra i modelli sperimentali di ischemia cerebrale focale, l'MCAo è sicuramente uno dei più utilizzati nel ratto e nel topo. Tra le caratteristiche più importanti ricordiamo che è poco invasivo e permette di effettuare un'ischemia di tipo permanente o transitoria in maniera controllata. Inoltre, permette di ottenere, con elevata riproducibilità, l'area di infarto che coinvolge la corteccia frontoparietale ed il caudatoputamen laterale.

I principali svantaggi di questo modello sperimentale di ischemia cerebrale focale sono la rottura dei vasi, la susseguente emorragia subaracnoidea, l'ipertermia e l'inadeguata occlusione dell'arteria cerebrale media. L'utilizzo dei filamenti ricoperti di silicone e la misurazione del flusso ematico cerebrale, mediante laser-doppler, riducono l'insorgenza di emorragie subaracnoidee e permettono di monitorare l'avvenuta occlusione della MCA (Schmid-Elsaesser et al., 1989).

Invece l'aumento della temperatura è dovuto ad un danno ipotalamico e si verifica in tutti gli animali che hanno subito almeno 2h di MCAo (Li et al., 1999).

3.3 – Analisi del flusso ematico cerebrale

Durante la chirurgia, il flusso ematico cerebrale (CBF) è stato costantemente monitorato a livello della corteccia cerebrale, dell'emisfero ischemico, tramite fluorimetria laser doppler (Periflux System 5000, Perimed, Stockolm, Sweden). Mediante questo strumento è possibile rilevare la perfusione dei tessuti. Il suo meccanismo d'azione si basa su una luce laser a bassa potenza che viene indirizzata sul tessuto in esame. I corpuscoli in movimento (eritrociti) provocano una variazione della lunghezza d'onda della luce laser proporzionale alla loro velocità. La luce riflessa viene captata da un fotorilevatore ed

istantaneamente analizzata dallo strumento. Il laser doppler misura pertanto la perfusione tissutale, cioè la velocità media di globuli rossi contenuti nel volume del campione, moltiplicata per la quantità dei globuli rossi in movimento.

In realtà, il laser doppler misura i cambiamenti della perfusione in unità arbitrarie che non è possibile esprimere in valore assoluto. Durante l'MCAo possono insorgere una serie di complicazioni, come la mancata occlusione della MCA, (Nagasawa & Kogure 1989), la formazione di emorragie subaracnoidee (Longa et al., 1989) o una prematura riperfusione (Schmid-Elsaesser, 1989). Tali inconvenienti possono essere evitati attraverso l'utilizzo di questo strumento.

Prima di iniziare la procedura chirurgica, viene praticata un'incisione sulla testa dell'animale, fra l'occhio e l'orecchio destri, esponendo l'osso parietale, sul quale poi verrà posizionata la sonda (2 mm posteriormente e 6 mm lateralmente dal bregma). Il flusso ematico è stato monitorato a partire da 15 minuti prima dell'inizio dell'ischemia fino a 10 minuti dopo l'occlusione dell'MCA, mantenendo gli animali sotto anestesia con isoflurano. Le modificazioni regionali del flusso ematico cerebrale sono state espresse in percentuale rispetto ai valori basali preischemici.

3.4 – Neuropatologia e quantificazione del danno ischemico

Per quantificare il volume e l'area di infarto cerebrale, in seguito ad occlusione dell'arteria cerebrale media, abbiamo impiegato una tecnica colorimetrica che prevede l'utilizzo del cloruro di 2,3,5-trifeniltetrazolio (TTC).

Gli animali sono stati sacrificati mediante decapitazione ed i cervelli sono stati rapidamente prelevati e tagliati in 8 sezioni coronali consecutive, ad intervalli di 2 mm dal lobo frontale utilizzando un calco per il cervello di ratto (Harvard Apparatus, Massachusetts, USA).

Il TTC è un reagente per enzimi ossidativi ed è stato introdotto per la prima volta da Jestaedt e Sandritter (1959), come colorante per rilevare il danno ischemico nel miocardio. Questo sale accetta un protone dalla succinato deidrogenasi, situata sulla membrana interna mitocondriale, riducendosi così in un composto insolubile di colore rosso che prende il nome di formazano (Altman, 1974; Bederson et al., 1986; Cole et al., 1990; Bednar et al., 1994; Belayev et al., 1999).

Il TTC consente di identificare le cellule in cui è stata mantenuta l'attività respiratoria, mentre le cellule dell'area ischemica, che non sono capaci di metabolizzare il composto, a causa dell'alterato funzionamento dei mitocondri, non si colorano e possono essere facilmente riconosciute.

Dopo un'incubazione di 10 minuti in una soluzione contenente TTC al 2% in salina a 37°C, le sezioni sono state trasferite in una soluzione di paraformaldeide al 4% in tampone fosfato e conservate a 4 C° prima di essere analizzate.

L'impiego di sali di tetrazolio come indicatori di enzimi respiratori mitocondriali è considerato un metodo riproducibile nella valutazione del danno ischemico nell'intervallo compreso tra 2,5 h e 36 h dopo l'induzione dell'ischemia (Liszczak et al., 1984). A tempi più tardivi l'intensa attivazione microgliale e l'infiltrazione dei leucociti, in cui i mitocondri sono perfettamente funzionali, potrebbero mascherare la presenza di un infarto tissutale.

In tal caso è preferibile utilizzare un'altra tecnica colorimetrica che si basa sulle caratteristiche chimico-fisiche di un altro colorante, il cresil violetto (CV), utilizzato per il tessuto nervoso in quanto capace di legare facilmente, essendo un colorante basico, i componenti acidi del citoplasma neuronale, come l'RNA ribosomiale ed i nucleoli (Alvarez-Buylla et al., 1990). Il CV non è una molecola specifica per i neuroni, ma grazie all'elevata presenza di corpi di Nissl nelle cellule nervose, li colora intensamente. Il CV colora di blu intenso l'area del cervello funzionale e di un blu poco brillante l'area di infarto cerebrale. Il TTC ed il CV mostrano un'elevata correlazione nell'area e nel volume di infarto indicando che entrambi i metodi sono adatti per misurazioni accurate del danno (Tureyen et al., 2004). Per i motivi sopra esposti, però, per la valutazione del danno oltre le 36 h dall'insulto è preferibile usare la colorazione con CV.

Pertanto, per valutare il volume di infarto 3 e 7 giorni dopo l'MCAo, i cervelli sono stati rapidamente prelevati e congelati con isopentano raffreddato in ghiaccio secco. Otto sezioni coronali dello spessore di 20 μ m sono state tagliate ad intervalli di 2mm a partire dal lobo frontale, utilizzando un criostato, montate su vetrini e successivamente colorate per immersione in una soluzione al 2,5 % di cresil violetto. Dopo un breve lavaggio in tampone fosfato, le sezioni sono state lasciate all'aria e, una volta asciutte, coperte con un vetrino coprioggetto.

Le immagini delle sezioni colorate con TTC o CV sono state acquisite con uno scanner digitale ed analizzate con un software di analisi di immagini (ImageJ 1.30v). Il volume di infarto è stato calcolato sommando il valore dell'area di tutte le sezioni moltiplicato per la distanza (2 mm) fra di esse.

3.5 – Valutazione del deficit neurologico

Al fine di valutare la variazione dello stato neurocomportamentale dei ratti soggetti ad occlusione dell'arteria cerebrale media, abbiamo utilizzato il metodo di Longa et al. (1989) lievemente modificato. Il deficit neurologico di ogni ratto è stato valutato per sette giorni, dopo l'occlusione permanente dell'MCA. Il test comportamentale prevede l'attribuzione di un punteggio che dipende dalla gravità del danno cerebrale:

- Grado 0 (normale), non si osserva alcun deficit;
- Grado 1 (moderato), mancata estensione della zampa anteriore;
- Grado 2 (severo), diminuzione della resistenza ad una spinta laterale;
- Grado 3 (severo), movimento rotatorio spontaneo;
- Grado 4 (severo), assenza di movimento spontaneo;
- Grado 5 (severo), perdita di coscienza.

I disturbi motori sono causati dalle lesioni a livello della corteccia frontale e dello striato e la severità del deficit neurologico è correlata all'estensione del danno (Lashley et al., 1933).

Bederson et al. (1986) hanno messo in relazione la misura dell'area di infarto con il grado di danno neurologico per poter valutare la misura dell'area di infarto nei ratti sottoposti ad MCAo. I vantaggi di questo tipo di analisi sono la semplicità, la specificità e l'abilità nel distinguere i ratti che hanno un piccolo, medio o grande infarto cerebrale. Un deficit neurologico basso o pari a zero è indice, sicuramente, di una mancata oppure insufficiente ischemia (Ljunggjen et al., 1984; Symon et al., 1975), mentre potrebbe essere indicativo di un'emorragia subaracnoidea (Symon et al., 1975; Hudgins & Garcia, et al., 1970).

3.6 – Preparazione degli omogenati di tessuto cerebrale

Campioni individuali di tessuto corticale di ratti sham e ratti sottoposti a 3 o 24 h di ischemia cerebrale focale permanente (n=3 per gruppo sperimentale) sono stati rapidamente prelevati e omogeneizzati in un omogenizzatore di vetro utilizzando 6 volumi di tampone di lisi freddo contenente Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, NaCl 150 mM, EDTA 2 mM, EGTA 2 mM, Triton 1%, acido okadaico 1 nM, un cocktail di inibitori di proteasi (cod. P8340, Sigma, Milano, Italia) e un cocktail di inibitori di fosfatasi (cod. 524625, Calbiochem, La Jolla, CA, U.S.A.). I campioni sono stati centrifugati a 10000 x g per 15 min a 4 °C, il precipitato è stato scartato mentre il surnatante è stato destinato all'analisi.

La concentrazione proteica negli omogenati della corteccia cerebrale è stata determinata mediante il metodo DC per l'analisi delle proteine (Bio-Rad Laboratories, Milano). Questo metodo si basa sulla reazione delle proteine con una soluzione alcalina di tartrato di rame (reagente A) e con il reagente di Folin (reagente B). Due sono gli step per lo sviluppo del colore relativo soprattutto alla reazione con tirosina e triptofano: 1) reazione proteine (amminoacido)-Cu in mezzo alcalino; 2) reazione del reagente di Folin con il complesso formato nella reazione precedente. La seconda reazione avviene attraverso la perdita di uno, due o tre atomi di ossigeno e la conseguente produzione di una o più specie ridotte che hanno un caratteristico colore blu con la massima assorbanza a 750 nm e la minima a 450 nm. La lettura è stata effettuata a 690 nm impiegando uno spettrofotometro per micropiastre (Multiskan MS, Labsystems, Helsinki, Finlandia). Dopo la lettura dell'assorbanza dei singoli campioni è stato possibile risalire alla loro concentrazione proteica per interpolazione delle corrispettive assorbanze con una curva standard ottenuta con

concentrazioni note di albumina sierica bovina (BSA; Sigma, Milano). Questi calcoli sono stati effettuati utilizzando il programma GraphPad Prism.

3.7 – Frazionamento subcellulare

Gli estratti di proteine nucleari e citosoliche sono stati ottenuti dalla corteccia cerebrale dei ratti sacrificati 3 h e 24 h dopo l'ischemia o l'operazione sham (n=3 per gruppo sperimentale). I tessuti sono stati prima omogenati in un tampone ipotonico freddo contenente sucrosio 320 mM, Tris-HCl 10 mM, pH 7.4, acido ocaidico 1 nM, un cocktail di inibitori delle proteasi (code P8340, Sigma) e un cocktail di inibitori di fosfatasi (code 524625, Calbiochem).

Gli omogenati sono stati centrifugati due volte a 1300 g per 5 minuti per ottenere il pellet contenente i nuclei. I surnatanti sono stati prelevati e centrifugati a 17000 g per 10 minuti ottenendo così dei pellet con la frazione mitocondriale e dei surnatanti. Questi ultimi sono stati sottoposti ad un' ulteriore centrifugazione a 100000 g per un'ora ottenendo, in tal modo, le frazioni citosoliche.

I pellet nucleari sono stati risospesi in 0,35 ml di tampone di sucrosio, sottoposti a tre cicli di congelamento e scongelamento e sonicati per 30 secondi in ghiaccio; le sospensioni nucleari ottenute sono state centrifugate a 40000 g per 30 minuti per rimuovere il materiale insolubile. La concentrazione delle proteine è stata determinata utilizzando il Bio-Rad DC protein assay (Bio-Rad Laboratories, Milano) come sopra descritto. Tutte le procedure sono state eseguite ad una temperatura stabile di 4 C°.

La procedura di frazionamento è stata validata mediante western blotting utilizzando anticorpi specifici per le diverse frazioni (Fig. 3.3).

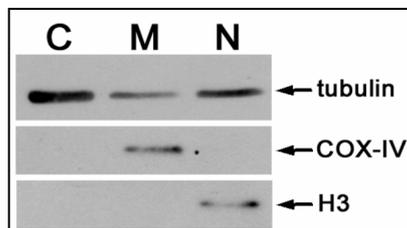


Fig. 3.3 – Approprietezza della procedura di frazionamento cellulare: C= frazione citosolica; M= frazione mitocondriale marcata con un anticorpo anti-citocromo c-ossidasi (COX) IV ed N= frazione nucleare marcata con un anticorpo anti-istone H3.

3.8 – Western blotting

Le proteine contenute negli omogenati corticali sono state separate mediante elettroforesi su gel di poliacrilammide con sodio dodecilsolfato (SDS-PAGE, 8%). Il gel di poliacrilammide viene preparato facendo polimerizzare monomeri di acrilammide in presenza di piccole quantità di N,N'-metilenbisacrilammide. La polimerizzazione inizia con l'aggiunta di ammonio persolfato (APS) e della tetrametiletilendiammina (TEMED). Il TEMED catalizza la decomposizione dello ione persolfato: si producono radicali liberi che attaccano i monomeri di acrilammide e ne avviano la polimerizzazione. I gel denaturanti contengono, inoltre, anche SDS, un detergente anionico che denatura le proteine e conferisce loro carica negativa.

Infine, le proteine sono state elettrotrasferite dal gel su una membrana di nitrocellulosa (Optitran BA-S 83, Schleicher & Schuell Bioscience, Dassel, Germany).

La membrana di nitrocellulosa è stata incubata per una notte a 4 °C con un anticorpo primario diretto contro la proteina di interesse. In particolare, sono stati utilizzati i seguenti anticorpi primari policlonali prodotti nel coniglio (Cell Signaling Technology, Beverly, MA, U.S.A.): Anti pSTAT-3 (Tyr705) diluizione 1:1000 (codice 9131), Anti STAT-3 diluizione 1:1000 (codice 9132), Anti p-Akt diluizione 1:1000 (codice 9271), anti Akt diluizione 1:2000 (codice 9272), anti-istone H3 1:500, anti-citocromo c-ossidasi IV (codice 4850). Sono stati inoltre utilizzati i seguenti anticorpi monoclonali prodotti nel topo: Anti TIMP-1 diluizione 1:200 (codice MAB13428, Chemicon International Inc.), anti actina diluizione 1:2000 (clone AC-40; Sigma), anti- α -tubulina diluizione 1:30000 (clone B-5-1-2; Sigma).

Per visualizzare l'interazione antigene-proteina la membrana è stata incubata per 1 ora, a temperatura ambiente, in una soluzione contenente un anticorpo secondario coniugato con la perossidasi di rafano. Per la rivelazione della perossidasi è stato utilizzato il metodo della chemiluminescenza intensificata (Amersham Biosciences, GE Healthcare, Milan, Italy) e l'esposizione a film per raggi X (Hyperfilm ECL, Amersham Biosciences).

La chemiluminescenza intensificata consiste nella reazione della perossidasi con il substrato chemiluminescente luminolo: in presenza di perossido di idrogeno la perossidasi di rafano ossida il luminolo con la concomitante produzione di luce. I film autoradiografici sono stati esaminati e successivamente è stata effettuata un'analisi densitometrica utilizzando il software Quantiscan (Biosoft, Cambridge, UK).

3.9 Immunoistochimica

Nel presente lavoro, per valutare la localizzazione cellulare del fattore di trascrizione STAT-3 abbiamo utilizzato un'analisi immunoistochimica con specifici markers per astrociti e neuroni.

Gli animali sono stati anestetizzati 3 h e 24 h dopo l'induzione dell'ischemia con sodio pentobarbital (60 mg/Kg i.p.) e perfusi attraverso il cuore con salina (0.9 % di NaCl) seguita da paraformaldeide al 4 % in tampone fosfato (PB 0,1 M pH 7,4), contenente NaF 50 mM.

Successivamente, il cervello è stato rapidamente prelevato e post fissato in paraformaldeide al 4% per 2 h. Dopo tre lavaggi in PB, il cervello è stato crioprotetto in una soluzione di saccarosio al 30 % in PB a 4 °C e poi congelato utilizzando un criostato, da ogni cervello sono state ottenute sezioni coronali di 40 µm, a livello delle regioni cerebrali irrorate dall'MCA (1.7 – 3.3 dal bregma, Davies et al., 1998). Le sezioni sono state immerse in PB e conservate a 4 °C prima di essere processate per l'immunofluorescenza.

La procedura sviluppata da Munzberg et al. (2003) è stata parzialmente modificata per l'immunofluorescenza di pSTAT-3. Le sezioni sono state pre-incubate in una soluzione acquosa contenente NaOH (1%) e H₂O₂ (1%) per 20 min al fine di smascherare gli antigeni. Successivamente sono state trasferite in una soluzione contenente glicina (0,3% in PB) per 10 min per bloccare il quenching delle aldeidi e infine in sodio dodecilsolfato (0,03 % in PB) per 10 min al fine di facilitare la rilevazione delle proteine nucleari (Wilson & Bianchi, 1999). Tale procedura migliora la rilevazione di antigeni fosforilati mediante immunofluorescenza.

Dopo due lavaggi in PB, le sezioni sono state incubate per un'ora con una soluzione che blocca il legame aspecifico, (3% normal Donkey serum, 0.2% Triton X-100, 0.2% di

Sodio Azide in PB), l'anticorpo secondario legherà e rivelerà così solo l'anticorpo primario, per cui il legame sarà specifico.

Successivamente, per gli studi di colocalizzazione, le sezioni sono state incubate con i seguenti anticorpi primari per 24 ore: rabbit polyclonal anti-p-STAT-3 (diluizione 1:200; Tyr705, Cell Signaling Technology), mouse anti-GFAP (anti-gial fibrillary acidic protein; diluizione 1:200; Chemicon International, Temecula, CA) marker specifico per gli astrociti o mouse anti-NeuN (anti-neuronal nuclei; diluizione 1:200; Chemicon International, Temecula, CA) specifico per i neuroni.

Per l'analisi di homer condotta su ratti P7 e P30 sottoposti ad MCAo sono stati usati i seguenti anticorpi: rabbit polyclonal anti-homer-1b/c (diluizione 1:50; Santa Cruz Biotechnology); goat polyclonal anti-homer-1a (diluizione 1:50; Santa Cruz Biotechnology); Rabbit polyclonal GFAP (diluizione 1:1000; Chemicon International, Temecula, CA); Mouse polyclonal S100 β (diluizione 1:1000; Sigma-Aldrich). Dopo tre lavaggi in PB, fondamentali per eliminare l'eccesso di anticorpo primario legato su siti aspecifici, l'anticorpo primario correttamente legato al proprio antigene è poi localizzato mediante l'uso dell'anticorpo secondario, attuando un'incubazione in un luogo in cui si deve avere totale assenza di luce. È in questo modo che si evita il "photobleaching", ossia l'alterazione e la perdita d'intensità di fluorescenza del fluoroforo coniugato all'anticorpo secondario, evento che porterebbe a ottenere segnali più deboli.

Le sezioni, quindi, sono state incubate per 2 h a temperatura ambiente con una soluzione contenente gli anticorpi secondari: Alexa Fluor 488 donkey anti-rabbit, Alexa Fluor 594 donkey anti-mouse IgG e Alexa Fluor 594 donkey anti-goat (diluizione 1:400; Molecular Probes, Invitrogen, Milano, Italia).

Infine i nuclei sono stati marcati con DAPI (diluzione 1:500; Sigma-Aldrich, Milan, Italy). Il DAPI è un colorante fluorescente che lega fortemente il DNA. Attraversa facilmente le membrane cellulari ed è utilizzato per colorare le cellule vive o fissate. Nella microscopia a fluorescenza il DAPI viene eccitato dalla luce ultravioletta, quando lega la doppia elica di DNA ha un massimo di assorbimento a 358 nm ed un'emissione massima a 462 nm. Le sezioni sono state montate su dei vetrini gelatinizzati, lasciate asciugare all'aria e ricoperte con Fluoromount (Diagnostic BioSystems, Pleasanton, CA, USA) per far aderire il copri oggetto e preservare la fluorescenza.

L'acquisizione delle immagini è stata effettuata mediante un microscopio a fluorescenza (Leica DMI6000B) equipaggiato con una telecamera digitale ad alta risoluzione (Leica DFC350FX) e software specifico (LAS AF6000).

L'immunolocalizzazione del segnale di homer è stata effettuata mediante microscopio a laser confocale (Leica TCS-SP5), con un piano apocromatico 40 x. Le immagini sono state acquisite tutte a 0.4 micron e ricostruite mediante un software confocale (LAS AF Lite; Leica).

Analisi dei dati

I dati sono espressi come media \pm S.E.M. e analizzati mediante ANOVA. L'analisi statistica è stata eseguita come specificato nelle singole figure. Valori di $P < 0,05$ sono stati considerati statisticamente significati.

3.10 – Microscopia elettronica

Anestesia e fissazione

Per l'analisi sono stati utilizzati ratti maschi Sprague-Dawley a P7, anestetizzati mediante sodio pentobarbitale, somministrato i.p. a una dose di 6 mg/100 g di peso corporeo. I ratti sono stati immediatamente sottoposti a perfusione intracardiaca con PFA al 4% e glutaraldeide 0.1% in PB. Dopo un'ora dalla perfusione, i cervelli sono stati prelevati e tagliati al vibratomo (Leica VT100) in sezioni di 60 μm a livello della corteccia frontale. Le sezioni appartenenti a tale regione sono state identificate mediante l'ausilio di uno stereomicroscopio,

Immunoistochimica con DAB ed acquisizione delle immagini al microscopio elettronico

Le sezioni ottenute sono state crioprotette con una soluzione di glicerolo al 2% e DMSO al 20% in PBS per 15 minuti e congelate e scongelate due volte in azoto liquido, al fine di migliorare la penetrazione dell'anticorpo. Dopo tre lavaggi in PBS (0.1 M, a pH 7.4), le sezioni sono state pretrattate con perossido di idrogeno 0.3 % in PBS per 10 minuti. Prima di effettuare il trattamento con l'anticorpo primario, le sezioni sono state bloccate con NGS al 5% e BSA-c allo 0.1% in PBS (Aurion, The Netherlands) e poi incubate overnight a 4°C con l'anticorpo primario (diluzione 1:50; rabbit anti-homer-1a, Santa Cruz biotechnology). Dopo aver effettuato i lavaggi le sezioni sono state trattate con l'anticorpo secondario biotinilato (diluzione 1:400; frammento anticorpale goat anti-rabbit, Jackson Laboratories, USA). Dopo 4 h di incubazione, le sezioni sono state incubate prima per 2 h in un complesso avidina-

biotina perossidasi (ABC, Elite, Vector Laboratories, USA) e successivamente con una soluzione di 3,3' diamino benzidine tetrachloride (DAB) allo 0,04% (Fluka, Switzerland) e H₂O₂ allo 0.015%. Dopo aver trattato le sezioni con il complesso DAB per l'amplificazione del segnale, esse sono state post-fissate in tetrossido di osmio al 4 % e con acetato di uranile. Le sezioni così ottenute sono state montate su vetrini in resina Ducarpan ACM (Fluka). La resina viene fatta asciugare per 48 h ad una temperatura di 60°C.

Infine mediante l'ausilio di uno stereomicroscopio si identifica la regione della corteccia prefrontale mediale e ne viene preparato un trapezoide della lamina V. Successivamente vengono tagliate delle sezioni seriali di 60 nm utilizzando un ultramicrotomo (Leica, EM UC6) e sistemate poi su apposite microgriglie in oro. Le immagini sono state acquisite mediante un microscopio elettronico Phillips CM10 con filamento in tungsteno di 80kV e raccolte poi utilizzando una camera digitale (MegaView III, SIS, Munich, Germany). Le immagini sono state allineate utilizzando il software photoshop (Adobe, San Jose, California, Stati Uniti) ed analizzate mediante NeuroLucida Software (MicroBrightfield, Williston, Vermont, Stati Uniti)

Ricostruzione tridimensionale di sezioni seriali di microscopia elettronica ed analisi

La serie di immagini acquisite mediante microscopio elettronico sono state arrangiate in sequenza e automaticamente allineate usando un plugin TrackEM2 , attraverso il software Fiji. Una volta allineate, le strutture d'interesse (i processi astrocitari contenenti i prodotti di reazione della DAB) sono state riconosciute morfologicamente e selezionate manualmente su ogni sezione d'immagine. Successivamente sono stati generati dei modelli tridimensionali mediante il software Fiji , esportate e ricostruite tramite il software Blender.

I parametri morfologici maggiormente evidenti sono stati automaticamente valutati mediante software Fiji. Il volume totale ricostruito del neuropilo corrisponde all'area totale di ciascuna sezione per lo spessore di una singola sezione (60 nanometri). Le sinapsi asimmetriche (glutammatergiche) sono state classificate in 4 tipologie, in relazione all'elemento sinaptico in contatto con il processo astrocitario.

4 – RISULTATI

4.1 La somministrazione sistemica di leptina riduce il danno cerebrale indotto nei ratti da 24 h di MCAo permanente

La somministrazione sistemica di leptina riduce significativamente il danno cerebrale indotto da 24 h di MCAo permanente nei ratti. Infatti, la leptina, somministrata (per via sottocutanea) alla dose di 1 mg/kg 3 h prima dell'MCAo, riduce in maniera significativa l'area ed il volume di infarto cerebrale nei ratti sottoposti ad ischemia (figure 4.1 e 4.2)

La stessa dose di leptina, invece, somministrata 6 h o immediatamente prima dell'induzione dell'ischemia non ha alcun effetto significativo sul volume di infarto. Negli animali (n=3) a cui è stata somministrata una dose bassa di leptina (0,1 mg/kg, 3 h prima l'MCAo) il volume di infarto cerebrale ($534,9 \pm 56 \text{ mm}^3$) è comparabile con quello degli animali controllo (n=5) ($508,1 \pm 35,9 \text{ mm}^3$).

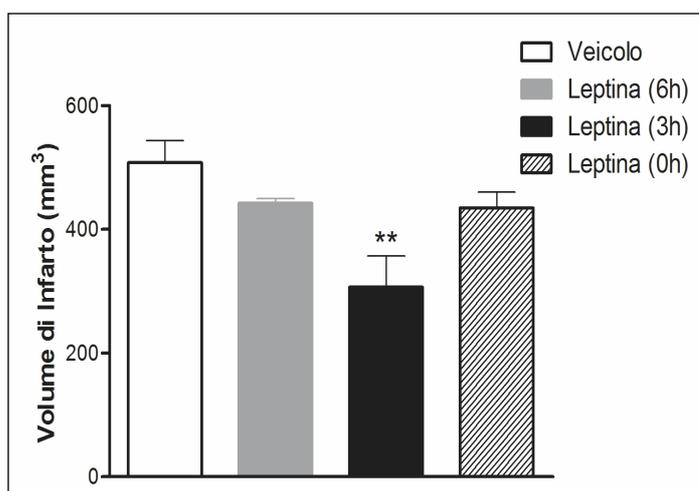


Fig. 4.1 – La somministrazione sistemica (sotto cutanea) di leptina (1 mg/kg, 3h prima dell'MCAo), riduce significativamente il volume di infarto cerebrale nei ratti sottoposti ad occlusione permanente dell'MCA. Invece la somministrazione della stessa dose di leptina 6 h e immediatamente prima (0h) dell'induzione dell'ischemia non modifica il volume di infarto cerebrale rispetto a quello osservato negli animali trattati con il solo veicolo. Il volume di infarto cerebrale è stato

misurato dopo 24 h di MCAo permanente mediante tecnica colorimetrica con TTC come descritto nel capitolo "Materiali e metodi". ** P<0,01 vs veicolo (ANOVA ad una via seguita dal test di Dunnett; n=5-6 ratti per gruppo sperimentale).

Il danno cerebrale causato dall'occlusione permanente dell'MCA coinvolge quelle regioni cerebrali irrorate dall'arteria cerebrale media, ovvero la corteccia frontoparietale e lo striato (figura 4.2A).

La somministrazione di leptina (1 mg/kg s.c. 3 h prima l'MCAo) riduce in maniera significativa il danno cerebrale nelle regioni di penombra ischemica come il caudato putamen mediale e la corteccia motoria (figure 4.2A e 4.2B).

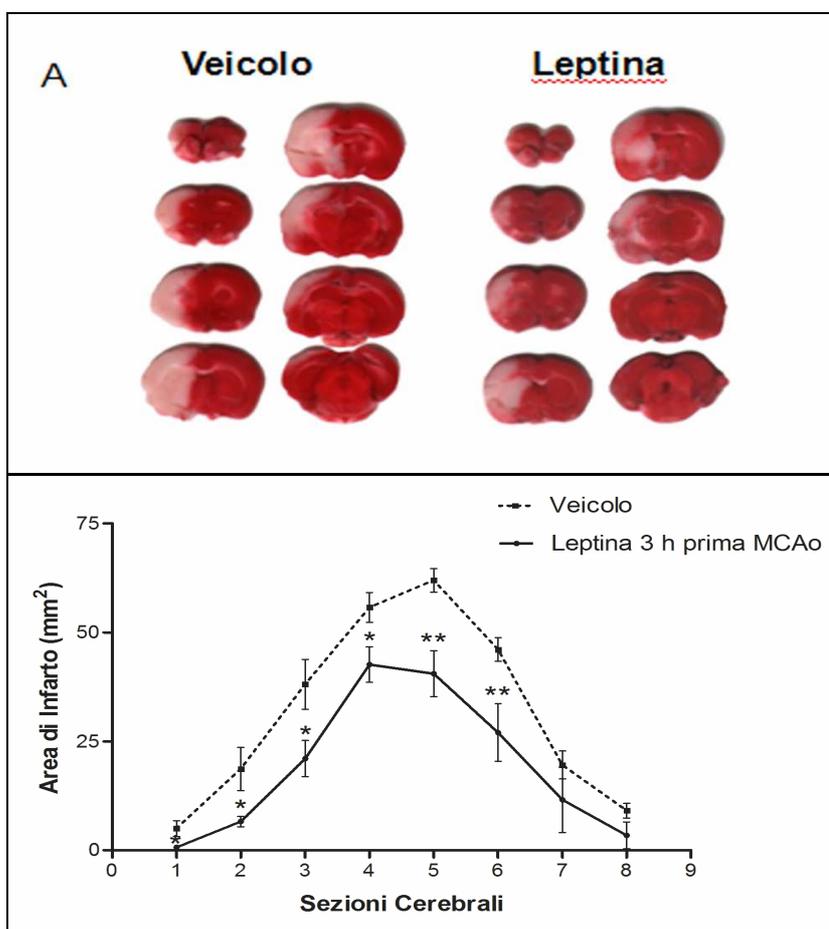


Fig. 4.2 – **A**) Sezioni cerebrali rappresentative colorate con TTC e **(B)** Valori dell'area di infarto cerebrale di ratti sottoposti a 24 di MCAo permanente, trattati (s.c.) con veicolo (PBS, 1 ml/kg) o leptina (1 mg/kg) 3h prima dell'induzione di ischemia. Il danno cerebrale ischemico (area non colorata) coinvolge tutte le regioni del tessuto cerebrale irrorate dall'arteria cerebrale media, inclusi striato e corteccia. La somministrazione di leptina riduce il danno cerebrale ischemico nelle regioni perifocali come il caudato putamen mediale e la corteccia motoria. * $P < 0,05$ e ** $P < 0,01$ verso le corrispondenti sezioni cerebrali degli animali trattati con veicolo (Test "t" di Student, $n=6$ ratti per gruppo sperimentale).

4.2 – La somministrazione sistemica di leptina non modifica il flusso ematico cerebrale nei ratti sottoposti ad MCAo permanente

Per escludere la possibilità che la neuroprotezione ottenuta con la leptina sia dovuta ad un'alterazione della perfusione sanguigna cerebrale, abbiamo monitorato il flusso ematico cerebrale (CBF) negli animali sottoposti a pMCAo trattati sia con leptina che con veicolo. Non è stata evidenziata alcuna modificazione del flusso ematico cerebrale da parte della leptina sia prima che dopo l'MCAo (fig. 4.3). La riduzione del CBF corticale, monitorata per 10 minuti dopo l'MCAo è stata di $21 \pm 3\%$ del basale negli animali trattati con veicolo (PBS 1 ml/kg) mentre nei ratti trattati con leptina (1 mg/kg s.c. 3 h prima l'MCAo) è stata di $18 \pm 3\%$ del basale.

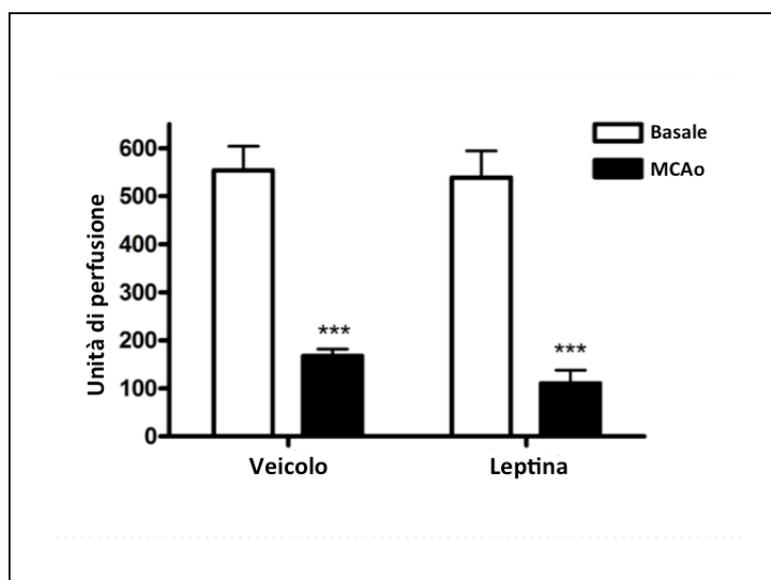


Fig. 4.3 – La somministrazione s.c. di leptina (1 mg/kg, 3 h prima l'induzione dell'MCAo) non modifica il flusso ematico cerebrale dei ratti sottoposti a 24 h di MCAo permanente. La percentuale di riduzione del flusso sanguigno cerebrale misurato 10 minuti dopo l'induzione dell'MCAo negli animali a cui è stato somministrato il solo veicolo (PBS) è stata di $21 \pm 3\%$ del valore basale. Mentre negli animali trattati con leptina la riduzione è stata di $18 \pm 3\%$ del valore basale.

4.3 – Effetti a lungo termine della somministrazione sistemica acuta di leptina sul volume di infarto cerebrale e sul deficit neurologico indotti da MCAo

Per valutare gli effetti a lungo termine della leptina abbiamo misurato il volume di infarto cerebrale, il deficit neurologico e il peso corporeo degli animali tre e sette giorni dopo l'MCAo.

Come si può osservare nella figura 4.4, tre e sette giorni dopo l'occlusione dell' MCA, la leptina somministrata acutamente (1 mg/kg s.c., 3 h prima dell'MCAo) riduce in maniera significativa il volume di infarto cerebrale

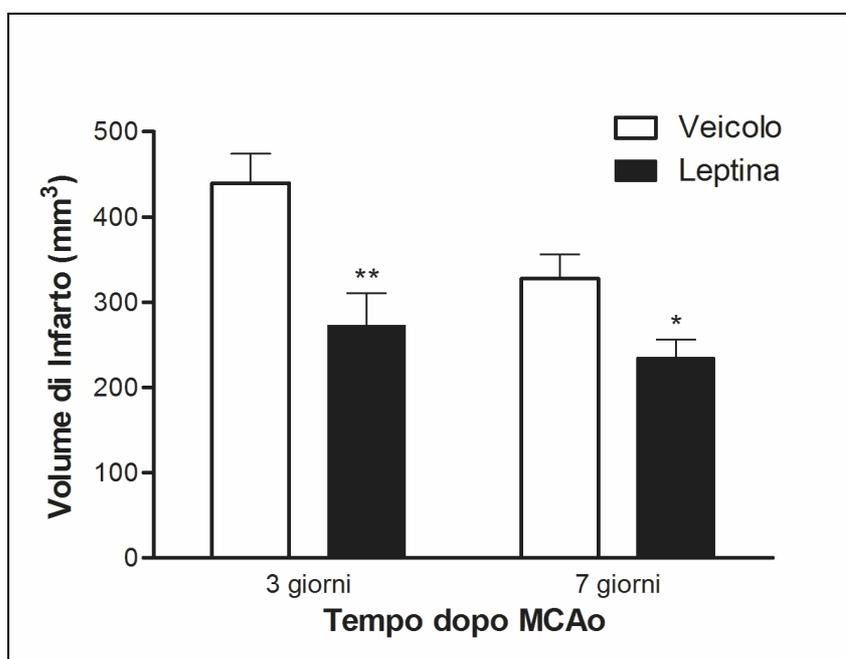
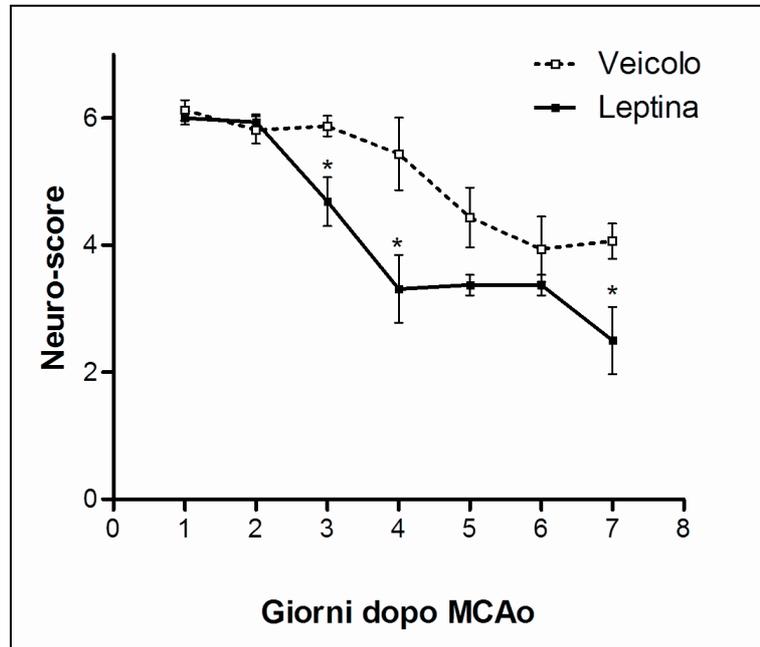


Fig. 4.4 – Volume di infarto cerebrale misurato tre e sette giorni dopo MCAo permanente nei ratti trattati (s.c.) con veicolo (PBS, 1 ml/kg) o leptina (1 mg/kg) 3 h prima dell'induzione di ischemia. *P<0,05 e **P<0,01 vs veicolo corrispondente (Test "t" di Student, n=4-6 ratti per gruppo sperimentale).

Inoltre, la somministrazione s.c. di leptina (1 mg/kg) riduce in modo significativo il deficit neurologico tre, quattro e sette giorni dopo l'induzione dell'MCAo (fig. 4.5A) mentre non si rileva alcuna modificazione del peso corporeo (fig. 4.5B) che di per sé risulta ridotto a seguito della procedura chirurgica e del tipo di danno cerebrale.

A



B

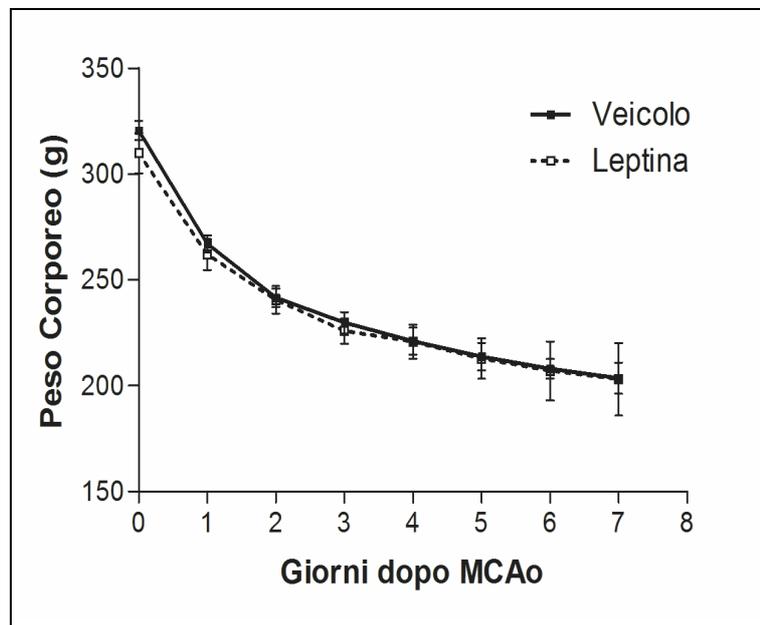


Fig. 4.5 – Neuroscore (A) e peso corporeo (B) misurati per 7 giorni consecutivi dopo occlusione permanente dell'MCAo nei ratti trattati (s.c.) con veicolo (PBS, 1 ml/kg) o leptina (1 mg/kg) 3 h prima l'induzione dell'ischemia. *P<0,05 vs neuroscore misurato negli animali trattati con veicolo (Test "t" di Student, n=4 ratti per gruppo sperimentale).

4.4 – Modulazione dei livelli di pSTAT-3 e p-Akt nella corteccia cerebrale dei ratti ischemici trattati con leptina

L'analisi di western blotting per l'espressione dei livelli di pSTAT-3 sugli omogenati di corteccia cerebrale ha evidenziato che l'immunoreattività di pSTAT-3 è molto bassa nella corteccia cerebrale degli animali sottoposti a (3 h e 24 h) operazione sham e nella corteccia controlaterale (non ischemica) dei ratti sottoposti a 3 h di MCAo (fig. 4.6)

Come mostrato in figura 4.6, i livelli di pSTAT-3 sono drammaticamente aumentati nella corteccia cerebrale ischemica (ipsilaterale) ($P < 0,001$) dei ratti sottoposti a 3h di occlusione permanente dell'MCA.

I livelli di fosforilazione di STAT-3 risultano ulteriormente aumentati nella corteccia ipsilaterale dopo 24 h di ischemia (fig. 4.6). A questi tempi è evidente anche un aumento dell'immunoreattività a livello controlaterale. Non sono rilevabili differenze fra gli animali trattati con leptina e quelli controllo (veicolo) dopo 3 h di MCAo, mentre dopo 24h di ischemia il trattamento con leptina potenzia l'aumento della fosforilazione di STAT-3 (Fig. 4.6). L'analisi di western blotting per p-Akt dimostra che i livelli di questa proteina sono simili negli omogenati corticali degli animali sham e nelle cortecce contro laterali degli animali sottoposti a 3h o 24h di MCAo (Fig 4.6).

L'insulto ischemico aumenta l'espressione di Akt fosforilata nella corteccia ischemica dei ratti sottoposti a 3 h di MCAo (fig 4.6). Inoltre non ci sono differenze significative nei livelli di questa proteina nell'emisfero ipsilaterale fra gli animali trattati con leptina e quelli iniettati con veicolo; tuttavia, si ha un aumento statisticamente significativo ($P < 0,05$) dell'espressione di p-Akt nei ratti trattati con leptina rispetto alla corteccia ischemica ipsilaterale dei ratti sham (fig. 4.6).

Al contrario dei livelli di fosforilazione di pSTAT-3, quelli di p-Akt non aumentano ulteriormente nella corteccia cerebrale dei ratti sottoposti a 24 h di ischemia; infatti, i livelli di p-Akt sono più bassi di quelli osservati a 3 h di MCAo sia dei gruppi veicoli che di quelli trattati (fig. 4.6). Questi dati dimostrano che l'aumento della fosforilazione di Akt in seguito ad un insulto ischemico è transitorio, mentre pSTAT-3 aumenta progressivamente fino a 24 h.

Inoltre, l'immunoreattività di pSTAT-3 aumenta anche nella corteccia controlaterale dei ratti sottoposti a 24 h di MCAo (fig 4.6). La leptina non ha effetto sul time course della fosforilazione di STAT-3 e di Akt indotta dall'insulto ischemico, ma aumenta selettivamente i livelli di p-Akt dopo 3 h di ischemia e quelli di pSTAT-3 dopo 24 h di MCAo (fig. 4.6).

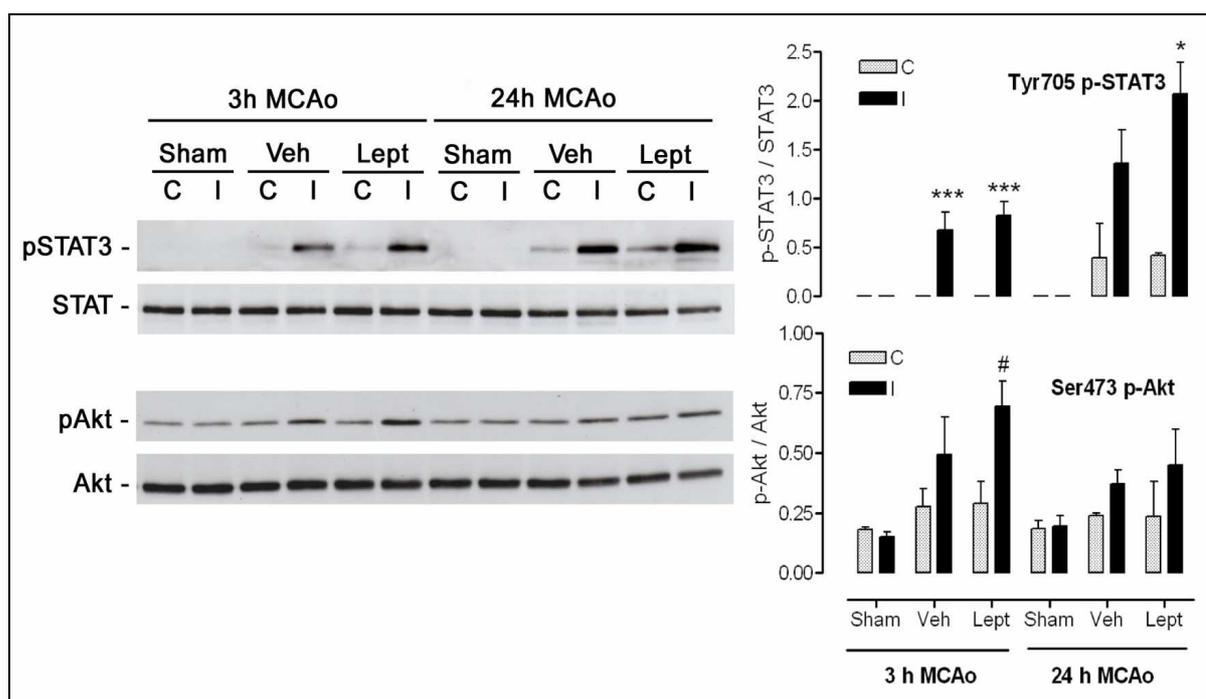


Fig. 4.6 – Effetti della leptina sulla fosforilazione di STAT-3 e Akt in seguito ad ischemia cerebrale focale Mediante analisi di western blotting sono stati misurati i livelli di espressione di pSTAT-3 (tyr705), STAT-3 totale, p-Akt (ser473) e Akt totale negli omogenati di corteccia cerebrale ipsilaterale (I) e controlaterale (C) dei ratti trattati con veicolo (veh) PBS (1ml/kg) o leptina (lept) 1 mg/kg, sottoposti a 3 h e 24 h di MCAo permanente. I risultati sono rappresentativi di tre differenti esperimenti. Gli istogrammi mostrano i risultati dell'analisi densitometrica delle bande autoradiografiche; * $P < 0,05$ e *** $P < 0,001$ vs contralaterale (C) . # $P < 0,05$ vs Sham 3 h.

4.5 – Modulazione dei livelli di pSTAT-3 e p-Akt nelle frazioni nucleari e citosoliche della corteccia cerebrale dei ratti ischemici trattati con leptina

La fosforilazione sui residui di tirosina presenti su STAT-3 può essere scatenata da diversi stimoli come citochine, fattori di crescita e ormoni. Tali fattori determinano la dimerizzazione di STAT-3 e la successiva traslocazione nel nucleo cellulare dove promuove la trascrizione di numerosi geni coinvolti nei processi di morte, proliferazione e sopravvivenza cellulare.

Pertanto, al fine di meglio caratterizzare la modulazione di STAT-3 da parte della leptina, abbiamo valutato se la neuroprotezione indotta dall'ormone è associata con variazioni dei livelli nucleari di pSTAT-3 nella corteccia dei ratti sottoposti ad ischemia permanente.

Nelle frazioni nucleari e citosoliche della corteccia controlaterale dei ratti sottoposti a 3 h di MCAo i livelli di pSTAT-3 sono bassi mentre a 24 h dall'occlusione dell'MCA si ha un forte aumento di pSTAT-3 nelle frazioni nucleari ma non in quelle citosoliche (fig. 4.7).

L'insulto ischemico aumenta significativamente i livelli di fosforilazione di STAT-3 sia nelle frazioni citosoliche che in quelle nucleari della corteccia ischemica ipsilaterale dei ratti sottoposti a 3 h di MCAo ($P < 0,05$ rispetto al controlaterale) e questo aumento risulta potenziato a 24 h di ischemia nelle frazioni nucleari ($P < 0,001$ vs 3 h) di corteccia cerebrale, ma non in quelle citosoliche.

Un simile andamento è stato osservato nella corteccia ischemica dei ratti trattati con leptina (fig. 4.7). Inoltre, rispetto al veicolo, la leptina aumenta i livelli di p-STAT-3 nelle frazioni nucleari ($P < 0,01$) dopo 3 h di MCAo mentre dopo 24 h di ischemia li aumenta significativamente ($P < 0,01$) nelle frazioni citosoliche (fig. 4.7).

L'immunoreattività di p-Akt è stata rilevata nelle frazioni nucleari e citosoliche delle cortecce dei ratti sottoposti ad operazione sham e in quelle controlaterali degli animali sottoposti a 3h o 24h di MCAo (fig. 4.7).

I livelli di fosforilazione di Akt aumentano nella corteccia ischemica dopo 3 h di MCAo in entrambe le frazioni cellulari, citosolica e nucleare, mentre dopo 24 h i livelli di Akt fosforilata non aumentano ulteriormente (fig. 4.7). Tuttavia, rispetto ai controlaterali gli aumenti più significativi di p-Akt ($p < 0,05$) sono stati rilevati nelle frazioni nucleari della corteccia ischemica dei ratti sottoposti a 24 h di occlusione permanente dell'MCA (fig. 4.7). La leptina non ha alcun effetto sul time course di p-Akt indotto dall'ischemia ma aumenta in maniera significativa i livelli di p-Akt nella frazione nucleare dei ratti sottoposti a 24 h di MCAo (fig. 4.7).

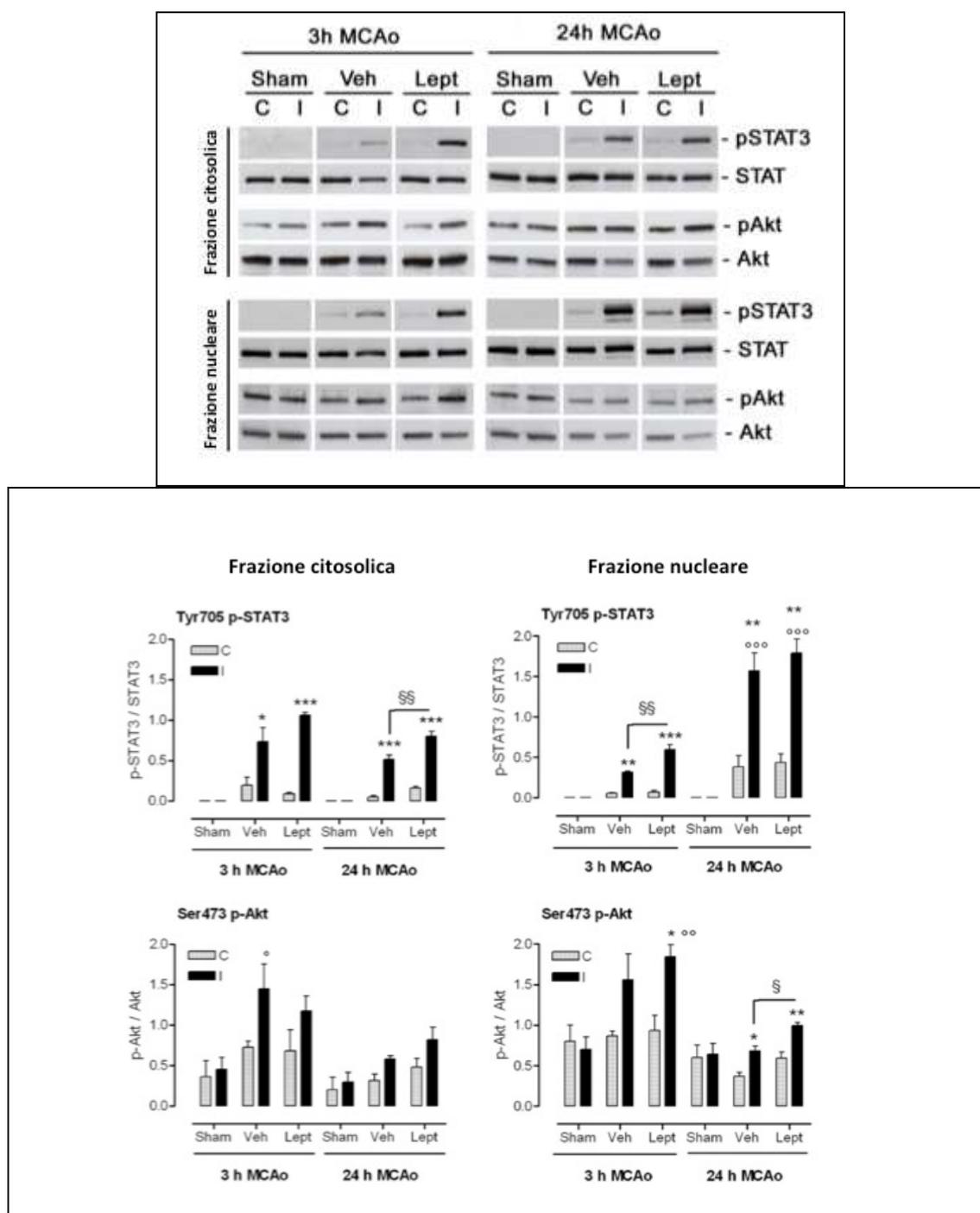


Fig. 4.7 – Modulazione della fosforilazione di STAT-3 e Akt nei nuclei e nel citosol corticali in seguito ad ischemia cerebrale focale: effetti della somministrazione di leptina. Mediante analisi di western blotting sono stati studiati i livelli di espressione di pSTAT-3 (Tyr705), STAT-3 totale, p-Akt (Ser473) e Akt totale nelle frazioni citosoliche e nucleari ottenute dagli omogenati di corteccia cerebrale ipsilaterale e controlaterale dei ratti che hanno ricevuto veicolo (PBS 1ml/kg) o leptina (1 mg/kg) sottoposti a 3 o 24 di MCAo permanente. I risultati sono rappresentativi di tre differenti esperimenti. Gli istogrammi mostrano i risultati dell'analisi densitometrica delle bande autoradiografiche; *P<0.05, **P<0.01 e ***P<0.001 vs contralaterale (C). §P<0.05 e §§P<0.01 (Leptina vs Veicolo). °P<0.05, °°P<0.01 e °°°P<0.001 (3h vs 24h).

4.6 – Analisi regionale e cellulare dell'espressione di pSTAT-3 nel cervello dei ratti ischemici trattati con leptina

Mediante esperimenti di immunofluorescenza abbiamo analizzato i livelli di espressione di pSTAT-3 in diverse aree cerebrali confermando, come già dimostrato con il western blotting (fig. 4.6), che questo fattore trascrizionale è debolmente attivato nei ratti sham (dati non mostrati), mentre risulta fortemente attivato nel cervello dei ratti sottoposti a pMCAo con una differente localizzazione regionale e cellulare a seconda della durata dell'insulto.

Infatti, dopo 3 h di MCAo permanente, l'immunoreattività di pSTAT-3 è significativamente aumentata nelle regioni di penombra dell'emisfero ipsilaterale, ovvero nello striato ventrale e nella corteccia motoria (fig. 4.8). Inoltre, l'immunoreattività di pSTAT-3 è stata rilevata nelle meningi, nella zona periventricolare dell'emisfero ipsilaterale e nella porzione esterna della corteccia motoria ipsilaterale (fig. 4.8 A-D).

Nel core, a livello striatale, dopo 3h di pMCAo, pSTAT-3 è stato rilevato solo nelle cellule intravascolari (dati non mostrati). Nella corteccia pSTAT-3 non aumenta nei neuroni, come dimostra l'analisi con il marker specifico per i neuroni NeuN (fig. 4.8 C,G,M,Q), ma in altri tipi cellulari ed in particolare negli astrociti (GFAP positivi) (fig. 4.9 C,G,M). Il pretrattamento con leptina (1 mg/kg s.c. 3 h prima dell'MCAo) aumenta significativamente l'espressione di pSTAT-3 nella penombra a livello corticale ed in particolare, nel nucleo degli astrociti localizzati nella corteccia motoria (fig. 4.9 G) e nello strato interno della corteccia frontale (fig. 4.9 M).

L'aumento dell'immunoreattività per pSTAT-3 indotto dal pretrattamento con leptina è stato anche osservato dopo 24 h di MCAo permanente (fig. 4.10). A questo stadio del

danno, l'immunoreattività di pSTAT-3 è stata principalmente rilevata a livello dei neuroni ed in altri tipi cellulari, molto probabilmente cellule microgliali delle regioni di perinfarto della corteccia motoria (fig. 4.10 A-H); mentre, nella regione del core a livello della corteccia parietale, pSTAT-3 non è espresso nei neuroni ma in altri tipi di cellule, verosimilmente microglia (fig. 4.10 O-R). Invece nel layer interno della corteccia frontale, c'è un evidente colocalizzazione del segnale di pSTAT-3 con GFAP (fig. 4.11).

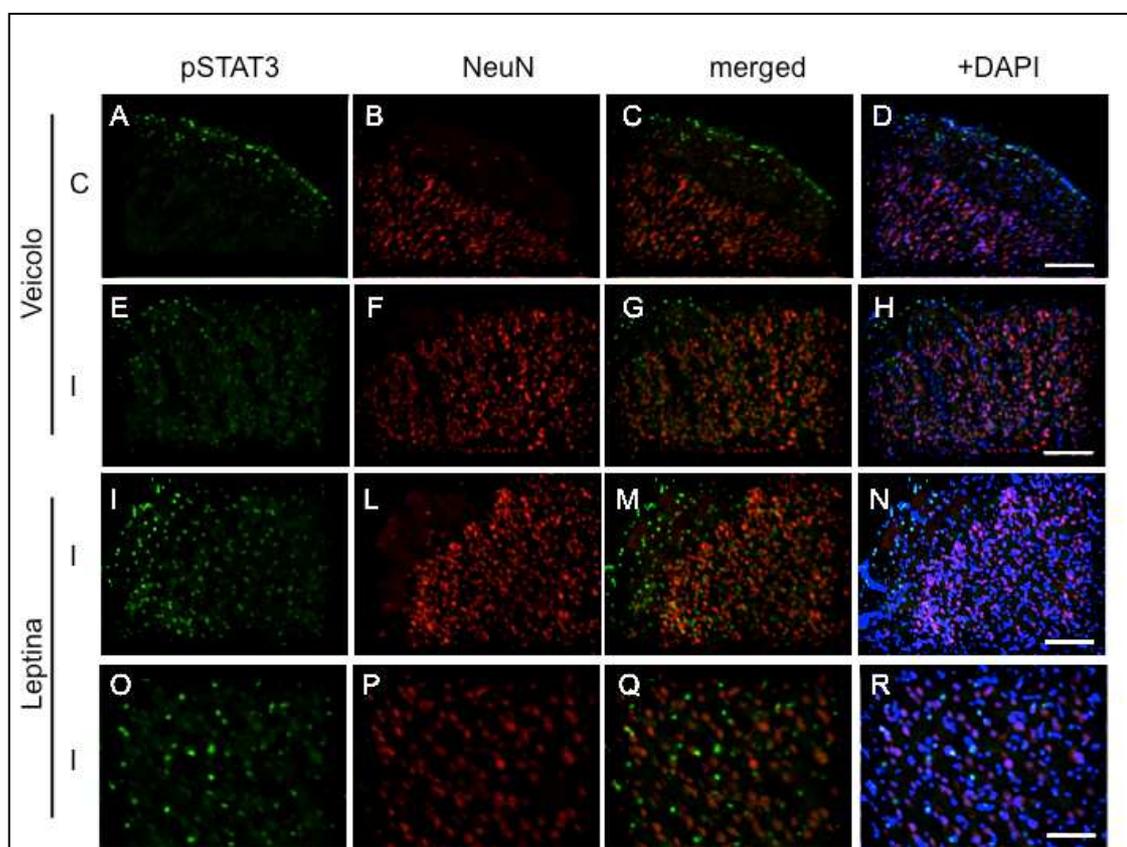


Fig. 4.8 – Immunoreattività di pSTAT-3 e NeuN nella corteccia motoria controlaterale (C) ed ipsilaterale (I) dei ratti sottoposti a 3 h di MCAo permanente La leptina (1 mg/kg, s.c.) o il veicolo (PBS, 1 ml/kg) sono stati somministrati 3 h prima l'induzione dell MCAo. I nuclei sono stati colorati con DAPI. Scale bars = 200 μ m (A-N) and 100 μ m (O-R).

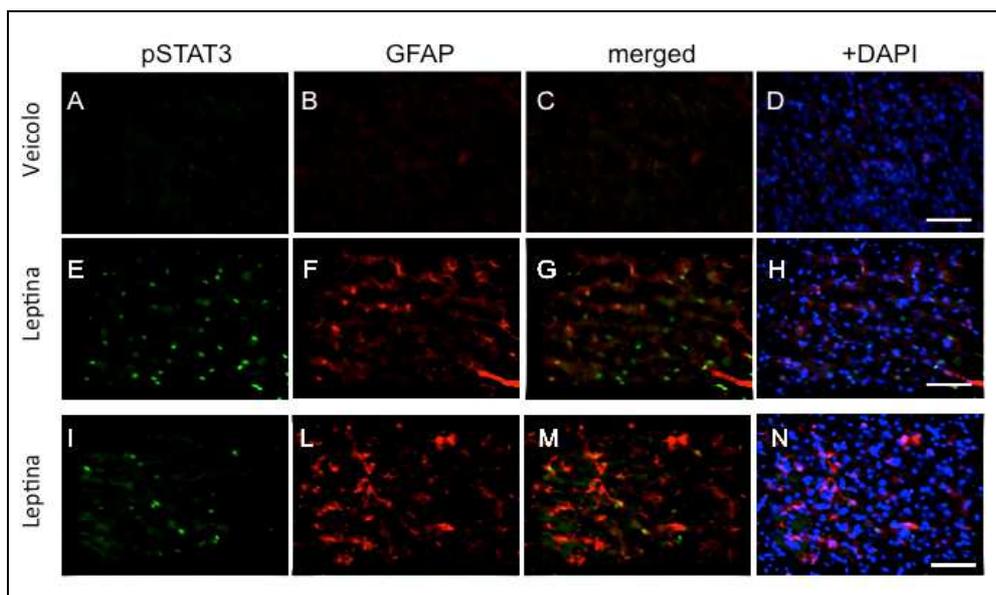


Fig. 4.9 – Immunoreattività di pSTAT-3 e GFAP nella corteccia motoria ipsilaterale (A-H) e nel layer interno della corteccia frontale (I-N) dei ratti sottoposti a 3 h di MCAo permanente. La leptina (1 mg/kg, s.c.) o il veicolo (PBS, 1 ml/kg) sono stati somministrati 3 h prima l'induzione dell'MCAo. I nuclei sono stati colorati con DAPI. Scale bars = 200 μ m

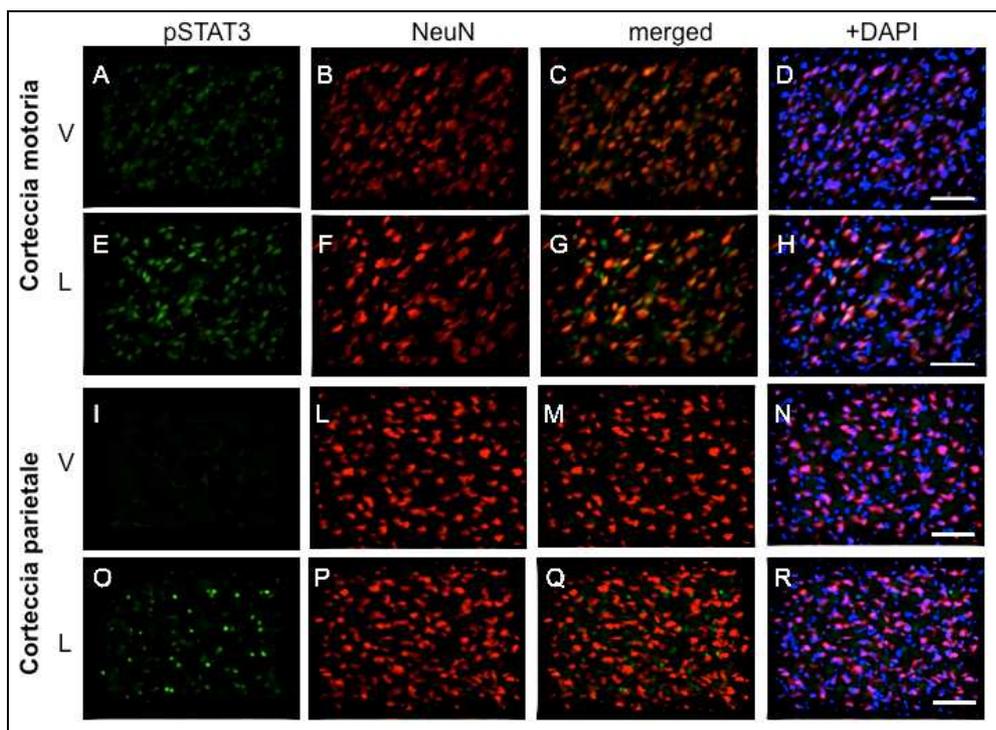


Fig. 4.10 – Immunoreattività di pSTAT-3 e NeuN nella corteccia motoria (A-H) e nella corteccia parietale (I-R) dei ratti sottoposti a 24 h di MCAo permanente. La leptina (1 mg/kg, s.c.) o il veicolo (PBS, 1 ml/kg) sono stati somministrati 3 h prima l'induzione dell'MCAo. I nuclei sono stati colorati con DAPI. Scale bars = 100 μ m

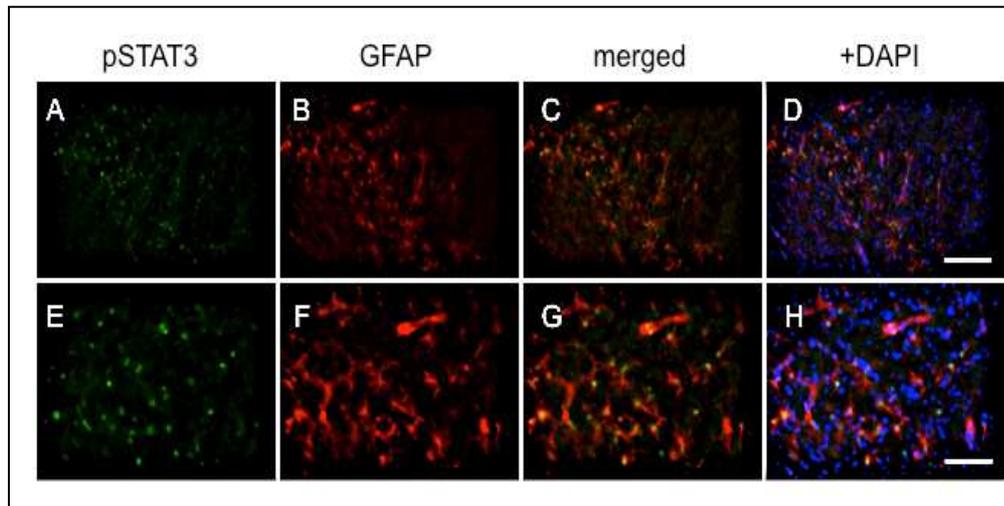


Fig. 4.11 – Immunoreattività di pSTAT-3 e GFAP nella corteccia frontale ipsilaterale (strato interno) dei ratti sottoposti a 24 h di MCAo permanente. I nuclei sono stati colorati con DAPI. Scale bars = 200 μm (A-D) e 100 μm (E-H)

4.7 – Modulazione di TIMP-1 nella corteccia cerebrale dei ratti trattati con leptina sottoposti a 24 h di MCAo permanente

TIMP-1 è uno dei geni target di STAT-3, che viene attivato dalla leptina in vitro. L'espressione di TIMP-1 non aumenta nella corteccia cerebrale dei ratti sottoposti a 3 h di MCAo o ad operazione sham (dati non mostrati).

Tuttavia l'espressione di TIMP-1 aumenta in maniera significativa nella corteccia ipsilaterale dopo 24 h di MCAo permanente (fig. 4.12). Come mostra la figura 4.12 la leptina aumenta l'espressione corticale di TIMP-1 nei ratti sottoposti ad MCAo.

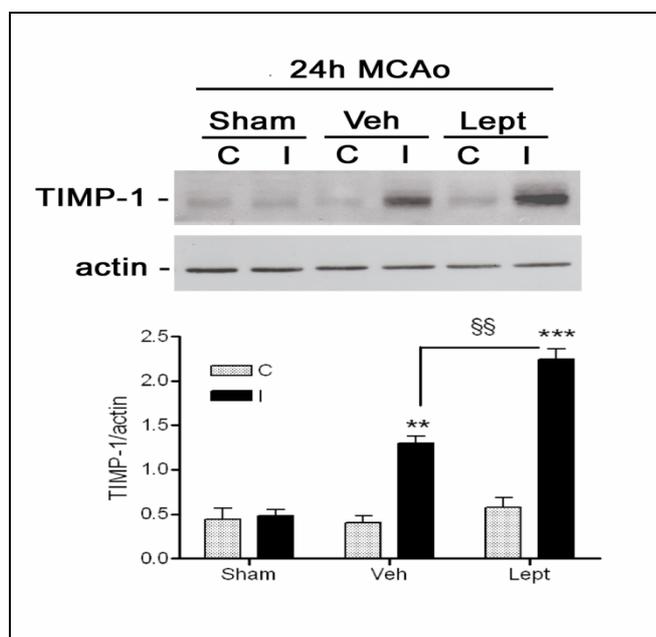


Fig. 4.12 – Modulazione dell'espressione di TIMP-1 in seguito ad ischemia cerebrale focale: effetto della leptina.

L'analisi è stata fatta mediante western blotting su omogenati di corteccia cerebrale dell'emisfero ipsilaterale e controlaterale dei ratti trattati con veicolo (PBS 1ml/kg) o leptina (1 mg/kg) sottoposti a 24 h di MCAo permanente. **P<0.01 e ***P<0.001 vs controlaterale (C). §§P<0.01 (Leptina vs Veicolo)

4.8 – Caratterizzazione e localizzazione cellulare dell'espressione di homer-1b/c e di homer-1a nel cervello di ratto in età perinatale (P7) e adulto (P30)

La localizzazione di due differenti isoforme della proteina *scaffold* homer è stata valutata mediante esperimenti di immunofluorescenza. I risultati ottenuti dimostrano che l'isoforma homer-1b/c è espressa negli astrociti della corteccia cerebrale (layer II, III e V) dei ratti in età perinatale (P7) e dei ratti adulti (P30) (fig. 4.13). In particolare, il segnale di homer-1b/c è localizzato sia sul soma che nella porzione apicale dei processi astrocitari.

Al contrario, l'isoforma homer-1a risulta debolmente espressa nella corteccia cerebrale dei ratti P7 e P30 (fig. 4.14), confermando quanto già verificato mediante western blotting (dati non mostrati). In quest'area cerebrale, l'occlusione transitoria dell'MCA induce un aumento significativo dell'espressione di homer-1a. L'immunoreattività di homer-1a è localizzata prevalentemente a livello neuronale dopo 6 h dall'insulto, mentre, dopo 24 h e 7 giorni dall'occlusione dell'MCA il segnale di homer-1a è espresso negli astrociti S100 β positivi (fig. 4.15).

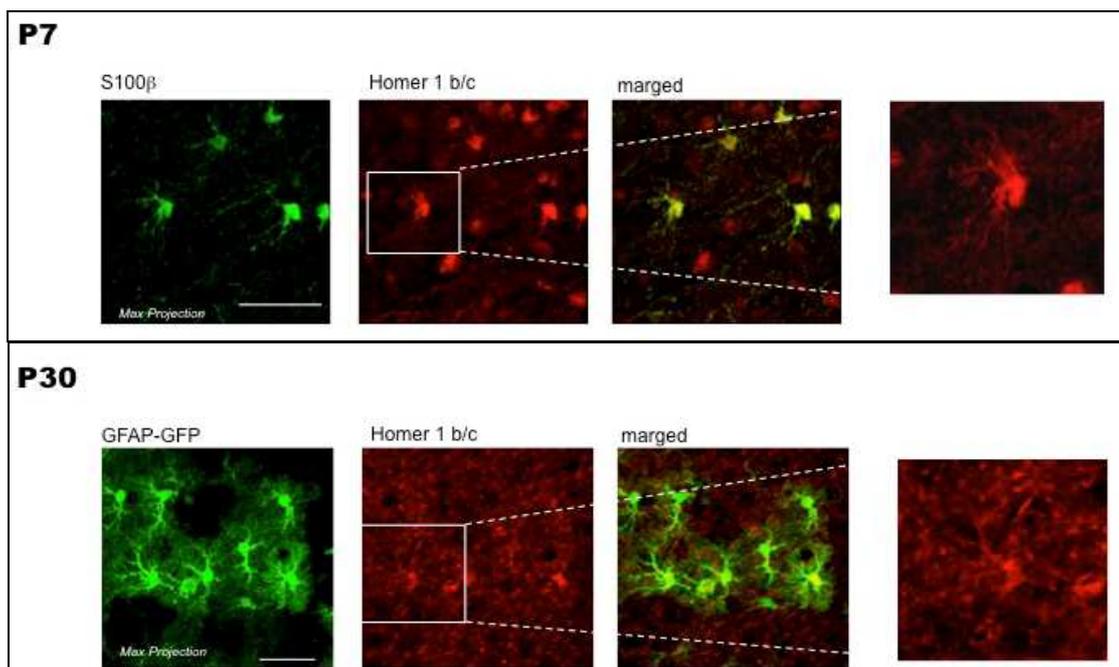


Fig. 4.13 – Immunoreattività di homer-1 b/c nella corteccia cerebrale dei ratti in età perinatale P7 e dei ratti adulti P30. Il segnale di homer-1 b/c (rosso) colocalizza con GFAP (verde) della corteccia ischemica dei ratti P30 e con S100 β (verde), nella corteccia dei ratti P7. Il segnale di homer-1 b/c è localizzato nel soma e nella porzione apicale dei processi astrocitari.

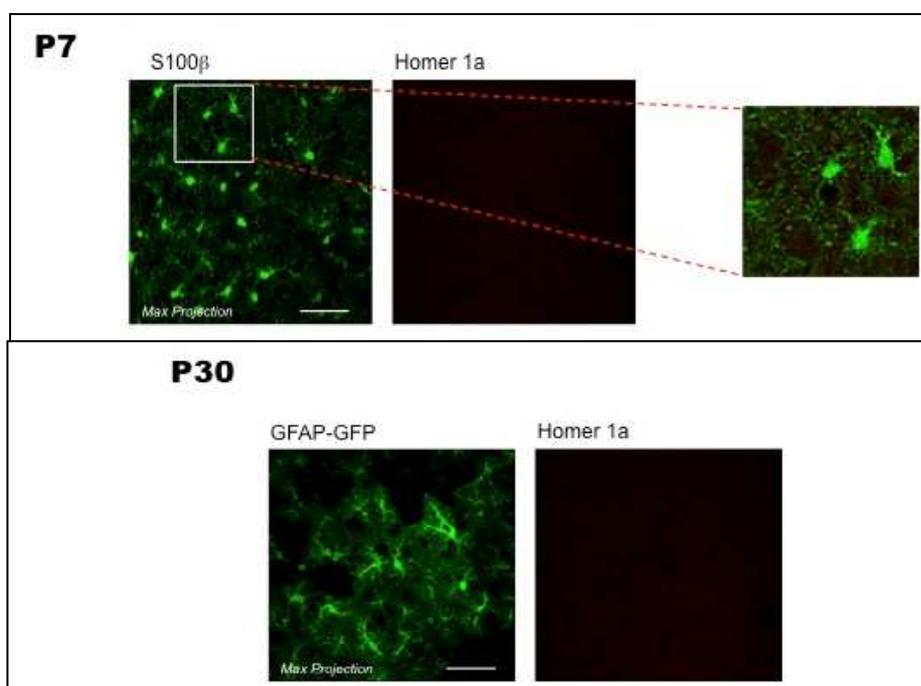


Fig. 4.14 – Immunoreattività di homer-1a nella corteccia cerebrale di ratti in età perinatale (P7) e di ratti adulti (P30). L'isoforma homer-1a, al contrario di homer 1 b/c non è espresso nella corteccia dei ratti adulti e dai ratti perinatali. In particolare il segnale di GFAP e di S100 β (verde) non colocalizza con il segnale di homer-1a (rosso).

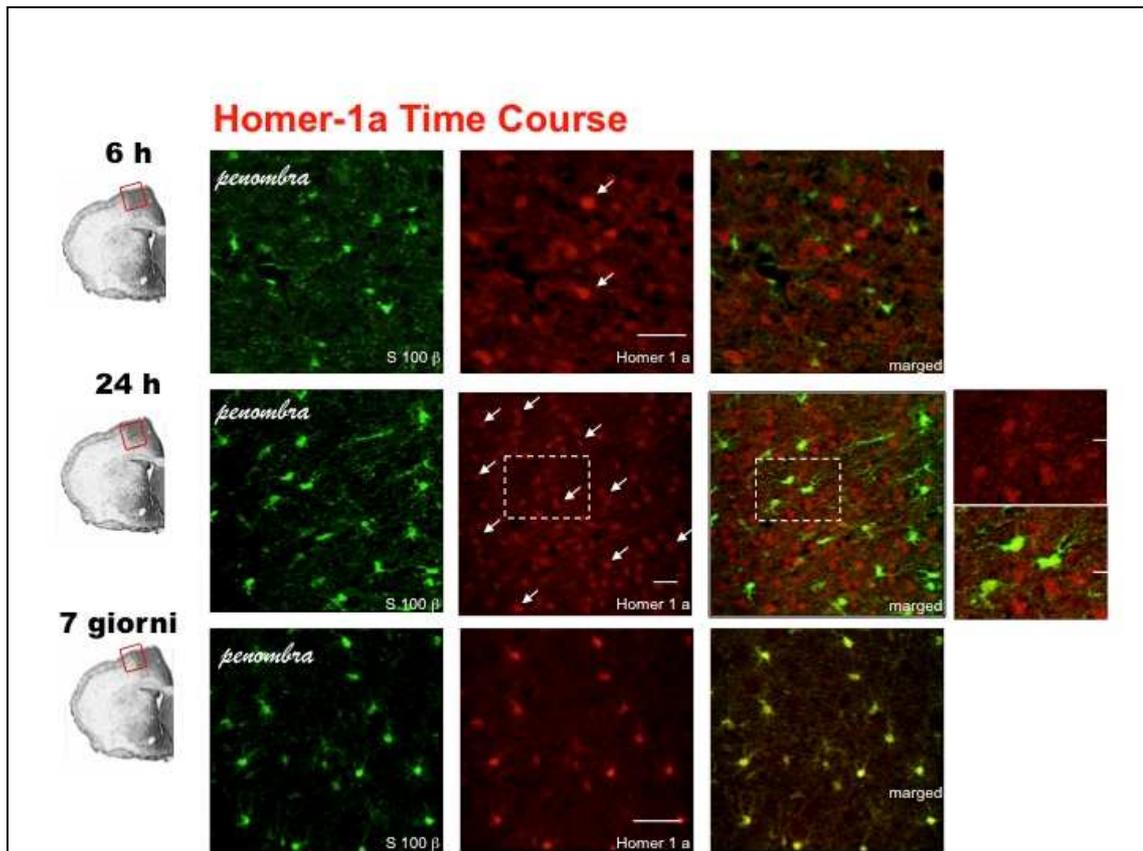


Fig. 4.15 – Immunoreattività di Homer-1a nella corteccia motoria ischemica dei ratti sottoposti a 6 h, 24 h e 7 giorni di MCAo transitoria. Il segnale di homer-1a (rosso) è stato rilevato negli astrociti della corteccia ischemica dei ratti sottoposti ad 1 h di MCAo e 24 h e 7 giorni di riperfusione.

4.9 – Analisi morfologica e morfometrica di astrociti a contatto con sinapsi glutammatergiche nella corteccia cerebrale di ratti sottoposti a MCAo

L'espressione e la localizzazione cellulare di homer-1a nella corteccia cerebrale di ratti sottoposti ad MCAo transitoria è stata ulteriormente valutata mediante microscopia elettronica (EM).

Le immagini in serie di EM evidenziano l'aumentata espressione di homer-1a nelle sinapsi glutammatergiche (spine dendritiche) e negli astrociti della corteccia cerebrale ischemica. Mentre i livelli di homer-1a non sono rilevati nella corteccia controlaterale (fig. 4.16). In queste condizioni sperimentali è stata analizzata la morfologia dei processi astrocitari a livello delle sinapsi glutammatergiche, focalizzando l'attenzione sulla modalità in cui gli astrociti occupano l'interfaccia spina-assone. La ricostruzione delle spine sinaptiche può essere suddivisa in quattro differenti classi:

- **monolaterale:** la sinapsi è toccata parzialmente nell'interfaccia tra la spina e l'assone;
- **bilaterale:** la sinapsi è rivestita più del 95% dall'astrocita;
- **presinaptico:** la sinapsi è toccata dall'astrocita solo sull'assone;
- **postsinaptico:** la sinapsi è toccata dall'astrocita solo a livello della spina dendritica.

Nella fig. 4.16 è mostrato un esempio di ricostruzione astrocitaria. In particolare, è possibile notare che nel tessuto non ischemico circa il 36% delle sinapsi glutammatergiche sono a diretto contatto con l'astrocita e quest'ultimo riveste una significativa parte dell'interfaccia tra l'assone e la spina (fig. 4.16a). Nelle condizioni post-ischemiche (4.16c), l'astrocita reattivo mantiene la stessa percentuale di contatti con le sinapsi glutammatergiche

(fig. 4.17) ma la copertura dell'interfaccia spina-assone di tipo bilaterale è significativamente diminuita (fig. 4.17). Questi risultati suggeriscono che gli astrociti reattivi non modificano il numero di sinapsi con cui entrano in contatto ma presentano una riduzione del *coverage* bilaterale.

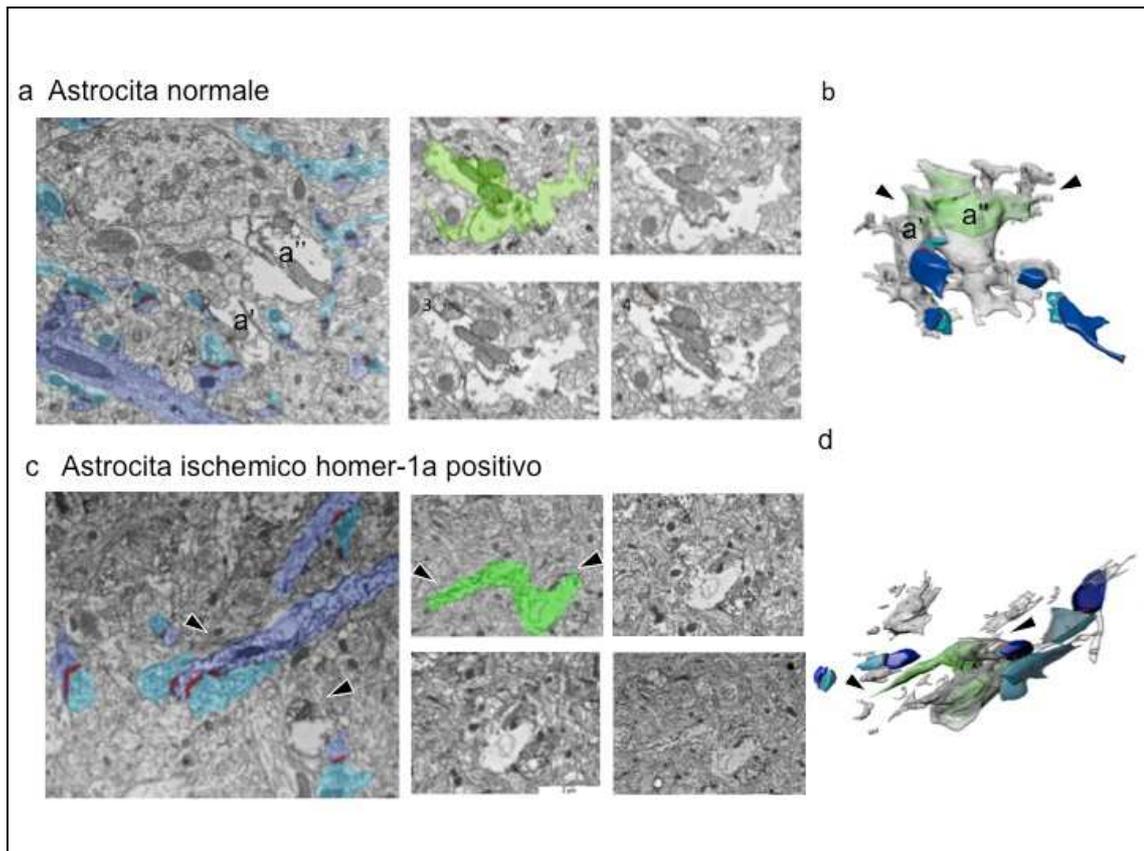


Fig. 4.16 – Sezioni in serie di microscopia elettronica (ME) e ricostruzione 3D di astrociti e sinapsi glutammatergiche. Fig. a) e c) serie di sezioni di ME di un astrocita normale (verde) e reattivo (homer-1a positivo) e di sinapsi glutammatergiche (azzurro= assone; Blu=spine; rosso=densità sinaptica; verde=astrocita) di cervello di ratto. Figura b) e d) ricostruzione 3D (serie di 38 sezioni di 60 nm) astrocita normale (b) ed astrocita reattivo (d). Con a' ed a'' evidenziamo la ricostruzione dei due processi grossi dell'astrocita (verde, bianco) e di alcune sinapsi glutammatergiche (azzurro= assone; Blu=spine; rosso=densità sinaptica).

Table 1. Analisi morfometrica del processo astrocitario ricostruito

Parametri	Normale	Reattivo
Volume del neuropilo ricostruito (μm^3)	158,32	168,72
Sinapsi Simmetriche	235	66

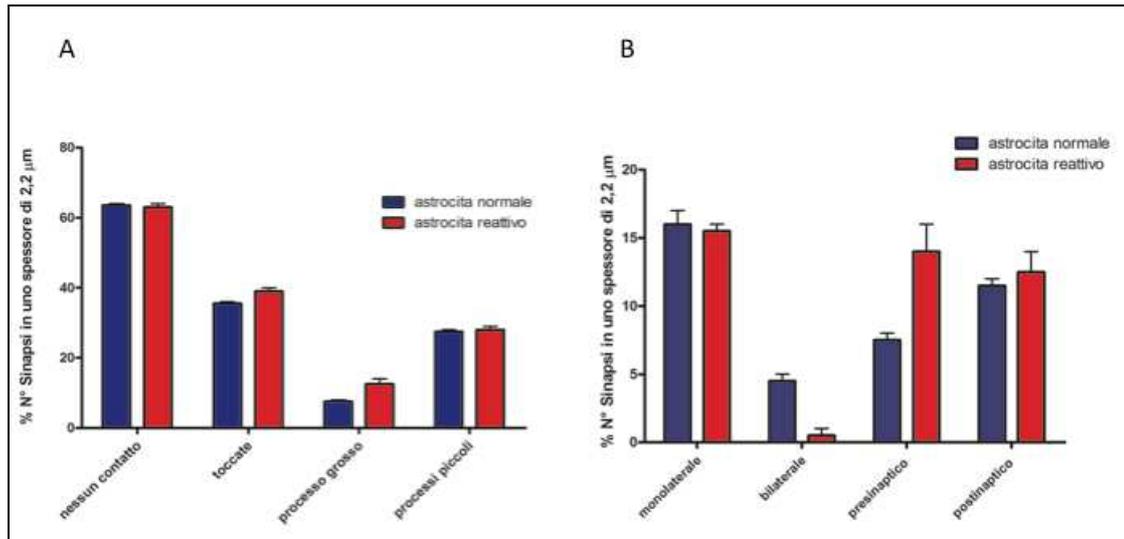


Fig. 4.17 – Analisi del grado di contatto tra astrocita e sinapsi glutammatergiche A) percentuale del numero di sinapsi a contatto con i processi degli astrociti reattivi e normali in 2,2 μm di spessore. B) percentuale di 4 tipi differenti di contatto: Monolaterale: la sinapsi è toccata parzialmente nell’interfaccia tra la spina e l’assone; Bilaterale: la sinapsi è rivestita più del 95% dall’astrocita; Presinaptico: la sinapsi è toccata dall’astrocita solo sull’assone; Postsinaptico: la sinapsi è toccata dall’astrocita solo a livello della spina dentritica.

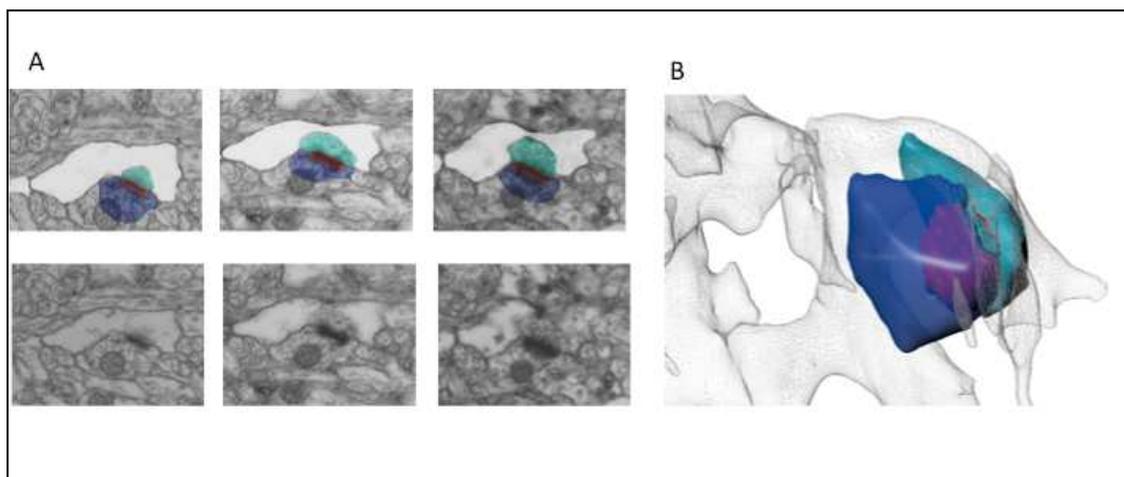


Fig. 4.18 – Ricostruzione 3D di sinapsi bilaterali A) sezioni di microscopia elettronica e B) ricostruzioni 3D di una sinapsi glutammatergica (blu= spina sinaptica; rosso= densità postinaptica; azzurro= assone) rivestita quasi completamente dall’astrocita (*coverage* bilaterale)

5 – DISCUSSIONE

I dati ottenuti nel presente lavoro di ricerca dimostrano che il pretrattamento sistemico acuto con leptina riduce il volume di infarto cerebrale ed il deficit neurologico nei ratti sottoposti ad ischemia cerebrale focale permanente. La neuroprotezione è a lungo termine e coinvolge la modulazione della fosforilazione di STAT-3. Infatti, l'aumento precoce di pSTAT-3 nucleare indotto dalla leptina negli astrociti della penombra ischemica potrebbe contribuire agli effetti benefici di queste cellule sull'evoluzione del danno tissutale. Inoltre, l'aumento di pSTAT-3 indotto dalla leptina nei neuroni dopo 24h di pMCAo è associato con un aumento dell'espressione di TIMP-1 nella corteccia, suggerendo il suo possibile coinvolgimento nella neuroprotezione esercitata dall'adipochina.

Studi precedenti hanno evidenziato che questo ormone ha importanti effetti neuroprotettivi nel danno eccitotossico. Gli effetti neuroprotettivi di questa molecola furono inizialmente dimostrati in colture neuronali di topo esposte agli effetti eccitotossici del glutammato (Dicou et al., 2001). Infatti il pretrattamento di colture primarie di neuroni con leptina per 20 ore protegge le cellule nervose dalla morte cellulare indotta da NMDA, e l'inibitore di JAK2, AG490, antagonizza gli effetti dell'adipochina. La neuroprotezione è stata ulteriormente documentata da successive analisi, le quali confermano che il pretrattamento di neuroni ippocampali di ratto con leptina per 24 ore aumenta il numero di cellule sopravvissute al trattamento con NMDA (Guo et al., 2008). Altri studi *in vitro* hanno dimostrato che l'adipochina protegge i neuroni corticali primari di ratto sottoposti a deprivazione di glucosio ed ossigeno (OGD) attraverso la modulazione del *pathway* delle MAP chinasi, ERK1/ERK2 (Zhang et al., 2007).

Si è documentato, inoltre, che la leptina protegge i neuroni corticali di topo sottoposti ad OGD attraverso l'induzione, c-Rel-mediata, dell'espressione del fattore antiapoptotico Bcl-xL (Valerio et al., 2009).

In vivo, la neuroprotezione da leptina è stata osservata in differenti modelli animali di ischemia cerebrale globale e focale. Infatti, è stato documentato che la somministrazione sistemica di quest'adipochina protegge i neuroni di topi sottoposti ad occlusione transitoria (Zhang et al., 2007; Si et al., 2009) o permanente (Valerio et al., 2009; Avraham et al., 2010) dell'arteria cerebrale media, ma non abbiamo alcuna informazione sull'effetto di questa molecola sui ratti.

I dati ottenuti da questo lavoro di ricerca rappresentano la prima evidenza degli effetti di questo ormone proteico in un modello di MCAo permanente nel ratto e sono in linea con le precedenti evidenze che documentano gli effetti benefici di questa molecola in condizioni sperimentali simili nel topo (Valerio et al., 2009; Avraham et al., 2010).

Inoltre è stato possibile estendere le evidenze precedenti, dimostrando che la neuroprotezione avviene attraverso un trattamento acuto con leptina (3 h prima dell'MCAO) e l'effetto protettivo è a lungo termine essendo associato ad una riduzione significativa del volume di infarto e del deficit neurologico fino a 7 giorni dopo l'induzione dell'ischemia.

Sebbene la somministrazione acuta di dosi farmacologiche di leptina (10-1000 mg/kg) sia capace di aumentare le concentrazioni plasmatiche di metaboliti del nitrossido (NO) e del suo secondo messaggero cGMP (Fruhbeck, 1999; Beltowsky et al., 2002, 2004; Mastronardi et al., 2009), studi condotti in animali coscienti suggeriscono che l'induzione del NO indotta dalla leptina nell'endotelio non produce effetti emodinamici significativi (Mitchell et al., 2001). In accordo con Zhang et al., (2007), non abbiamo osservato variazioni significative del

flusso sanguigno cerebrale dopo il trattamento con leptina, escludendo in questo modo la possibilità di modificazioni emodinamiche come possibile meccanismo neuroprotettivo.

Inoltre abbiamo dimostrato che la somministrazione della leptina all'inizio e dopo l'MCAo non ha alcun effetto neuroprotettivo. Questa mancata neuroprotezione è stata osservata anche nei topi sottoposti a MCAo transitoria (McColl et al., 2010). Al contrario, Zhang et al (2007) osservano un effetto neuroprotettivo nei topi trattati con leptina somministrata 90 minuti dopo l'inizio della riperfusione. L'apparente discrepanza tra queste evidenze ed i nostri dati potrebbe essere giustificata dai differenti modelli e specie di animali utilizzati e quindi dalla natura e dall'intensità dell'insulto ischemico, essendo l'ischemia permanente insensibile al post-trattamento con leptina.

Studi clinici suggeriscono che elevati livelli di leptina nel sangue, come quelli riscontrabili comunemente nei soggetti obesi, non sono associati con l'aumento del rischio cardiovascolare (Wallace et al., 2001; Wolk et al., 2004; Dellas et al., 2008). Infatti, differenti analisi condotte su larga scala hanno riportato importanti correlazioni tra aumento dei livelli plasmatici di leptina e *stroke* (Soderberg et al., 2004; Sierra-Johnson et al., 2007). Infine, studi sperimentali *in vivo* hanno confermato che la leptina esercita un effetto protrombotico (Konstantinides et al., 2001; Bodary et al., 2002).

Ulteriori sperimentazioni cliniche hanno confermato l'esistenza di un aumento del rischio di *stroke* in individui obesi (Winter et al., 2008). Infatti in modelli di animali obesi sottoposti ad ischemia è stato evidenziato un maggiore danno cerebrale (Terao et al., 2008) e questi effetti sembrano essere indipendenti dalla mancanza di leptina. La somministrazione sistemica di leptina in topi obesi ob/ob non migliora lo stato infiammatorio e l'insorgenza di trasformazioni emorragiche caratteristiche tipiche del danno ischemico (Terao et al., 2008;

McColl et al., 2010).

Poiché l'obesità potrebbe essere una conseguenza della resistenza alla leptina (Banks, 2008), dovuta ad un minor trasporto della stessa attraverso la barriera ematoencefalica (Bancks et al., 1999; Bancks & Farrel, 2003; Burguera et al., 2000). Il diminuito passaggio della proteina al cervello potrebbe essere responsabile dell'aumento della suscettibilità dei soggetti obesi ad un insulto ischemico.

Nel lavoro di Valerio et al., (2009) è documentato un aumento dei livelli di mRNA e dell'espressione della leptina, in particolar modo, nella microglia e nei macrofagi della corteccia cerebrale periischemica dei ratti sottoposti ad MCAo permanente. L'induzione della produzione di leptina in queste cellule potrebbe rappresentare un possibile meccanismo di protezione endogena attivato sia localmente che perifericamente attraverso cui la leptina contribuisce al recupero del tessuto danneggiato.

Al fine di valutare i meccanismi molecolari alla base della neuroprotezione da leptina, studi precedenti hanno principalmente focalizzato la loro attenzione sugli effetti di questa molecola sui neuroni. Infatti, Zhang et al., (2007) hanno dimostrato che la neuroprotezione osservata durante la riperfusione è in stretta correlazione con l'aumento dell'espressione di p-ERK nei neuroni corticali; mentre, sembra che l'induzione di geni a valle di cRel, come Bcl-xL, nelle cellule neuronali dei topi sottoposti ad MCAo permanente sia il meccanismo principale di sopravvivenza cellulare (Valerio et al., 2009). Allo stesso modo, un aumento della fosforilazione di Akt e ERK1/2 nei neuroni dell'area CA1 sono alla base della neuroprotezione dell'adipochina in un modello di ischemia cerebrale globale nel ratto (Zhang & Chen, 2008).

Il fattore di trascrizione STAT-3 è uno dei principali mediatori attivati dal recettore

della leptina ObR nel cervello, (Ghilardi et al., 1996; Vaisse et al., 1996) ma il suo contributo sugli effetti neuroprotettivi della leptina dopo ischemia è stato solo marginalmente studiato.

I livelli di espressione di pSTAT-3 misurati attraverso *western blotting* in omogenati di tessuti cerebrali ischemici di roditori sono solo leggermente modulati dal trattamento con leptina (Zhang et al., 2007; Zhang and Chen, 2008), probabilmente perché questo mediatore è localizzato in differenti tipi cellulari (neuroni e glia) e in diversi compartimenti subcellulari (nucleo e citoplasma) (Aeronson & Horvath, 2002), rendendo poco apprezzabili le sue modificazioni.

Utilizzando un metodo sperimentale di frazionamento cellulare, combinato con un'analisi di immunofluorescenza, abbiamo dimostrato che l'attivazione di pSTAT-3 in specifici tipi cellulari potrebbe rappresentare un meccanismo cruciale alla base della neuroprotezione.

L'espressione di pSTAT-3 aumenta in maniera significativa nell'emisfero ipsilaterale dopo MCAo permanente, e la sua traslocazione nucleare aumenta con la progressione dell'insulto. La neuroprotezione da leptina è associata con l'aumento di pSTAT-3 nelle frazioni nucleari (a 3 h di MCAo) e citosoliche (a 24 h di MCAo) nella corteccia ischemica. Un aumento della fosforilazione di pSTAT-3 sulla tyr-705 è stato già documentato dopo MCAo permanente e transitoria (Suzuki et al., 2001; Wen et al., 2001).

Wen et al., (2001) utilizzando un modello permanente di occlusione dell'arteria cerebrale media, dimostrarono che il segnale di pSTAT-3 colocalizza con le cellule TUNEL-positive, portando gli stessi autori del lavoro a sostenere che pSTAT-3 conduce a morte le cellule nervose. Invece, Satriotomo et al., (2006) dimostrarono che, utilizzando degli siRNA per inibire STAT-3, si ha una diminuzione del volume di infarto cerebrale indotto mediante

MCAo nei ratti ipertensivi. In questo studio, STAT-3 è principalmente attivato nelle cellule microgliali e macrofagiche, i principali bersagli delle citochine infiammatorie rilasciate in seguito ad un intenso processo flogistico. Infatti, è possibile che, a causa del vasto danno cerebrale, osservato nel *core* dei ratti ipertensivi ischemici, le cellule infiammatorie possono annullare la neuroprotezione osservata nei neuroni e nelle cellule gliali.

Nonostante il fatto che questi studi suggeriscono che la fosforilazione di STAT-3 potrebbe essere coinvolta nella morte delle cellule nervose dopo ischemia cerebrale (Wen et al., 2001; Satriotomo et al., 2006), i nostri dati sono in linea con quelli che attribuiscono a questo fattore trascrizionale un ruolo neuroprotettivo (Suzuki et al., 2001; Yamashita et al., 2005; Komine-Kobayashi et al., 2006). Infatti, STAT-3 induce la trascrizione di geni neuroprotettivi come bcl-2; bcl-xL (Grad et al., 2000; Stephanou et al., 2000) e TIMP-1 (Lin et al., 2006) e gioca un ruolo fondamentale nello sviluppo della tolleranza all'ischemia attraverso *preconditioning* ischemico (Xuan et al., 2001). In accordo con queste evidenze, nel presente studio abbiamo osservato che la protezione indotta dalla leptina nel modello di MCAo permanente è associata con un aumento dell'espressione di TIMP-1 nella corteccia ischemica.

In alternativa, l'aumento di STAT-3 da parte della leptina induce la trascrizione del fattore SOCS-3 (Bjorbaek et al., 1998a), il quale, effettua un'inibizione negativa su JAK-2 (Bjorbaek et al., 2000). Dopo MCAo permanente e transitoria si ha un aumento dei livelli di mRNA di SOCS-3 (Bates et al., 2001; Raghavendra rao et al., 2002), e utilizzando degli “*antisense gene knockdown*” che inducono una riduzione dell'espressione di SOCS-3 si ottiene una significativa diminuzione del volume di infarto cerebrale (Raghavendra rao et al., 2002), suggerendo il ruolo benefico di SOCS-3 sull'evoluzione del danno ischemico.

I nostri dati dimostrano che la neuroprotezione da leptina, 3 h dopo l'MCAO permanente, è associata con un aumento dell'espressione di pSTAT-3 nei nuclei degli astrociti nella corteccia (penombra). Studi precedenti hanno confermato che tale proteina agisce sulle cellule della microglia e dei macrofagi del cervello in seguito a *stroke* (Valerio et al., 2009) e che le cellule gliali esprimono sia la forma corta che quella lunga del recettore per la leptina (De Matteis & Cinti, 1998; Diano et al., 1998; Hosoi et al., 2000; Pinteaux et al., 2007).

Inoltre, gli astrociti esprimono ObR (Cheunsuang & Morris, 2005; Hsueh et al., 2009a, b) e la loro modulazione da parte dell'adipochina è coinvolta nella regolazione dell'assunzione di cibo e nel riarrangiamento delle sinapsi ipotalamiche (Garcia-Caceres et al., 2011).

Il fattore di trascrizione STAT-3 svolge un ruolo fondamentale nella differenziazione degli astrociti (Rajan & McKay, 1998) e nella regolazione dell'espressione di GFAP, *marker* selettivo dell'astrogliosi, mediante il riconoscimento di specifiche sequenze presenti nel promotore di GFAP (Takizawa et al., 2001). In particolare è stato dimostrato che topi GFAP *knockout* sottoposti ad ischemia cerebrale transitoria hanno un maggiore volume di infarto corticale ed un'aumentata pressione intracranica (Nawashiro et al., 2000, 2002). Il ruolo cruciale di STAT-3 nella regolazione dell'astrogliosi reattiva *in vivo* è stato constatato in numerosi modelli sperimentali, come le lesioni cerebrali eccitotossiche (Acarin et al., 2000), quelle indotte dall'acido kainico (Choi et al., 2003a), l'infiammazione (Gautron et al., 2002), il danno al midollo spinale (Herrmann et al., 2008; Okada et al., 2006) ed in modelli di ischemia cerebrale focale e globale transitoria (Justica et al., 2000; Choi et al., 2003b).

Il ruolo protettivo degli astrociti reattivi nello *stroke* è stato ben documentato da Li et al., 2008. In condizioni ischemiche, l'attivazione della via di trasduzione di STAT-3 negli

astrociti è alla base degli effetti neuroprotettivi delle citochine che agiscono sul recettore gp130, lo stesso meccanismo molecolare utilizzato dal recettore della leptina ObR (baumann et al., 1996; Choi et al 2003b). Inoltre, nel *preconditioning* ischemico, si ha un'elevata attivazione del fattore di trascrizione STAT-3 negli astrociti con effetti benefici sul danno ischemico (Kim et al., 2004). Un'alterata attivazione di STAT-3 negli astrociti sembra anche essere alla base dell'aumentata risposta neuroinfiammatoria che si rileva negli animali anziani sottoposti ad ischemia (DiNapoli et al., 2010).

In linea con queste evidenze, i nostri dati suggeriscono che l'attivazione di STAT-3 contribuisce all'attivazione degli astrociti in condizioni ischemiche ed è molto importante notare come l'effetto neuroprotettivo della leptina sia dovuto proprio alla regolazione precoce della gliosi reattiva, attraverso la fosforilazione del fattore di trascrizione STAT-3. L'astrogliosi reattiva rappresenta quindi il principale meccanismo attivato precocemente dalla leptina dopo MCAo permanente per proteggere i territori periferici della penombra ischemica. Nel presente lavoro di tesi abbiamo voluto approfondire il ruolo degli astrociti reattivi in un modello di ischemia cerebrale focale transitoria nel ratto. In particolare, abbiamo analizzato la precisa localizzazione e l'espressione cellulare della proteina *scaffold* Homer-1a.

Mediante analisi di immunofluorescenza, abbiamo dimostrato, che in condizioni fisiologiche, gli astrociti della corteccia cerebrale dei ratti P7 e P30 esprimono l'isoforma Homer-1b/c. Mentre i livelli di Homer-1a, la cui espressione è quasi nulla in condizioni basali, aumenta a seguito dell'insulto ischemico. In particolare a tempi precoci, a 6 h dall'ischemia, la proteina *scaffold* Homer-1a aumenta principalmente nei neuroni, mentre a 24 h fino a 7 giorni dall'insulto, tale proteina è localizzata negli astrociti della corteccia cerebrale.

Precedenti studi hanno dimostrato che l'aumentata sintesi di Homer-1a nei neuroni riduce la misura e la densità delle spine sinaptiche e diminuisce l'espressione di altre proteine *scaffold* come Shank, PSD-95, ma anche dei recettori AMPA e NMDA (Sala et al., 2003). Inoltre, l'aumentata espressione di Homer-1a diminuisce l'ampiezza delle correnti postsinaptiche eccitatorie (Sala et al., 2003). Un recente lavoro dimostra che l'inibizione di Homer-1a, mediante shRNA, peggiora lo stato infiammatorio in un modello di dolore neuropatico (Tappe et al., 2010).

Numerosi studi hanno dimostrato che gli astrociti reattivi modificano la loro struttura citoscheletrica, aumentano la sintesi di molecole come GFAP, vimentina e nestina (Nathaniel & Nathaniel 1981; Schmidt-Kastner et al., 1990; Petit et al., 1990). Questo processo viene oggi definito con il nome di gliosi reattiva. Inoltre, queste cellule aumentano il numero di piccoli processi cellulari che si dipartono dal soma. Tali meccanismi portano come risultato finale ad una aumentata ipertrofia cellulare (Wilhelmsson et al. 2006).

Wilhelmsson et al. (2006) dimostrarono che l'aumento dell'ipertrofia e il grado di attivazione degli astrociti limita la perdita sinaptica. Inoltre, come già discusso precedentemente, l'ischemia determina un aumento del volume di infarto cerebrale in topi KO per GFAP (Nawashiro et al., 2000a, 2002b).

È noto che gli astrociti esprimono sulla loro membrana i recettori metabotropici del glutammato mGluR. L'eccessivo rilascio di questo neurotrasmettitore eccitatorio, in seguito ad ischemia, attiva questi recettori con conseguente rilascio di mediatori come il glutammato (Bezzi et al., 2004), prostaglandine (Zonta et al., 2003) e TNF α (Bezzi et al., 2001).

Mediante analisi di immunofluorescenza e microscopia elettronica abbiamo evidenziato, a 7 giorni dall'insulto ischemico, una elevata espressione di Homer-1a negli

astrociti.

Tale proteina potrebbe funzionare da dominante negativo di questo sistema inibendo in particolar modo l'ulteriore rilascio di glutammato e di altri mediatori mediante la modulazione dei livelli di calcio intracellulare (Tu et al., 1998; Kammermeier et al., 2000; . Kammermeier et al., 2008)

Successivamente, attraverso microscopia elettronica e ricostruzione 3D, sono stati valutati gli aspetti morfologici e morfometrici degli astrociti reattivi nella corteccia cerebrale ischemica. Dall'analisi morfometrica eseguita, è stato dimostrato che l'astrocita reattivo aumenta l'espressione di proteine citoscheletriche (dati non mostrati) e cambia la morfologia cellulare, pur mantenendo la percentuale del grado di contatto con l'interfaccia spina-assone delle sinapsi glutamatergiche. Da questa analisi, inoltre, si evince una riduzione significativa del numero di contatti bilaterali intorno alle sinapsi glutamatergiche ed un aumento invece, di quelli presinaptici.

I contatti bilaterali aumentano in seguito a meccanismi di plasticità sinaptica (Genoud et al., 2006), ma nessuno studio finora ha dimostrato la loro modulazione in condizioni patologiche. Infatti, con tale lavoro si documenta per la prima volta una riduzione dei contatti bilaterali a seguito di ischemia. Ulteriori studi sono comunque necessari per comprendere il ruolo degli astrociti reattivi nella fisiopatologia dell'ischemia cerebrale e di come Homer-1a può modulare l'attività delle sinapsi glutamatergiche. Una più dettagliata analisi morfometrica del volume e dell'area dell'astrocita, del volume delle spine, dell'area della densità postsinaptica e dell'area delle spine ci permetterà di definire meglio sia gli aspetti morfologici che funzionali degli astrociti reattivi. La comprensione di tali meccanismi risulteranno fondamentali per la scoperta di nuovi possibili targets farmacologici e per una

migliore comprensione dei meccanismi alla base della modulazione dell'astrocita da parte della leptina durante le fasi precoci del danno ischemico.

Al contrario, a tempi più tardivi (24 h dopo l'MCAo), osserviamo che l'aumento di pSTAT-3 avviene principalmente nei neuroni della corteccia perischemica e nelle cellule gliali dell'intero emisfero ispilaterale. Questi dati sono in linea con altre evidenze ottenute in modelli animali di MCAo transitoria (Planas et al., 1996; Suzuki et al., 2001; Komine-Kobayashi et al., 2006; Dziennis et al., 2007). L'aumento di pSTAT-3 protegge i neuroni della corteccia cerebrale (penombra) dall'insulto ischemico, molto probabilmente attraverso l'attivazione di geni che mediano la sopravvivenza cellulare come per esempio TIMP-1. Al contrario invece, l'attivazione eccessiva di STAT-3 nella microglia e nei macrofagi potrebbe avere un ruolo dannoso per il cervello come dimostrato in condizioni di ischemia e riperfusione (Satriotomo et al., 2006). Ciò suggerisce che questo mediatore può avere funzioni diverse a secondo del tipo cellulare in cui viene attivato.

In accordo con evidenze sperimentali precedenti (Shibata et al., 2002; Zhao et al., 2005; Amantea et al., 2009), abbiamo constatato che nei ratti sottoposti a MCAo permanente si ha un'attivazione transiente di p-Akt nella corteccia ischemica. L'attivazione del *pathway* PI3K/Akt è fondamentale per la sopravvivenza neuronale nella penombra ischemica (Shibata et al., 2002; Zhao et al., 2005) e protegge le cellule dalla morte (Fukunaga & Kawano, 2003; Zhao et al., 2006). La leptina attiva il segnale di PI-3K molto probabilmente attraverso un *cross-talk* con il recettore dell'insulina. I recettori della leptina oltre ad attivare le MAPK/ERK1/2 e JAK/STAT sono capaci di interagire con i componenti del segnale dell'insulina (Niswender et al., 2003; Niswender et al., 2004) portando così alla fosforilazione di Akt. Infatti, la proteina mediante JAK2/STAT-3 attiva PI3K/Akt nei neuroni (Guo et al.,

2008).

Dati precedenti hanno dimostrato comunque il ruolo neuroprotettivo dell'adipochina nell'ischemia globale attraverso l'aumento di p-Akt (Zhang & Chen, 2008); mentre il ruolo di questo ormone proteico nell'ischemia cerebrale focale transitoria non è stato ancora chiarito (Zhang et al., 2007).

Nel nostro studio è stato osservato che la leptina modifica solo in maniera transitoria i livelli di p-Akt nella corteccia ischemica, non avendo alcun effetto sul *time-course* dell'attivazione di questo segnale durante MCAo permanente. Perciò, possiamo confermare che il principale meccanismo molecolare alla base della neuroprotezione è STAT-3 ma non possiamo escludere che Akt/PKB abbia un importante effetto sulla sopravvivenza neuronale.

In conclusione, i nostri dati mettono in luce che la neuroprotezione della leptina nei ratti sottoposti ad MCAo permanente è associata con la modulazione di STAT-3 in differenti tipi cellulari. In particolare, la leptina, attraverso la traslocazione nucleare di pSTAT-3, agisce in maniera positiva a poche ore dall'insulto ischemico mediante la regolazione dell'astrogliosi reattiva.

Invece a tempi più tardivi, la leptina protegge i neuroni attraverso l'induzione dell'inibitore delle metalloproteasi, TIMP-1 o di altri geni che mediano la sopravvivenza neuronale. Questi differenti meccanismi sono associati con gli effetti a lungo termine della leptina sia sull'infarto cerebrale che sul deficit neurologico negli animali sottoposti ad MCAo permanente, con una conseguente riduzione del danno a 7 giorni dall'insulto.) Queste nuove evidenze sperimentali sottolineano il ruolo fondamentale di questa adipochina nel trattamento dell'ischemia cerebrale.

BIBLIOGRAFIA

- Aaronson D.S. & Horvath C.M. (2002).** A road map for those who don't know JAK-STAT. *Science* 296:1653-5.
- Abe K., Yoshida S., Watson B.D., Busto R., Kogure K. & Ginsberg M.D. (1983).** Tocopherol and ubiquinones in rat brain subjected to decapitation ischemia. *Brain Res.* 273:166-169.
- Acarin L., González B. & Castellano B. (2000).** STAT3 and NFkappaB activation precedes glial reactivity in the excitotoxically injured young cortex but not in the corresponding distal thalamic nuclei. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 59: 151-63.
- Ahima R.S. & Osei S.Y. (2004).** Leptin signalling. *Physiol. Behav.* 81:223-41.
- Ahima R.S, Prabakaran D. & Mantzoros C.S. (1996).** Role of leptin in the neuroendocrine response to fasting. *Nature* 382:250-252.
- Ahmed N.N., Franke T.F., Bellacosa A., Datta K., Gonzalez-Portal M.E., Taguchi T., Testa J.R. & Tsichlis P.N. (1993).** The proteins encoded by c-akt and v-akt differ in post-translational modification, subcellular localization and oncogenic potential. *Oncogene* 8:1957-63.
- Alessi D.R., James S.R., Downes C.P., Holmes A.B., Gaffney P.R., Reese C.B. & Cohen P. (1997).** Characterization of a 3-phosphoinositidedependent protein kinase which phosphorylates and activates protein kinase Balpha. *Curr. Biol.* 7:261-9.
- Altman F.P. (1974).** Studies on the reduction of tetrazolium salts. III. The products of chemical and enzyme reduction. *Histochemistry* 38:155-71.
- Alonzi T., Middleton G., Wyatt S., Buchman V., Betz U.A., Muller W., Musiani P., Poli V. & Davies A.M. (2001).** Role of STAT3 and PI 3-kinase/Akt in mediating the survival actions of cytokines on sensory neurons. *Mol Cell Neurosci.* 18:270-282.

- Alvarez-Buylla A, Ling C. & Kirn JR. (1990).** Cresyl violet: a red fluorescent Nissl stain. *J Neurosci. Methods* 33:129-33.
- Amantea D., Bagetta G., Tassorelli C., Mercuri N.B. & Corasaniti M.T. (2010).** Identification of distinct cellular pools of interleukin-1 β during the evolution of the neuroinflammatory response induced by transient middle cerebral artery occlusion in the brain of rat. *Brain Res.* 1313:259-269.
- Amantea D., Fratto V., Maida S., Rotiroti, D., Ragusa S., Nappi G., Bagetta G. & Corasaniti M.T. (2009).** Prevention of glutamate accumulation and upregulation of phospho-Akt may account for neuroprotection afforded by bergamot essential oil against brain injury induced by focal cerebral ischemia in rat. *Int. Rev. Neurobiol.* 85:389-405.
- Amantea D., Russo R., Gliozzi M., Fratto V., Berliocchi L., Bagetta G., Bernardi G. & Corasaniti M.T. (2007).** Early upregulation of matrix metalloproteinases following reperfusion triggers neuroinflammatory mediators in brain ischemia in rat. *Int. Rev. Neurobiol.* 82:149-169.
- Asahi M., Asahi K., Jung J.C., del Zoppo G.J., Fini M.E. & Lo E.H. (2000).** Role for matrix metalloproteinase 9 after focal cerebral ischemia: effects of gene knockdown and enzyme inhibition with BB-94. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 20:1681-1689.
- Attoub S., Noe V., Pirola L., Bruyneel E., Chastre E., Mareel M., Wymann M.P. & Gespach C. (2000).** Leptin promotes invasiveness of kidney and colonic epithelial cells via phosphoinositide 3-kinase-, rho-, and rac-dependent signaling pathways. *FASEB J.* 14:2329-38.
- Attwell D., Barbour B. & Szatkowski M. (1993).** Nonvesicular release of neurotransmitter. *Neuron* 11:401-7.
- Avraham Y., Davidi N., Porat M., Chernoguz D., Magen I., Vorobeiv L., Berry E.M. & Leker R.R. (2010).** Leptin reduces infarct size in association with enhanced

expression of CB2, TRPV1, SIRT-1 and leptin receptor. *Curr. Neurovasc. Res.* 7:136-143.

Bado A., Levasseur S., Attoub S., Kermorgant S., Laigneau J.P., Bortoluzzi M.N., Moizo L., Lehy T., Guerre-Millo M., Le Marchand-Brustel Y. & Lewin M.J.M. (1998). The stomach is a source of leptin. *Nature* 394:790-793.

Bajetto A., Bonavia R., Barbero S., Florio T. & Schettini G. (2001). Chemokines and their receptors in the central nervous system. *Front Neuroendocrinol.* 22:147-84.

Banks A.S., Davis S.M., Bates S.H. & Myers M.G. (2000). Activation of downstream signals by the long form of the leptin receptor. *J. Biol. Chem.* 275:14563-14572.

Banks W.A., DiPalma C.R. & Farrell C.L. (1999). Impaired transport of leptin across the bloodbrain barrier in obesity. *Peptide* 20:1341-5.

Banks W.A. & Farrell C.L. (2003). Impaired transport of leptin across the blood-brain barrier in obesity is acquired and reversible. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 285:E10-5.

Banks W.A. (2008). The blood-brain barrier as a cause of obesity. *Curr. Pharm. Des.* 14:1606-14.

Barone F.C., Arvin B., White R.F., Miller A., Webb C.L., Willette R.N., Lysko P.G. & Feuerstein G.Z. (1997). Tumor necrosis factor-alpha. A mediator of focal ischemic brain injury. *Stroke* 28:1233-1244.

Barone F.C. & Feuerstein G.Z. (1999). Inflammatory mediators and stroke: new opportunities for novel therapeutics. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 19:819-834.

Basu A., Krady J.K., Enterline J.R. & Levison S.W. (2002). Transforming growth factor beta1 prevents IL-1beta-induced microglial activation, whereas TNFalpha- and IL-6-stimulated activation are not antagonized. *Glia* 40:109-120.

- Bates S., Read S.J., Harrison D.C., Topp S., Morrow R., Gale D., Murdock P., Barone F.C., Parsons A.A. & Gloger I.S. (2001).** Characterisation of gene expression changes following permanent MCAO in the rat using subtractive hybridisation. *Mol. Brain Res.* 93:70-80.
- Baumann H., Morella K.K., White D.W., Dembski M., Bailon P.S., Kim H., Lai C.F. & Tartaglia L.A. (1996).** The full-length leptin receptor has signaling capabilities of interleukin 6-type cytokine receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93:8374-8.
- Becker K.J. (1998).** Inflammation and acute stroke. *Curr. Opin. Neurol.* 11:45-9.
- Bederson J.B., Pitts L.H., Germano S.M., Nishimura M.C., Davis R.L. & Bartkowski H.M. (1986).** Evaluation of 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride as a stain for detection and quantification of experimental cerebral infarction in rats. *Stroke* 17:1304-8.
- Bednar M.M., Fanburg J.C., Anderson M.L., Raymond S.J., Dooley R.H. & Gross C.E. (1994).** Comparison of triphenyltetrazolium dye with light microscopic evaluation in a rabbit model of acute cerebral ischaemia. *Neurol. Res.* 16:129-32.
- Beech J.S., Reckless J., Mosedale D.E., Grainger D.J., Williams S.C. & Menon D.K. (2001).** Neuroprotection in ischemia-reperfusion injury: an anti-inflammatory approach using a novel broad-spectrum chemokine inhibitor. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 21:683-689.
- Bélangier M. & Magistretti P.J. (2009).** The role of astroglia in neuroprotection. *D. Clin. Neurosci.* 11:281-295.
- Belayev L., Busto R., Zhao W., Fernandez G. & Ginsberg M.D. (1999).** Middle cerebral artery occlusion in the mouse by intraluminal suture coated with poly-l-lysine: neurological and histological validation. *Brain Res.* 833:181-90.

- Beltowski J., Jochem J., Wojcicka G. & Zwirska-Korczala K. (2004).** Influence of intravenously administered leptin on nitric oxide production, renal hemodynamics and renal function in the rat. *Regul. Pept.* 120:59-67.
- Beltowski J., Wojcicka G. & Borkowska E. (2002).** Human leptin stimulates systemic nitric oxide production in the rat. *Obes. Res.* 10:939-46.
- Berkowitz I.D., Gervais H., Schleien C.L., Koehler R.C., Dean J.M. & Traystman R.J. (1991).** Epinephrine dosage effects on cerebral and myocardial blood flow in an infant swine model of cardiopulmonary resuscitation. *Anesthesiology* 75:1041-1050.
- Bezzi P., Domercq M., Brambilla L., Galli R., Schols D., De Clercq E., Vescovi A., Bagetta G., Kollias G, Meldolesi J. & Volterra A. (2001).** CXCR4-activated astrocyte glutamate release via TNFalpha: Amplification by microglia triggers neurotoxicity. *Nat. Neurosci.* 4:702-710.
- Bezzi P., Gundersen V., Galbete J.L., Galbete J.L., Seifert G., Steinhäuser C., Pilati E. & Volterra A. (2004).** Astrocytes contain a vesicular compartment that is competent for regulated exocytosis of glutamate. *Nat. Neurosci.* 7:613-620.
- Bignami A., Eng L.F., Dahl D. & Uyeda C.T. (1972).** Localization of the glial fibrillary acidic protein in astrocytes by immunofluorescence. *Brain Res.* 43:429-435.
- Bjørbaek C., Elmquist J.K., Frantz J.D., Shoelson S.E. & Flier J.S. (1998a).** Identification of SOCS-3 as a potential mediator of central leptin resistance. *Mol. Cell.* 1:619-625.
- Bjørbaek C., Elmquist J.K., Michl P., Ahima R.S., van Bueren A., McCall A.L. & Flier J.S. (1998b).** Expression of leptin receptor isoforms in rat brain microvessels. *Endocrinology.* 139:3485-3491.

- Bjørbaek C., Lavery H.J., Bates S.H., Olson R.K., Davis S.M., Flier J.S. & Myers M.G. (2000).** SOCS3 mediates feedback inhibition of the leptin receptor via Tyr(985). *J. Biol. Chem.* 275:40649-57.
- Bjorbaek C., Uotani S., da Silva B. & Flier J.S. (1997).** Divergent signaling capacities of the long and short isoforms of the leptin receptor. *J. Biol. Chem.* 272: 32686-32695.
- Bodary P.F., Westrick R.J., Wickenheiser K.J., Shen Y. & Eitzman D.T. (2002).** Effect of leptin on arterial thrombosis following vascular injury in mice. *JAMA* 287:1706-9.
- Bolanos J.P., Heales S.J., Land J.M. & Clark J.B. (1995).** Effect of peroxynitrite on the mitochondrial respiratory chain: differential susceptibility of neurones and astrocytes in primary culture. *J. Neurochem.* 64:1965-1672.
- Bonni A., Sun Y., Nadal-Vicens M., Bhatt A., Frank D.A, Rozovsky I., Stahl N., Yancopoulos G.D. & Greenberg M.E. (1997).** Regulation of gliogenesis in the central nervous system by the JAK-STAT signaling pathway. *Science* 278:477-483.
- Bonvento G., Sibson N. & Pellerin L. (2002).** Does glutamate image your thoughts? *Trends Neurosci.* 25:359-64.
- Bose B., Osterholm J.L. & Berry R. (1984).** A reproducible experimental model of focal cerebral ischemia in the cat. *Brain Res.* 311:385-91.
- Brabers N.A. & Nottet H.S. (2006).** Role of the pro-inflammatory cytokines TNF-alpha and IL-1beta in HIV-associated dementia. *Eur. J. Clin. Invest.* 36:447-458.
- Bromberg JF. (2001).** Activation of STAT proteins and growth control. *Bioessays* 23:161-9.
- Brown A.M. & Ransom B.R. (2007).** Astrocyte glycogen and brain energy metabolism. *Glia* 55:1263-1271.

- Brown A.M., Sickmann H.M., Fosgerau K., Lund T.M., Schousboe A., Waagepetersen H.S. & Ransom B.R. (2005).** Astrocyte glycogen metabolism is required for neural activity during aglycemia or intense stimulation in mouse white matter. *J. Neurosci. Res.* 79:74-80.
- Brown A.M., Tekkok S.B. & Ransom B.R. (2003).** Glycogen regulation and functional role in mouse white matter. *J Physiol.* 549:501-512.
- Bruce A.J, Boling W., Kindy M.S., Peschon J., Kraemer P.J., Carpenter M.K., Holtsberg F.W. & Mattson M.P. (1996).** Altered neuronal and microglial responses to excitotoxic and ischemic brain injury in mice lacking TNF receptors. *Nat. Med.* 2:788-794.
- Burguera B., Couce M.E., Curran G.L., Jensen M.D., Lloyd R.V., Cleary M.P. & Poduslo J.F. (2000a).** Obesity is associated with a decreased leptin transport across the blood-brain barrier in rats. *Diabetes* 49:1219-23.
- Burguera B., Couce M.E., Long J., Lamsam J., Laakso K., Jensen M.D., Parisi J.E. & Lloyd R.V. (2000b).** The long form of the leptin receptor (OB-Rb) is widely expressed in the human brain. *Neuroendocrinology* 71:187-95.
- Burns K., Martinon F. & Tschopp J. (2003).** New insights into the mechanism of IL-1beta maturation. *Curr. Opin. Immunol.* 15:26-30.
- Burnstock G. (2008).** Purinergic signalling and disorders of the central nervous system. *Nat. Rev. Drug Discov.* 7:575-590.
- Bushong E.A, Martone E.M, Jones Y.Z & Ellisman M.H. (2002).** Protoplasmic astrocytes in CA1 stratum radiatum occupy separate anatomical domains. *J. Neurosci.* 22:183-192.
- Candelario-Jalil E. (2009).** Injury and repair mechanisms in ischemic stroke: considerations for the development of novel neurotherapeutics. *Curr. Opin. Investig. Drugs* 10:644-654.

- Cappuzzo F., Toschi L., Tallini G., Ceresoli L., Domenichini I., Bartolini S., Finocchiaro G., Magrini E., Metro G., Cancellieri A., Trisolini R., Crino L., Bunn P.A., Santoro A., Franklin W.A., Varella-Garcia M. & Hirsch F.R. (2006).** Insulin-like growth factor receptor 1 (IGFR-1) is significantly associated with longer survival in non-small-cell lung cancer patients treated with gefitinib. *Medical Oncology* 17:1120-1127.
- Cardone M.H., Roy N., Stennicke H.R., Salvesen G.S., Franke T.F., Stanbridge E., Frisch S. & Reed J.C. (1998).** Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation. *Science* 282:1318-21.
- Cattaneo E., Conti L. & De-Fraja C. (1999).** Signalling through the JAK-STAT pathway in the developing brain. *Trends Neurosc.* 22:365-369.
- Ceddia R.B., Koistinen H.A., Zierath J.R. & Sweeney G. (2002).** Analysis of paradoxical observations on the association between leptin and insulin resistance. *FASEB J.* 16:1163-76.
- Cerretti D.P., Kozlosky C.J., Mosley B., Nelson N., Van Ness K., Greenstreet T.A., March C.J., Kronheim S.R., Druck .T, Cannizzaro L.A., et al. (1992).** Molecular cloning of the interleukin-1 beta converting enzyme. *Science* 256:97-100.
- Ceulemans A.G., Zgavc T., Kooijman R., Hachimi-Idrissi S., Sarre S. & Michotte Y. (2010).** The dual role of the neuroinflammatory response after ischemic stroke: modulatory effects of hypothermia. *J. Neuroinflammation* 7:74.
- Chakraborty A. & Tweardy D.J. (1998).** Granulocyte colony-stimulating factor activates a 72-kDa isoform of STAT3 in human neutrophils. *J. Leukoc. Biol.* 64:675-80.
- Chan P.H., Kamii H., Yang G., Gafni J., Epstein C.J., Carlson E. & Reola L. (1993).** Brain infarction is not reduced in SOD-1 transgenic mice after a permanent focal cerebral ischemia. *Neuroreport* 5:293-296.

- Chan T.O., Rittenhouse S.E. & Tschlis P.N. (1999).** AKT/PKB and other D3 phosphoinositide-regulated kinases: kinase activation by phosphoinositide-dependent phosphorylation. *Annu. Rev. Biochem.* 68:965-1014.
- Chen D., Fucini R.V., Olson A.L., Hemmings B.A. & Pessin J.E. (1999).** Osmotic shock inhibits insulin signaling by maintaining Akt/protein kinase B in an inactive dephosphorylated state. *Mol. Cell Biol.* 19:4684-94.
- Chen Q.X., Perkins K.L., Choi D.W. & Wong R.K. (1997).** Secondary activation of a cation conductance is responsible for NMDA toxicity in acutely isolated hippocampal neurons. *J. Neurosci.* 17:4032-6.
- Chen Y. & Swanson R.A. (2003).** Astrocytes and brain injury. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 23:137-149.
- Chesler M. (2005).** Failure and function of intracellular pH regulation in acute hypoxic-ischemic injury of astrocytes. *Glia* 50:398-406.
- Cheunsuang O. & Morris R. (2005).** Astrocytes in the arcuate nucleus and median eminence that take up a fluorescent dye from the circulation express leptin receptors and neuropeptide Y Y1 receptors. *Glia* 52:228-33.
- Chin Y.E., Kitagawa M., Kuida K., Flavell R.A. & Fu X.Y. (1997).** Activation of the STAT signaling pathway can cause expression of caspase I and apoptosis. *Mol. Cell Biol.* 17:5328-5337.
- Choi J.S., Kim S.Y., Park H.J., Cha J.H., Choi Y.S., Kang J.E., Chung J.W., Chun M.H. & Lee M.Y. (2003a).** Upregulation of gp130 and differential activation of STAT and p42/44 MAPK in the rat hippocampus following kainic acid-induced seizures. *Mol. Brain Res.* 119:10-8.
- Choi J.S., Kim S.Y., Cha J.H., Choi Y.S., Sung K.W., Oh S.T., Kim O.N., Chung J.W., Chun M.H., Lee S.B. & Lee M.Y. (2003b).** Upregulation of gp130 and STAT3

activation in the rat hippocampus following transient forebrain ischemia. *Glia* 41:237-46.

Chong Z.Z., Kang J.Q. & Maiese K. (2002). Erythropoietin is a novel vascular protectant through activation of Akt1 and mitochondrial modulation of cysteine proteases. *Circulation* 106:2973-9.

Christov A., Ottman J.T. & Grammas P. (2004). Vascular inflammatory, oxidative and protease-based processes: implications for neuronal cell death in Alzheimer's disease. *Neurol. Res.* 26:540-546.

Chu L.S., Wei E.Q., Yu G.L., Fang S.H., Zhou Y., Wang M.L. & Zhang W.P. (2006). Pranlukast reduces neutrophil but not macrophage/microglial accumulation in brain after focal cerebral ischemia in mice. *Acta. Pharmacol. Sin.* 27:282-288.

Clark S.R., McMahon C.J., Gueorguieva I., Rowland M., Scarth S., Georgiou R., Tyrrell P.J., Hopkins S.J. & Rothwell N.J. (2008). Interleukin-1 receptor antagonist penetrates human brain at experimentally therapeutic concentrations. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 28:387-394.

Clark W.M., Lauten J.D., Lessov N., Woodward W. & Coull B.M. (1995). The influence of antiadhesion therapies on leukocyte subset accumulation in central nervous system ischemia in rats. *J. Mol. Neurosci.* 6:43-50.

Clark W.M., Lessov N., Lauten J.D. & Hazel K. (1997). Doxycycline treatment reduces ischemic brain damage in transient middle cerebral artery occlusion in the rat. *J. Mol. Neurosci.* 9:103-108.

Clark W.M., Madden K.P., Rothlein R. & Zivin J.A. (1991). Reduction of central nervous system ischemic injury in rabbits using leukocyte adhesion antibody treatment. *Stroke* 22:877-883.

- Clark W.M., Rinker L.G., Lessov N.S., Hazel K., Hill J.K., Stenzel-Poore M. & Eckenstein F. (2000).** Lack of interleukin-6 expression is not protective against focal central nervous system ischemia. *Stroke* 31:1715-20.
- Clausen B.H., Lambertsen K.L., Babcock A.A., Holm T.H., Dagnaes-Hansen F. & Finsen B. (2008).** Interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha are expressed by different subsets of microglia and macrophages after ischemic stroke in mice. *J. Neuroinflammation* 5:46.
- Coffer P.J. & Woodgett J.R. (1991).** Molecular cloning and characterisation of a novel putative protein-serine kinase related to the cAMP-dependent and protein kinase C families. *Eur. J. Biochem.* 201:475-81.
- Cohen B., Novick D. & Rubinstein M. (1996).** Modulation of insulin activities by leptin. *Science* 274:1185-8.
- Cole D.J., Durummond J.C., Ghazal E.A. & Shappiro H.M. (1990).** A reversible component of cerebral injury as identified by the histochemical stain 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC). *Acta. Neuropathol.* 80:152-5.
- Connolly E.S., Winfree C.J., Prestigiacomo C.J., Kim S.C., Choudhri T.F., Hoh B.L., Naka Y., Solomon R.A. & Pinsky D.J. (1997).** Exacerbation of cerebral injury in mice that express the P-selectin gene: identification of P-selectin blockade as a new target for the treatment of stroke. *Circ. Res.* 81: 304-310.
- Considine R.V., Sinha M.K., Heiman M.L., Kriauciunas A., Stephens T.W., Nyce M.R., Ohannesian J.P., Marco C.C., McKee L.J. & Bauer T.L. (1996).** Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans. *N. Engl. J. Med.* 334:292-5.
- Conway G. (2006).** STAT3-dependent pathfinding and control of axonal branching and target selection. *Dev. Biol.* 296:119-136.

- Copeland N.G., Gilbert D.J., Schindler C., Zhong Z., Wen Z., Darnell J.E. Jr., Mui A.L., Miyajima A., Quelle F.W. & Ihle J.N. (1995).** Distribution of the mammalian Stat gene family in mouse chromosomes. *Genomics* 29:225-8.
- Copin J.C., Goodyear M.C., Gidday J.M., Shah A.R., Gascon E., Dayer A., Morel D.M. & Gasche Y. (2005).** Role of matrix metalloproteinases in apoptosis after transient focal cerebral ischemia in rats and mice. *Eur. J. Neurosci.* 22:1597-1608.
- Corasaniti M.T., Maiuolo J., Maida S., Fratto V., Navarra M., Russo R., Amantea D., Morrone L.A. & Bagetta G. (2007).** Cell signaling pathways in the mechanisms of neuroprotection afforded by bergamot essential oil against NMDA-induced cell death in vitro. *Br. J. Pharmacol.* 151:518-29.
- Cornell-Bell A.H., Finkbeiner S.M., Cooper M.S. & Smith S.J. (1990).** Glutamate induces calcium waves in cultured astrocytes: long-range glial signaling. *Science* 247:470-473.
- Crockard A., Ianotti F., Hunstock A.T., Smith R.D., Harris R.J. & Symon L. (1980).** Cerebral blood flow and edema following carotid occlusion in the gerbil. *Stroke* 11:494-498.
- D'Ambrosio R., Gordon D.S. & Winn H.R. (2002).** Differential role of KIR channel and Na(+)/K(+)-pump in the regulation of extracellular K(+) in rat hippocampus. *J Neurophysiol.* 87:87-102.
- Dalkara T., Irikura K., Huang Z., Panahian N. & Moskowitz M.A. (1995).** Cerebrovascular responses under controlled and monitored physiological conditions in the anesthetized mouse. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 15:631-638.
- Danbolt N.C. (2001).** Glutamate uptake. *Prog Neurobiol.* 65:1-105.
- Darnell J.E. Jr. (1997).** STATs and gene regulation. *Science* 277:1630-5.

- David M., Petricoin E., Benjamin C., Pine R., Weber M.J. & Larner A.C. (2002).** Requirement for MAP kinase (ERK2) activity in interferon alpha- and interferon beta-stimulated gene expression through STAT proteins. *Exp. Cell Res.* 272:45-55
- Davies C.A., Loddick S.A., Stroemer R.P., Hunt J. & Rothwell N.J. (1998).** An integrated analysis of the progression of cell responses induced by permanent focal middle cerebral artery occlusion in the rat. *Exp. Neurol.* 154:199-212.
- De Ley G., Weyne J., Demeester G., Stryckmans K., Goethals P. & Leusen I. (1989).** Streptokinase treatment versus calcium overload blockade in experimental thromboembolic stroke. *Stroke* 20:357-361.
- De Matteis R. & Cinti S. (1998).** Ultrastructural immunolocalization of leptin receptor in mouse brain. *Neuroendocrinology* 68:412-9.
- Deitmer J.W. (2002).** A role for CO₂ and bicarbonate transporters in metabolic exchanges in the brain. *J. Neurochem.* 80:721-726.
- Deitmer J.W. & Rose C.R. (1996).** pH regulation and proton signalling by glial cells. *Prog Neurobiol.* 48:73-103.
- Dean J.M., Koehler R.C., Schleien C.L., Michael J.R., Chantarojanasiri T., Rogers M.C. & Traystman R.J. (1987).** Age-related changes in chest geometry during cardiopulmonary resuscitation. *J. Appl. Physiol.* 62:2212-2219.
- De-Fraja C., Conti L., Magrassi L., Govoni S. & Cattaneo E. (1998).** Members of the JAK/STAT proteins are expressed and regulated during development in the mammalian forebrain. *J. Neurosci. Res.* 54:320-330.
- DeGraba T.J. (1998).** The role of inflammation after acute stroke: utility of pursuing anti-adhesion molecule therapy. *Neurology* 51:S62-68
- Dellas C., Schäfer K., Rohm I., Lankeit M., Ellrott T., Faustin V., Riggert J., Hasenfuss G. & Konstantinides S. (2008).** Absence of leptin resistance in platelets from

morbidly obese individuals may contribute to the increased thrombosis risk in obesity. *Thromb. Haemost.* 100:1123-9.

Denes A., Thornton P., Rothwell N.J. & Allan S.M. (2009). Inflammation and brain injury: Acute cerebral ischaemia, peripheral and central inflammation. *Brain Behav. Immun.* 24:708-23.

Denes A., Vidyasagar R., Feng J., Narvainen J., McColl B.W., Kauppinen R.A. & Allan S.M. (2007). Proliferating resident microglia after focal cerebral ischaemia in mice. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 27:1941-1953.

Desagher S., Glowinski J. & Premont J. (1996). Astrocytes protect neurons from hydrogen peroxide toxicity. *J. Neurosci.* 16:2553-2562.

Diano S., Kalra S.P. & Horvath T.L. (1998). Leptin receptor immunoreactivity is associated with the Golgi apparatus of hypothalamic neurons and glial cells. *J. Neuroendocrinol.* 10:647-50.

Dicou E., Attoub S. & Gressens P. (2001). Neuroprotective effects of leptin in vivo and in vitro. *Neuroreport.* 12:3947-3951.

DiNapoli V.A., Benkovic S.A., Li X., Kelly K.A., Miller D.B., Rosen C.L., Huber J.D. & O'Callaghan J.P. (2010). Age exaggerates proinflammatory cytokine signaling and truncates signal transducers and activators of transcription 3 signaling following ischemic stroke in the rat. *Neuroscience* 170:633-44.

Dinarello C.A., Novick D., Puren A.J., Fantuzzi G., Shapiro L., Mühl H., Yoon D.Y., Reznikov L.L., Kim S.H. & Rubinstein M. (1998). Overview of interleukin-18: more than an interferon-gamma inducing factor. *J. Leukoc. Biol.* 63:658-64.

Dirnagl U., Iadecola C. & Moskowitz M.A. (1999). Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. *Trends Neurosci.* 22:391-7.

Dirnagl U., Simon R.P. & Hallenbeck J.M. (2003). Ischemic tolerance and endogenous neuroprotection. *Trends Neurosci.* 26:248-254.

- Doetsch F., Garcia-Verdugo J.M. & Alvarez-Buylla A. (1999).** Regeneration of a germinal layer in the adult mammalian brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:11619-11624.
- Drake C.T. & Iadecola C. (2007).** The role of neuronal signaling in controlling cerebral blood flow. *Brain Lang.* 102:141-152.
- Durukan A. & Tatlisumak T. (2007).** Acute ischemic stroke: overview of major experimental rodent models, pathophysiology, and therapy of focal cerebral ischemia. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 87:179-197.
- Dziennis S., Jia T., Ronnekleiv O.K., Hum P.D. & Alkayed N.J. (2007).** Role of signal transducer and activator of transcription-3 in estradiol-mediated neuroprotection. *J. Neurosci.* 27:7268-7274.
- Ekdahl C.T., Kokaia Z. & Lindvall O. (2009).** Brain inflammation and adult neurogenesis: the dual role of microglia. *Neuroscience* 158:1021-1029.
- Eklöf B. and Siesjö B.K. (1972a).** The effect of bilateral carotid artery ligation upon acid-base parameters and substrate levels in the rat brain. *Acta. Physiol. Scand.* 86:528-538.
- Eklöf B. & Siesjö B.K. (1972b).** The effect of bilateral carotid artery ligation upon the blood flow and the energy state of the rat brain. *Acta. Physiol. Scand.* 86:155-165.
- Eleff S.M., Maruki Y., Monsein L.H., Traystman R.J., Bryan R.N. & Koehler R.C. (1991).** Sodium, ATP, and intracellular pH transients during reversible complete ischemia of dog cerebrum. *Stroke* 22:233-241.
- Eliasson M.J.L., Sampei K., Mandir A.S., Hurn P.D., Traystman R.J., Bao J., Pieper A., Wang Z.Q., Dawson T.M., Snyder S.H. & Dawson V.L. (1997).** Poly(ADP-ribose) polymerase gene disruption renders mice resistant to cerebral ischemia. *Nature Med.* 3:1089-1095.
- Emsley H.C. & Tyrrell P.J. (2002).** Inflammation and infection in clinical stroke. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 22:1399-419.

- Eng L.F., Ghirnikar R.S. & Lee Y.L. (2000).** Glial fibrillary acidic protein: GFAP-thirty-one years (1969–2000). *Neurochem. Res.* 25:1439-1451.
- Eng L.F., Vanderhaeghen J.J., Bignami A., & Gerstl B. (1972).** An acidic protein isolated from fibrous astrocytes. *Brain Res.* 28:351-354.
- Eriksson P.S., Perfilieva E., Bjork-Eriksson T., Alborn A.M., Nordborg C., Peterson D.A. & Gage F.H. (1998).** Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nat. Med.* 4:1313-1317.
- Farina C., Aloisi F. & Meinl E. (2007).** Astrocytes are active players in cerebral innate immunity. *Trends Immunol.* 28:138-145.
- Folbergrová J., Memezawa H., Smith M.L. & Siesjö B.K. (1992).** Focal and perifocal changes in tissue energy state during middle cerebral artery occlusion in normo- and hyperglycemic rats. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 12:25-33.
- Frank D.A., Mahajan S. & Ritz J. (1997).** B lymphocytes from patients with chronic lymphocytic leukemia contain signal transducer and activator of transcription (STAT) 1 and STAT3 constitutively phosphorylated on serine residues. *J. Clin. Invest.* 100:3140-8.
- Frank-Cannon T.C., Alto L.T., McAlpine F.E. & Tansey MG. (2009).** Does neuroinflammation fan the flame in neurodegenerative diseases? *Mol Neurodegener.* 45:4-47.
- Franke T.F., Kaplan D.R., Cantley L.C. & Toker A. (1997).** Direct regulation of the Akt proto-oncogene product by phosphatidylinositol-3,4-bisphosphate. *Science* 275:665-8.
- Franke T.F., Tartof K.D. & Tsichlis P.N. (1994).** The SH2-like Akt homology (AH) domain of c-akt is present in multiple copies in the genome of vertebrate and invertebrate eucaryotes. Cloning and characterization of the *Drosophila melanogaster* c-akt homolog Dakt1. *Oncogene* 9:141-8.

- Friedlander R.M. & Yuan J (1998).** ICE, neuronal apoptosis and neurodegeneration. *Cell. Death Diff.* 5:823-831.
- Friedman J.M. & Halaas J.L. (1998).** Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature* 395:763-770.
- Frühbeck G. (1999).** Pivotal role of nitric oxide in the control of blood pressure after leptin administration. *Diabetes* 48:903-8.
- Fujioka K., Patane J., Lubina J. & Lau D. (1999).** CSF leptin levels after exogenous administration of recombinant methionyl human leptin. *Jama* 282:1517-1518.
- Fukunaga K. & Kawano T. (2003).** Akt is a molecular target for signal transduction therapy in brain ischemic insult. *J. Pharmacol. Sci.* 92:317-327.
- Gadea A. & Lopez-Colome A.M. (2001).** Glial transporters for glutamate, glycine, and GABA III. Glycine transporters. *J. Neurosci. Res.* 64:218-222.
- Garcia J.H. (1984).** Experimental ischemic stroke: A review. *Stroke* 15:5-14.
- Garcia M.L., Usachev Y.M., Thayer S.A., Strehler E.E. & Windebank A.J. (2001).** Plasma membrane calcium ATPase plays a role in reducing Ca(2+)-mediated cytotoxicity in PC12 cells. *J Neurosci Res.* 64:661-9.
- García-Cáceres C., Fuente-Martín E., Burgos-Ramos E., Granado M., Frago L.M., Barrios V., Horvath T., Argente J. & Chowen J.A. (2011).** Differential acute and chronic effects of leptin on hypothalamic astrocyte morphology and synaptic protein levels. *Endocrinology* 152:1809-18.
- Gasche Y., Copin J.C., Sugawara T., Fujimura M. & Chan P.H. (2001).** Matrix metalloproteinase inhibition prevents oxidative stress associated blood-brain barrier disruption after transient focal cerebral ischemia. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 21:1393-1400.

- Garau A., Bertini R., Colotta F., Casilli F., Bigini P., Cagnotto A., Mennini T., Ghezzi P. & Villa P. (2005).** Neuroprotection with the CXCL8 inhibitor repertaxin in transient brain ischemia. *Cytokine* 30:125-131.
- Gary D.S., Bruce-Keller A.J., Kindy M.S. & Mattson M.P. (1998).** Ischemic and excitotoxic brain injury is enhanced in mice lacking the p55 tumor necrosis factor receptor. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 18:1283-1287.
- Gautron L., De Smedt-Peyrusse V. & Laye S. (2006).** Characterization of STAT3-expressing cells in the postnatal rat brain. *Brain Res.*1098.26-32.
- Gautron L., Lafon P., Chaigniau M., Tramu G. & Layé S. (2002).** Spatiotemporal analysis of signal transducer and activator of transcription 3 activation in rat brain astrocytes and pituitary following peripheral immune challenge. *Neuroscience* 112:717-29
- Genoud C., Quairiaux C., Steiner P., Hirling H., Welker E. & G. W.Knott. (2006).** Plasticity of astrocytic coverage and glutamate transporter expression in adult mouse cortex. *PLOS biology* 4:2057-2064.
- Ghilardi N. & Skoda R.C. (1997).** The leptin receptor activates Janus kinase 2 and signals for proliferation in a factor-dependent cell line. *Mol. Endocrinol.* 11:393-399.
- Ghilardi N., Ziegler S., Wiestner A., Stoffel R., Heim M.H. & Skoda R.C. (1996).** Defective STAT signaling by the leptin receptor in diabetic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 93:6231-5.
- Ginsberg M.D. (2008).** Neuroprotection for ischemic stroke: past, present and future. *Neuropharmacology* 55:363-389.
- Golden P.L., Maccagnan T.J. & Pardridge W.M. (1997).** Human blood-brain barrier leptin receptor Binding and endocytosis in isolated human brain microvessels. *J. Clin. Invest.* 99:14-18.

- Govek E. E., Newey S. E., Akerman C. J., Cross J. R., Van der Veken L. & Van Aelst L. (2004).** The X-linked mental retardation protein oligophrenin-1 is required for dendritic spine morphogenesis. *Nat. Neurosci.* 7:364-372.
- Grad J.M., Zeng X.R. & Boise L.H. (2000).** Regulation of Bcl-xL: a little bit of this and a little bit of STAT. *Curr. Opin. Oncol.* 12:543-9.
- Green D.R. & Reed J.C. (1998).** Mitochondria and apoptosis. *Science* 281:1309-12.
- Gregersen R., Lambertsen K. & Finsen B. (2000).** Microglia and macrophages are the major source of tumor necrosis factor in permanent middle cerebral artery occlusion in mice. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 20:53-65.
- Gu Z., Kaul M., Yan B., Kriedel S.J., Cul J., Strongin A., Smith J.W., Liddington R.C. & Lipton S.A. (2002).** S-nitrosylation of matrix metalloproteinases: signaling pathway to neuronal cell death. *Science* 297:1186-1190.
- Guo Z., Jiang H., Xu X., Duan W. & Mattson M.P. (2008).** Leptin-mediated cell survival signaling in hippocampal neurons mediated by JAK STAT3 and mitochondrial stabilization. *J. Biol. Chem.* 283:1754-63.
- Hailer N.P, Wirjatijasa F., Roser N., Hischebeth G.T., Korf H.W. & Dehghani F. (2001).** Astrocytic factors protect neuronal integrity and reduce microglial activation in an in vitro model of N-methyl-D-aspartate-induced excitotoxic injury in organotypic hippocampal slice cultures. *Eur. J. Neurosci.* 14:315-326.
- Hakle W., Kaste M., Bluhmki E., Brozman M., Davalos A., Guidetti D., Larrue V., Lees K.R., Medeghri Z., Machnig T., Schneider D., Von Kummer R., Wahlgren N. & Toni D. (2008).** Trombolysis with alteplase 3 to 4,5 Hours after ischemic stroke. *N. Engl. J. Med.* 359: 1317-29.
- Halaas J.L., Gajiwala K.S., Maffei M., Cohen S.L., Chait B.T., Rabinowitz D., Lallone R.L., Burley S.K. & Friedman J.M. (1996).** Weight-reducing effects of the plasmaprotein encoded by the obese. *Gene Science* 269:543-546

- Halassa M.M., Fellin T., Takano H., Dong J.H. & Haydon P.G. (2007).** Synaptic islands defined by the territory of a single astrocyte. *J. Neurosci.* 27:6473-6477.
- Hallenbeck J.M. (1996).** Significance of the inflammatory response in brain ischemia. *Acta Neurochir. Suppl.* 66:27-31.
- Hara H., Friedlander R.M., Gagliardini V., Ayata C., Fink K., Huang Z., Shimizu-Sasamata M., Yuan J. & Moskowitz M.A. (1997).** Inhibition of interleukin 1b converting enzyme family proteases reduces ischemic and excitotoxic neuronal damage. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:2007-2012.
- Harvey J. (2007).** Leptin regulation of neuronal excitability and cognitive function. *Curropin. Pharmacol.* 7:643-647.
- Hattori K., Lee H., Hurn P.D., Crain B.J., Traystman R.J. & DeVries A.C. (2000).** Cognitive deficits after focal cerebral ischemia in mice. *Stroke* 31:1939-1944.
- He F., Ge W., Martinowich K., Becker-Catania S., Coskun V., Zhu W., Wu H., Castro D., Guillemot F., Fan G., de Vellis J. & Sun Y.E. (2005).** A positive autoregulatory loop of Jak-STAT signaling controls the onset of astrogliogenesis. *Nat. Neurosci.* 8:616-625.
- Heo J.H., Lucero J., Abumiya T., Koziol J.A., Copeland B.R. & del Zoppo G.J. (1999).** Matrix metalloproteinases increase very early during experimental focal cerebral ischemia. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 19:624-633.
- Herrmann J.E., Imura T., Song B., Qi J., Ao Y., Nguyen T.K., Korsak R.A., Takeda K., Akira S. & Sofroniew M.V. (2008).** STAT3 is a critical regulator of astrogliosis and scar formation after spinal cord injury. *J. Neurosci.* 28:7231-43.
- Higashida R.T., Furlan A.J., Roberts H., Tomsik T., Connors B., Barr J., Dillon W., Warach., Broderick J., Tilley B. & Sacks D. (2003).** Trial design and reporting standards for intra-arterial thrombolysis for acute ischemic stroke. *Stroke* 34:109-37.

- Hill M.M., Andjelkovic M., Brazil D.P., Ferrari S., Fabbro D. & Hemmings B.A. (2001).** Insulin-stimulated protein kinase B phosphorylation on Ser-473 is independent of its activity and occurs through a staurosporine-insensitive kinase. *J. Biol. Chem.* 276:25643-6.
- Hoggard N., Hunter L., Duncan J.S., Williams L.M., Trayhurn P. & Mercer J.G. (1997).** Leptin and leptin receptor mRNA and protein expression in the murine fetus and placenta. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:11073–11078.
- Holthoff K. & Witte O.W. (2000).** Directed spatial potassium redistribution in rat neocortex. *Glia* 29:288-292.
- Hosoi T., Okuma Y. & Nomura Y. (2000).** Expression of leptin receptors and induction of IL-1 β transcript in glial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 273:312-5.
- Hossmann K.A. (1991).** Animal models of cerebral ischemia. I. Review of literature. *Cerebrovasc. Dis.* 1:2-15.
- Hossmann K.A. (2006).** Pathophysiology and therapy of experimental stroke. *Cell. Mol. Neurobiol.* 26:1057-1083.
- Hsuchou H., He Y., Kastin A.J., Tu H., Markadakis E.N., Rogers R.C., Fossier P.B. & Pan W. (2009a).** Obesity induces functional astrocytic leptin receptors in hypothalamus. *Brain* 132:889-902.
- Hsuchou H., Pan W., Barnes M.J. & Kastin A.J. (2009b).** Leptin receptor mRNA in rat brain astrocytes. *Peptides* 30:2275-80.
- Huang J. & Philbert M.A. (1995).** Distribution of glutathione and glutathione-related enzyme systems in mitochondria and cytosol of cultured cerebellar astrocytes and granule cells. *Brain Res.* 680:16-22.
- Huang Z., Huang P.L., Panahian N., Dalkara T., Fishman M.C. & Moskowitz M.A. (1994).** Effects of cerebral ischemia in mice deficient in neuronal nitric oxide synthase. *Science* 265:1883-1886.

- Hudgins W.R. & Garcia JH. (1970).** The effect of electrocautery, atmospheric exposure and surgical retraction on the permeability of the blood brain barrier. *Stroke* 1:375-380.
- Huising M.O., Stet R.J., Savelkoul H.F. & Verburg-van Kemenade B.M. (2004).** The molecular evolution of the interleukin-1 family of cytokines; IL-18 in teleost fish. *Dev. Comp. Immunol.* 28:395-413.
- Huszti Z., Prast H., Tran M.H., Fischer H. & Philippu A. (1998).** Glial cells participate in histamine inactivation in vivo. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 357:49-53.
- Hwa J.J., Ghibaudi L., Compton D., Fawzi A.B. & Strader C.D. (1996).** Intracerebroventricular injection of leptin increases thermogenesis and mobilizes fat metabolism in ob/ob mice. *Horm. Metab. Res.* 28:659-663.
- Iadecola C. & Anrather J. (2011).** The immunology of stroke: from mechanisms to translation. *Nat Med.* 17:796-808
- Iadecola C. & Nedergaard M. (2007).** Glial regulation of the cerebral microvasculature. *Nat. Neurosci.* 10:1369-1376.
- Iadecola C., Niwa K., Nogawa S., Zhao X., Nagayama M., Araki E., Morham S. & Ross M.E. (2001a).** Reduced susceptibility to ischemic brain injury and N-methyl-D-aspartate-mediated neurotoxicity in cyclooxygenase-deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 98:1294-1299.
- Iadecola C., Sugimoto K., Niwa K., Kazama K. & Ross M.E. (2001b).** Increased susceptibility to ischemic brain injury in cyclooxygenase-1-deficient mice. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 21:1436-1441.
- Ihle J.N. (1995).** Cytokine receptor signalling. *Nature* 377:591-594.
- Ikeda M., Yoshida S., Busto R., Santiso M. & Ginsberg M.D. (1986).** Polyphosphoinositides as a probable source of brain free fatty acids accumulated at the onset of ischemia. *J. Neurochem.* 47:123-132.

- Ito A., Mukaiyama A., Itoh Y., Nagase H., Thogersen I.B., Enghild J.J., Sasaguri Y. & Mori Y. (1996).** Degradation of interleukin 1beta by matrix metalloproteinases. *J. Biol. Chem.* 271:14657-60.
- Lucas S.M., Rothwell N.J. & Gibson R.M. (2006).** The role of inflammation in CNS injury and disease. *Br. J. Pharmacol.* 147:S232-40.
- Liu T., Clark R.K., McDonnell P.C., Young P.R., White R.F., Barone F.C. & Feuerstein G.Z. (1994).** Tumor necrosis factor-alpha expression in ischemic neurons. *Stroke* 25:1481-8.
- Jestaedt R. & Sandritter W. (1959).** Experiences with the TTC- (triphenyltetrazolium chloride) reaction for the pathological-anatomical diagnosis of fresh myocardial infarct. *Z Kreislaufforsch* 48:802-9.
- John G.R, Lee S.C. & Brosnan C.F. (2003).** Cytokines: powerful regulators of glial cell activation. *Neuroscientist* 9:10-22.
- Jones P.F., Jakubowicz T., Pitossi F.J., Maurer F. & Hemmings B.A. (1991).** Molecular cloning and identification of a serine/threonine protein kinase of the second-messenger subfamily. *Proc. Nati. Acad Sci U.S.A* 88:4171-75.
- Jourquin J., Tremblay E., Decanis N., Charton G., Hanessian S., Chollet A.M., Le Diguardher T., Khrestchatiski M. & Rivera S. (2003).** Neuronal activity-dependent increase of net matrix metalloproteinase activity is associated with MMP-9 neurotoxicity after kainate. *Eur. J. Neurosci.* 18:1507-1517.
- Justicia C., Gabriel C. & Planas A.M. (2000).** Activation of the JAK/STAT pathway following transient focal cerebral ischemia: signaling through Jak1 and Stat3 in astrocytes. *Glia* 30:253-270.
- Kacem K., Lacombe P., Seylaz J. & Bonvento G. (1998).** Structural organization of the perivascular astrocyte endfeet and their relationship with the endothelial glucose transporter: a confocal microscopy study. *Glia* 23:1-10.

- Kadhim H.J., Duchateau J. & Sebire G. (2008).** Cytokines and brain injury: invited review. *J. Intensive Care Med.* 23:236-249.
- Kammermeier P. J. (2008).** Endogenous homer proteins regulate metabotropic glutamate receptor signaling in neurons. *J. Neurosci.* 28:8560-8567.
- Kammermeier P. J., Xiao B., Tu J. C., Worley P. F. & Ikeda S. R. (2000).** Homer proteins regulate coupling of group I metabotropic glutamate receptors to N-type calcium and M-type potassium channels. *J. Neurosci.* 20:7238-7245.
- Kammermeier P. J. & Worley P. F. (2007).** Homer 1a uncouples metabotropic glutamate receptor 5 from postsynaptic effectors. *Proc. Natl Acad. Sci.* 104:6055-6060.
- Kaneko D., Nakamura N. & Ogawa T. (1985).** Cerebral infarction in rats using homologous blood emboli: Development of a new experimental model. *Stroke* 16:76-84.
- Kaushal V. & Schlichter L.C. (2008).** Mechanisms of microglia-mediated neurotoxicity in a new model of the stroke penumbra. *J. Neurosci.* 28:2221-2230.
- Kim A.H., Yano H., Cho H., Meyer D., Monks B., Margolis B., Birnbaum M.J. & Chao M.V. (2002).** Akt1 regulates a JNK scaffold during excitotoxic apoptosis. *Neuron* 35:697-709.
- Kim JS. (1996).** Cytokines and adhesion molecules in stroke and related diseases. *J Neurol. Sci.* 137:69-78.
- Kim S.Y., Park H.J., Choi J.S., Lee J.E., Cha J.H., Choi Y.S., Cho K.O., Chun M.H. & Lee M.Y. (2004).** Ischemic preconditioning-induced expression of gp130 and STAT3 in astrocytes of the rat hippocampus. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 129:96-103.
- Kim T.K. & Maniatis T. (1996).** Regulation of interferon-gamma-activated STAT1 by the ubiquitin-proteasome pathway. *Science* 273:1717-9.

- Kimura K., Tsuda K., Baba A., Kawabe T., Boh-oka S., Ibata M., Moriwaki C., Hano T. & Nishio I. (2000).** Involvement of nitric oxide in endothelium-dependent arterial relaxation by leptin. *Biochem. Biophys Res. Commun.* 273:745-9.
- Kirino T. (1982).** Delayed neuronal death in the gerbil hippocampus following ischemia. *Brain Res.* 239:57-69.
- Kirov S.A., Sorra K.E. & Harris K.M. (1999).** Slices have more synapses than perfusion-fixed hippocampus from both young and mature rats. *J. Neurosci.* 19:2876-2886.
- Kitagawa H., Warita H., Sasaki C., Zhang W.R., Sakai K., Shiro Y., Mitsumoto Y., Mori T. & Abe K. (1999).** Immunoreactive Akt, PI3-K and ERK protein kinase expression in ischemic rat brain. *Neurosci. Lett.* 274:45-8.
- Kitagawa K., Matsumoto M., Mabuchi T., Yagita Y., Ohtsuki T., Hori M. & Yanagihara T. (1998).** Deficiency of intercellular adhesion molecule 1 attenuates microcirculatory disturbance and infarction size in focal cerebral ischemia. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 18:1336-1345.
- Kloek C., Haq A.K. & Dunn S.L. (2002).** Regulation of Jak kinases by intracellular leptin receptor sequences. *J. Biol. Chem.* 277:41547-41555.
- Koehler R.C., Chandra N., Guerci A.D., Tsitlik J., Traystman R.J., Rogers M.C. & Weisfeldt M.L. (1983).** Augmentation of cerebral perfusion by simultaneous chest compression and lung inflation with abdominal binding after cardiac arrest in dogs. *Circulation* 67:266-275
- Kofuji P. & Newman E.A. (2004).** Potassium buffering in the central nervous system. *Neuroscience* 129:1045-1056.
- Koizumi J., Yoshida Y., Nakazawa T. & Ooneda G. (1986).** Experimental studies of ischemic brain edema. 1. A new experimental model of cerebral embolism in rats in which recirculation can be introduced in the ischemic area. *Jpn. J. Stroke* 8:1-8.

- Komine-Kobayashi M., Zhang N., Liu M., Tanaka R., Hara H., Osaka A., Mochizuki H., Mizuno Y. & Urabe T. (2006).** Neuroprotective effect of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor in transient focal ischemia of mice. *J. Cereb Blood Flow Metab.* 26:402-413.
- Kondo T., Reaume A.G., Huang T.T., Carlson E., Murakami K., Chen S.F., Hoffman E.K., Scott R.W., Epstein C.J. & Chan P.H. (1997).** Reduction of CuZn-superoxide dismutase activity exacerbates neuronal cell injury and edema formation after transient focal cerebral ischemia. *J. Neurosci.* 17:4180-9
- Konishi H., Shinomura T., Kuroda S., Ono Y. & Kikkawa U. (1994).** Molecular cloning of rat RAC protein kinase alpha and beta and their association with protein kinase C zeta. *Biochem. Biophys Res. Commun.* 205:817-25.
- Konstantinides S., Schäfer K., Koschnick S. & Loskutoff D.J. (2001).** Leptin-dependent platelet aggregation and arterial thrombosis suggests a mechanism for atherothrombotic disease in obesity. *J. Clin. Invest.* 108:1533-40.
- Kris J. & Lalancette-Hebert M. (2009).** Inflammation, plasticity and real-time imaging after cerebral ischemia. *Acta. Neuropathol.* 117:497-509.
- Kudo M., Aoyama A., Ichimori S. & Fukunaga N. (1982).** An animal model of cerebral infarction. Homologous blood clot emboli in rats. *Stroke* 13:505-508.
- Kumar A., Commane M., Flickinger T.W., Horvath C.M. & Stark G.R. (1997).** Defective TNF-alpha-induced apoptosis in STAT1-null cells due to low constitutive levels of caspases. *Science* 278:1630-1632.
- Kurrimbux D., Gaffen Z., Farrell C.L., Martin D. & Thomas S.A. (2004).** The involvement of the blood-brain and the blood-cerebrospinal fluid barriers in the distribution of leptin into and out of the rat brain. *Neurosci.*123:527-536.
- Lai A.Y. & Todd K.G. (2006).** Microglia in cerebral ischemia: molecular actions and interactions. *Can J. Physiol. Pharmacol.* 84:49-59.

- Lakhan S.E., Kirchgessner A. & Hofer M. (2009).** Inflammatory mechanisms in ischemic stroke: therapeutic approaches. *J. Transl. Med.* 7:97.
- Lambertsen K.L., Clausen B.H., Babcock A.A., Gregersen R., Fenger C., Nielsen H.H., Haugaard L.S., Wirefeldt M., Nielsen M., Dagnaes-Hansen F., Bluethmann H., Faergeman N., Meldgaard M., Deierborg T. & Finsen B. (2009).** Microglia protect neurons against ischemia by synthesis of tumor necrosis factor. *J. Neurosci.* 29:1319-1330.
- Lashley K.S. (1933).** Integrative functions of the cerebral cortex. *Physiol. Rev.* 13:1-42.
- Lee R., Kermani P., Teng K.K. & Hempstead BL. (2001).** Regulation of cell survival by secreted proneurotrophins. *Science* 294:1945-1948.
- Levine S. & Sohn D. (1969).** Cerebral ischemia in infarct and adult gerbils: Relation to incomplete Circle of Willis. *Arch. Pathol.* 87:315-317.
- Li C. & Friedman J.M. (1999).** Leptin receptor activation of SH2 domain containing protein tyrosine phosphatase 2 modulates Ob receptor signal transduction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 96:9677-82.
- Li F., Omae T. & Fisher M. (1999).** Spontaneous hyperthermia and its mechanism in the intraluminal suture middle cerebral artery occlusion model of rats. *Stroke* 30:2464-70.
- Li L., Lundkvist A., Andersson D., Wilhelmsson U., Nagai N., Pardo A.C., Nodin C., Ståhlberg A., Aprico K., Larsson K., Yabe T., Moons L., Fotheringham A., Davies I., Carmeliet P., Schwartz J.P., Pekna M., Kubista M., Blomstrand F., Maragakis N., Nilsson M. & Pekny M. (2008).** Protective role of reactive astrocytes in brain ischemia. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 28:468-481.
- Li Q. & Verma I.M. (2002).** NF-kappaB regulation in the immune system. *Nat Rev Immunol.* 2:725-34.

- Li X.L., Aou S., Oomura Y., Hori N., Fukunaga K. & Hori T. (2002).** Impairment of long-term potentiation and spatial memory in leptin receptor-deficient rodents. *Neuroscience* 113:607–615.
- Liberto C.M., Albrecht P.J., Herx L.M., Yong V.W. & Levison S.W. (2004).** Pro-regenerative properties of cytokine-activated astrocytes. *J. Neurochem.* 89:1092–1100.
- Liesz A., Suri-Payer E., Veltkamp C., Doerr H., Sommer C., Rivest S., Giese T. & Veltkamp R. (2009).** Regulatory T cells are key cerebroprotective immunomodulators in acute experimental stroke. *Nat. Med.* 15:192-199.
- Lim C.P. & Cao X. (2006).** Structure, function and regulation of STAT proteins. *Mol. Biosyst.* 2:536-50.
- Limbrick D.D., Jr., Pal S. & DeLorenzo R.J. (2001).** Hippocampal neurons exhibit both persistent Ca²⁺ influx and impairment of Ca²⁺ sequestration/extrusion mechanisms following excitotoxic glutamate exposure. *Brain Res* 894:56-67.
- Lin S., Saxena N.K., Ding X., Stein L.L. & Anania F.A. (2006).** Leptin increases tissue inhibitor of metalloproteinase I (TIMP-1) gene expression by a specificity protein 1/signal transducer and activator of transcription 3 mechanism. *Mol. Endocrinol.* 20:3376-88.
- Lipton P. (1999).** Ischemic cell death in brain neurons. *Physiol. Rev.* 79:1431-568.
- Liu J., Butler K.R., Buxbaum S.G., Sung J.H., Campbell B.W. & Taylor H.A. (2010).** Leptinemia and its association with stroke and coronary heart disease in the Jackson heart study. *Clin. Endocrinol.* 72:32-7.
- Ljunggren B., Ratcheson R.A. & Siesjo B.K. (1974).** Cerebral metabolic state following complete compression ischemia. *Brain Res.* 73:291-307.

- Liszczyk T.M., Hedley-Whyte E.T., Adams J.F., Han D.H., Kolluri V.S., Vacanti F.X., Heros R.C. & Zervas N.T. (1984).** Limitations of tetrazolium salts in delineating infarcted brains. *Acta. Neuropathol.* 65:150-7.
- Lois C. & Alvarez-Buylla A. (1993).** Proliferating subventricular zone cells in the adult mammalian forebrain can differentiate into neurons and glia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 90:2074-2077.
- Longa E.Z., Weinstein P.R., Carlson S. & Cummins R. (1989).** Reversible middle cerebral artery occlusion without craniotomy in rats. *Stroke* 20:84-91
- Lord G.M., Matarese G. & Howard J.K. (1998).** Leptin modulates the T-cell immune response and reverses starvation-induced immunosuppression. *Nature* 394:897-901.
- Lu J., Park C.S., Lee S.K., Shin D.W. & Kang J.H. (2006).** Leptin inhibits 1-methyl-4-phenylpyridinium-induced cell death in SH-SY5Y cells. *Neurosci. Lett.* 407:240-243.
- Lu J., Helton T. D., Blanpied T. A., Rać cz B., Newpher T. M., Weinberg R. J. & Ehlers M. D. (2007).** Postsynaptic positioning of endocytic zones and AMPA receptor cycling by physical coupling of dynamin-3 to Homer. *Neuron* 55:874–889.
- Madl J.E. & Burgesser K. (1993).** Adenosine triphosphate depletion reverses sodium-dependent, neuronal uptake of glutamate in rat hippocampal slices. *J Neurosci.* 13:4429-44.
- Magistretti P.J. (2008).** Brain energy metabolism. Academic. Press. 271-292.
- Maiese K., Li F. & Chong Z.Z. (2004).** Erythropoietin in the brain: can the promise to protect be fulfilled? *Trends Pharmacol. Sci.* 25:577-583.
- Maresh G.A., Maness L.M., Zadina J.E. & Kastin A.J. (2001).** In vitro demonstration of a saturable transport system for leptin across the blood-brain barrier. *Life Sci.* 69:67-73.

- Makar T.K., Nedergaard M., Preuss A., Gelbard A.S., Perumal A.S. & Cooper A.J. (1994).** Vitamin E, ascorbate, glutathione, glutathione disulfide, and enzymes of glutathione metabolism in cultures of chick astrocytes and neurons: evidence that astrocytes play an important role in antioxidative processes in the brain. *J. Neurochem.* 62:45-53.
- Mastronardi C.A., Yu W.H. & McCann S.M. (2009).** Resting and circadian release of nitric oxide is controlled by leptin in male rats. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 99:5721-6.
- Matsuzaki H., Tamatani M., Mitsuda N., Namikawa K., Kiyama H., Miyake S. & Tohyama M. (1999).** Activation of Akt kinase inhibits apoptosis and changes in Bcl-2 and Bax expression induced by nitric oxide in primary hippocampal neurons. *J. Neurochem.* 73:2037-46.
- Mayo L.D. & Donner D.B. (2001).** A phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway promotes translocation of Mdm2 from the cytoplasm to the nucleus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98:10983-5.
- Mazzoni I.E., Said F.A., Aloyz R., Miller F.D. & Kaplan D. (1999).** Ras regulates sympathetic neuron survival by suppressing the p53-mediated cell death pathway. *J. Neurosci.* 19:9716-27.
- McColl B.W., Rose N., Robson F.H., Rothwell N.J. & Lawrence C.B. (2010).** Increased brain microvascular MMP-9 and incidence of haemorrhagic transformation in obese mice after experimental stroke. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 30:267-72.
- Meisel C., Schwab J.M., Prass K., Meisel A. & Dirnagl U. (2005).** Central nervous system injury-induced immune deficiency syndrome. *Nat. Rev. Neurosci.* 6:775-786.
- Melani A., Turchi D., Vannucchi M.G., Cipriani S., Gianfriddo M. & Pedata F. (2005).** ATP extracellular concentrations are increased in the rat striatum during in vivo ischemia. *Neurochem. Int.* 47:442-448.

- Mennicken F., Maki R., de Souza E.B. & Quirion R. (1999).** Chemokines and chemokine receptors in the CNS: a possible role in neuroinflammation and patterning. *Trends Pharmacol. Sci.* 20:73-8.
- Meyer J.S., Gotoh F. & Tazaki Y. (1962).** Circulation and metabolism following experimental cerebral embolism. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 21:4-24.
- Michael J.R., Guerci A.D., Koehler R.C., Shi A.Y., Tsitlik J., Chandra N., Niedermeyer E., Rogers M.C., Traystman R.J. & Weisfeldt M.L. (1984).** Mechanisms by which epinephrine augments cerebral and myocardial perfusion during cardiopulmonary resuscitation in dogs. *Circulation* 69:822-835.
- Min K.J., Yang M.S., Kim S.U., Jou I. & Joe E.H. (2006).** Astrocytes induce hemeoxygenase-1 expression in microglia: a feasible mechanism for preventing excessive brain inflammation. *J. Neurosci.* 26:1880-1887.
- Mitchell J.L., Morgan D.A., Correia M.L. Mark A.L., Sivitz W.I. & Haynes W.G. (2001).** Does leptin stimulate nitric oxide to oppose the effects of sympathetic activation? *Hypertension* 38:1081-6.
- Mohamed A.A., Gotoh O., Graham D.I., Osborne K.A., McCulloch J., Mendelow A.D., Teasdale G.M. & Harper A.M. (1985).** Effect of pretreatment with the calcium antagonist nimodipine on local cerebral blood flow and histopathology after middle cerebral artery occlusion. *Ann. Neurol.* 18:705-711.
- Morioka T., Kalehua A.N. & Streit W.J. (1993).** Characterization of microglial reaction after middle cerebral artery occlusion in rat brain. *J. Comp. Neurol.* 327:123-32.
- Mulcahy N., Ross J., Rothwell N.J. & Loddick S.A. (2003).** Delayed administration of interleukin-1 receptor antagonist protects against transient cerebral ischemia in the rat. *Br. J. Pharmacol.* 140:471-476.

- Munzberg H., Huo L., Nilni E.A., Hollenberg A.N. & Bjørbaek C. (2003).** Role of signal transducer and activator of transcription 3 in regulation of hypothalamic proopiomelanocortin gene expression by leptin. *Endocrinology* 144:2121-31.
- Münzberg H. & Myers Jr M.G. (2005).** Molecular and anatomical determinants of central leptin resistance. *Nat. Neurosci.* 5:566-570.
- Murakami Y., Saito K., Hara A., Zhu Y., Sudo K., Niwa M., Fujii H., Wada H., Ishiguro H., Mori H. & Seishima M. (2005).** Increases in tumor necrosis factor-alpha following transient global cerebral ischemia do not contribute to neuron death in mouse hippocampus. *J. Neurochem.* 93:1616-22.
- Murata S., Usuda N., Okano A., Kobayashi S. & Suzuki T. (2000).** Occurrence of a transcription factor, signal transducer and activators of transcription 3 (Stat3), in the postsynaptic density of the rat brain. *Brain Res. Mol. Brain Res.*78:80-90.
- Mutze J., Roth J., Gerstberger M., Matsumura K. & Hubschle T. (2006).** Immunohistochemical evidence of functional leptin receptor expression in neuronal and endothelial cells of the rat brain. *Neurosci. Lett.* 394:105-110.
- Nagasawa H. & Kogure K. (1989).** Correlation between cerebral blood flow and histologic changes in a new rat model of middle cerebral artery occlusion. *Stroke* 20:1037-43.
- Nakatani K., Sakaue H., Thompson D.A., Weigel R.J. and Roth R.A. (1999).** Identification of a human Akt3 (protein kinase B gamma) which contains the regulatory serine phosphorylation site. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 257:906-10.
- Nathaniel E.J. & Nathaniel D.R. (1981).** The reactive astrocyte. *Adv. Cell. Neurobiol.* 2:249-301.

- Nawashiro H., Brenner M., Fukui S., Shima K. & Hallenbeck J.M. (2000).** High susceptibility to cerebral ischemia in GFAP-null mice. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 20:1040-1044.
- Nawashiro H., Huang S., Brenner M., Shima K. & Hallenbeck J.M. (2002).** ICP monitoring following bilateral carotid occlusion in GFAP-null mice. *Acta Neurochir. Suppl.* 81:269-270.
- Nedergaard M., Ransom B. & Goldman S.A. (2003).** New roles for astrocytes: redefining the functional architecture of the brain. *Trends Neurosci.* 26:523-530.
- Nedergaard M. & Dirnagl U. (2005).** Role of glial cells in cerebral ischemia. *Glia* 50:281-286.
- Neumann J., Gunzer M., Gutzeit H.O., Ullrich O., Reymann K.G. & Dinkel K. (2006).** Microglia provide neuroprotection after ischemia. *FASEB J.* 20:714-716.
- Nilupul Perera M., Ma H.K., Arakawa S., Howells D.W., Markus R., Rowe C.C. & Donnan G.A. (2006).** Inflammation following stroke. *J. Clin. Neurosci.* 13:1-8.
- Niswender K.D., Baskin D.G. & Schwartz M.W. (2004).** Insulin and its evolving partnership with leptin in the hypothalamic control of energy homeostasis. *Trends Endocrin. Met.* 15:362-369.
- Niswender K.D., Morrison C.D., Clegg D.J., Olson R., Baskin D.G., Myers M.G., Seeley R.J. & Schwartz M.W. (2003).** Insulin activation of phosphatidylinositol 3-kinase in the hypothalamic arcuate nucleus - A key mediator of insulin-induced anorexia. *Diabetes* 52:227-231.
- Noshita N., Lewen A., Sukuwara T. & Chan P.H. (2001).** Evidence of phosphorylation of Akt and neuronal survival after transient focal cerebral ischemia in mice. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 21:1442-1450.

- Nowicka D., Rogozinska K., Aleksy M., Witte O.W. & Skangiel-Kramska J. (2008).** Spatiotemporal dynamics of astroglial and microglial responses after photothrombotic stroke in the rat brain. *Acta. Neurobiol. Exp.* 68:155-168.
- Obara M., Szeliga M. & Albrecht J. (2008).** Regulation of pH in the mammalian central nervous system under normal and pathological conditions: facts and hypotheses. *Neurochem. Int.* 52:905-919.
- Oberheim N.A., Takano T., Han X., He W., Lin J.H., Wang F., Xu Q., Wyatt J.D., Pilcher W., Ojemann J.G., Ransom B.R., Goldman S.A. & Nedergaard M. (2009).** Uniquely hominid features of adult human astrocytes. *J. Neurosci.* 29:3276-3287.
- Odriezola L., Singh G., Hoang T. & Chan A.M. (2007).** Regulation of PTEN activity by its carboxyl-terminal autoinhibitory domain. *J. Biol. Chem.* 282:23306-15.
- Offner H., Subramanian S., Parker S.M., Afentoulis M.E., Vandenbark A.A. & Hurn P.D. (2006).** Experimental stroke induces massive, rapid activation of the peripheral immune system. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 26:654-665.
- Okada S., Nakamura M., Katoh H., Miyao T., Shimazaki T., Ishii K., Yamane J., Yoshimura A., Iwamoto Y., Toyama Y. & Okano H. (2006).** Conditional ablation of Stat3 or Socs3 discloses a dual role for reactive astrocytes after spinal cord injury. *Nat. Med.* 12:829-834.
- Oomura Y., Hori N., Shiraishi T., Fukunaga K., Takeda H., Tsuji M., Matsurihiya T., Ishibashi M., Aou S., Li X.L., Kohno D., Uramura K., Sougawa H., Yada T., Wayner M.J. & Sasaki K. (2006).** Leptin facilitates learning and memory performance and enhances hippocampal CA1 long-term potentiation and CaMK II phosphorylation in rats. *Peptides* 27:2738-2749.
- O'Rourke L. & Shepherd P.R. (2002).** Biphasic regulation of extracellular-signal-regulated protein kinase by leptin in macrophages: role in regulating STAT3 Ser727 phosphorylation and DNA binding. *Biochem J.* 364:875-879.

- Osbourne R.C. & Halsey J.H. Jr. (1975).** Cerebral blood flow. A predictor of recovery from ischemia in the gerbil. *Arch. Neurol.* 32:457-461.
- Pang L., Ye W., Che X.M., Roessler B.J., Betz A.L. & Yang G.Y. (2001).** Reduction of inflammatory response in the mouse brain with adenoviral-mediated transforming growth factor- β 1 expression. *Stroke* 32:544-552.
- Pantoni L., Sarti C. & Inzitari D. (1998).** Cytokines and cell adhesion molecules in cerebral ischemia: experimental bases and therapeutic perspectives. *Arterioscler. Thromb Vasc. Biol.* 18:503-513.
- Pap M. & Cooper G.M. (2002).** Role of translation initiation factor 2B in control of cell survival by the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt/glycogen synthase kinase 3- β signaling pathway. *Mol. Cell Biol.* 22:578-86.
- Pelleymounter M.A., Cullen M.J., Baker M.B., Hecht R., Winters D., Boone T. & Collins F. (1995).** Effects of the Obese Gene-Product on Body-Weight Regulation in Ob/Ob. Mice. *Science* 269:540-543.
- Panickar K.S. & Norenberg M.D. (2005).** Astrocytes in cerebral ischemic injury: morphological and general consideration. *Glia* 50:287-298.
- Petito C.K., Morgello S., Felix J.C. & Lesser M.L. (1990).** The two patterns of reactive astrocytosis in postischemic rat brain. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 10:850-859.
- Pettigrew L.C., Kindy M.S., Scheff S., Springer J.E., Kryscio R.J., Li Y. & Grass D.S. (2008).** Focal cerebral ischemia in the TNF α -transgenic rat. *J Neuroinflammation* 5:47.
- Petty M.A. & Lo EH. (2002).** Junctional complexes of the blood-brain barrier: permeability changes in neuroinflammation. *Prog. Neurobiol.* 68:311-323.
- Pfützner E., Jähne R., Wissler M., Stoecklin E. & Groner B. (1998).** p300/CREB-binding protein enhances the prolactin-mediated transcriptional induction through direct interaction with the transactivation domain of Stat5, but does not participate in the

Stat5-mediated suppression of the glucocorticoid response. *Mol. Endocrinol.* 12:1582-93.

Pinteaux E., Inoue W., Schmidt L., Molina-Holgado F., Rothwell N.J. & Luheshi G.N. (2007). Leptin induces interleukin-1beta release from rat microglial cells through a caspase 1 independent mechanism. *J. Neurochem.* 102:826-33.

Planas A.M., Berruezo M., Justicia C., Barron S. & Ferrer I. (1997). Stat3 is present in the developing and adult rat cerebellum and participates in the formation of transcription complexes binding DNA at the sisinducible element. *J. Neurochem.* 68:1345-1351.

Planas A.M., Soriano M.A., Berruezo M., Justicia C., Estradal A., Pitarch S. & Ferrer I. (1996). Induction of Stat3, a signal trasducer and transcription factor, in reactive microglia following transient focal cerebral ischemia. *Eur. J. Neurosci.* 8:2612-8.

Porter J.T. & McCarthy K.D. (1997). Astrocytic neurotransmitter receptors in situ and in vivo. *Prog. Neurobiol.* 51:439-455.

Pradillo J.M., Romera C., Hurtado O., Cárdenas A., Moro M.A., Leza J.C., Dávalos A., Castillo J., Lorenzo P. & Lizasoain I. (2005). TNFR1 upregulation mediates tolerance after brain ischemic preconditioning. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 25:193-203.

Pulsinelli W.A. & Brierley J.B. (1979). A new model of bilateral hemispheric ischemia in the unanesthetized rat. *Stroke* 10:267-272.

Pulsinelli W.A. & Buchan A.M. (1988). The four-vessel occlusion rat model: method for complete occlusion of vertebral arteries and control of collateral circulation. *Stroke* 19:913-4.

Purdham D.M., Zou M.X., Rajapurohitam V. & Karmazyn M. (2004). Rat heart is a site of leptin production and action. *Am. J. Physiol-Heart C* 287:H2877-H2884.

- Raghavendra Rao V.L., Bowen K.K., Dhodda V.K., Song G., Franklin J.L., Gavva N.R. & Dempsey R.J. (2002).** Gene expression analysis of spontaneously hypertensive rat cerebral cortex following transient focal cerebral ischemia. *J. Neurochem.* 83:1072-86.
- Rajan P. & McKay RD. (1998).** Multiple routes to astrocytic differentiation in the CNS. *J. Neurosci.* 18:3620-3629.
- Rameh L.E. & Cantley L.C. (1999).** The role of phosphoinositide 3-kinase lipid products in cell function. *J. Biol. Chem.* 274:8347-50.
- Ridet J.L., Malhotra S.K., Privat A. & Gage F.H. (1997).** Reactive astrocytes: cellular and molecular cues to biological function. *Trends Neurosci.* 20:570-577.
- Rabuffetti M., Sciorati C., Tarozzo G., Clementi E., Manfredi A.A. & Beltramo M. (2000).** Inhibition of caspase-1-like activity by Ac-Tyr-Val-Ala-Asp-chloromethyl ketone induces long-lasting neuroprotection in cerebral ischemia through apoptosis reduction and decrease of proinflammatory cytokines. *J. Neurosci.* 20:4398-404.
- Robertson S.A., Leininger G.M. and Myers M.G Jr. (2008).** Molecular and neural mediators of leptin action. *Physiol. Behav.* 94:637-42.
- Roche K. W., Tu J. C., Petralia R. S., Xiao B., Wenthold R. J. & Worley P. F. (1999).** Homer 1b regulates the trafficking of group I metabotropic glutamate receptors. *J. Biol. Chem.* 274:25953-25957.
- Roger V. L., Turner M. B., Wylie-Rosett J., Sorlie V, Stafford R. S., Turan T. N., Berry M. B., Brown T. M., Carnethon M. R., Dai S., de Simone G., Ford E. S., S. Fox C., Fullerton H. J., Gillespie C., Greenlund K. J., Hailpern S. M, Heit J. A., Ho P. M., Howard V. J., Kissela B.M., Kittner S.J., Lackland D. T., Lichtman J. H., Lisabeth L. D., Makuc D. M., Marcus G. M., Marelli A., Matchar D. B., McDermott M. M., Meigs J. B., Moy C. S., Mozaffarian D., Mussolino M. E., Nichol G., Paynter N.P., Rosamond W. D., Sorlie P. D., Stafford R. S., Turan T. N., Turner M.B., Wong N. D. & Wylie-Rosett J.**

(2011). On behalf of the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee, Roger V. L., Turner M. B. and On behalf of the American Heart Association Heart Disease and Stroke Statistics Writing Group Heart Association Heart Disease and Stroke Statistics_2011 Update: A Report From the American. *Circulation* 123:e18-e209.

Romanic A.M., White R.F., Arleth A.J., Ohlstein E.H. & Barone F.C. (1998). Matrix metalloproteinase expression increases after cerebral focal ischemia in rats: inhibition of matrix metalloproteinase-9 reduces infarct size. *Stroke* 29:1020-30.

Rosenberg G.A., Estrada E.Y. & Dencoff J.E. (1998). Matrix metalloproteinases and TIMPs are associated with blood-brain barrier opening after reperfusion in rat brain. *Stroke* 29:2189-2195.

Rosenberg P.A. & Aizenman E. (1989). Hundred-fold increase in neuronal vulnerability to glutamate toxicity in astrocyte-poor cultures of rat cerebral cortex. *Neurosci Lett.* 103:162-168.

Rossi D.J., Oshima T. & Attwell D. (2000). Glutamate release in severe brain ischaemia is mainly by reversed uptake. *Nature* 403:316-21.

Rothstein J.D., Jin L., Dykes-Hoberg M. & Kuncl R.W. (1993). Chronic inhibition of glutamate uptake produces a model of slow neurotoxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 90:6591-95.

Rothwell N.J. & Luheshi G.N. (2000). Interleukin 1 in the brain: biology, pathology and therapeutic target. *Trends Neurosci.* 23:618-625.

Rouach N., Koulakoff A. & Giaume C. (2004). Neurons set the tone of gap junctional communication in astrocytic networks. *Neurochem. Int.* 45:265-272.

Russo V.C., Metaxas S., Kobayashi K., Harris M. & Werther G.A. (2004). Antiapoptotic effects of leptin in human neuroblastoma cells. *Endocrinology* 145:4103-12.

- Safar P., Stezoski W. & Nemoto E.M. (1976).** Amelioration of brain damage after 12 minutes' cardiac arrest in dogs. *Arch. Neurol* 33:91-95.
- Sala C., Futai K., Yamamoto K., Worley P.F., Hayashi Y. & Sheng M. (2003).** Inhibition of dendritic spine morphogenesis and synaptic transmission by activity-inducible protein homer-1a. *J. Neurosci.* 23:6327-6337.
- Sala C., Valentin P., Wilson N. R., Passafaro M., Liu G. & Sheng M. (2001).** Regulation of dendritic spine morphology and synaptic function by Shank and Homer. *Neuron* 31:115-130.
- Satriotomo I., Bowen K.K. & Vemuganti R. (2006).** JAK2 and STAT3 activation contributes to neuronal damage following transient focal cerebral ischemia. *J. Neurochem.* 98:353-368.
- Schielke G.P., Yang G.Y., Shivers B.D. & Lorrin Betz A. (1998).** Reduced ischemic brain injury in interleukin-1b converting enzyme-deficient mice. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 18:180-185.
- Schindler C.W. (2002).** Series introduction. JAK-STAT signaling in human disease. *J Clin. Invest.* 109:1133-7.
- Schmid-Elsaesser R., Zausinger S., Hungerhuber E., Baethmann A. & Reulen H.J. (1989).** A critical reevaluation of the intraluminal thread model of focal cerebral ischemia: evidence of inadvertent premature reperfusion and subarachnoid hemorrhage in rats by laser-Doppler flowmetry. *Stroke* 29:2162-70.
- Schmidt-Kastner R., Szymas J. & Hossmann K.A. (1990).** Immunohistochemical study of glial reaction and serum-protein extravasation in relation to neuronal damage in rat hippocampus after ischemia. *Neuroscience* 38:527-540.
- Schock S.C., Munyao N., Yakubchik Y., Sabourin L.A., Hakim A.M., Ventureyra E.C. & Thompson C.S. (2007).** Cortical spreading depression releases ATP into the

extracellular space and purinergic receptor activation contributes to the induction of ischemic tolerance. *Brain Res.* 1168:129-138.

Schubert P., Morino T., Miyazaki H., Ogata T., Nakamura Y., Marchini C. & Ferroni S. (2000). Cascading glia reactions: a common pathomechanism and its differentiated control by cyclic nucleotide signaling. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 903:24-33.

Selkirk J.V., Nottebaum L.M., Vana A.M., Verge G.M., Mackay K.B., Stiefel T.H., Naeve G.S., Pomeroy J.E., Petroski R.E., Moyer J., Dunlop J. & Foster A.C. (2005). Role of the GLT-1 subtype of glutamate transporter in glutamate homeostasis: the GLT-1-preferring inhibitor WAY-855 produces marginal neurotoxicity in the rat hippocampus. *Eur. J. Neurosci.* 21:3217-3228.

Shanley L.J., Irving A.J. & Harvey J. (2001). Leptin enhances NMDA receptor function and modulates hippocampal synaptic plasticity. *J Neurosci.* 21:RC186.

Sharp F.R., Lu A., Tang Y. & Millhorn D.E. (2000). Multiple molecular penumbras after focal cerebral ischemia. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 20:1011-1032.

Shi G.D., OuYang Y.P., Shi J.G., Liu Y., Yuan W. & Jia L.S. (2001). PTEN deletion prevents ischemic brain injury by activating the mTOR signaling pathway. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 404:941-5.

Shibata M., Yamawaki T., Sasaki T., Hattori H., Hamada J., Fukuuchi Y., Okano H. & Miura M. (2002). Upregulation of Akt phosphorylation at the early stage of middle cerebral artery occlusion in mice. *Brain Res.* 942:1-10.

Shieh P.B., Hu S.C., Bobb K., Timmusk T. & Ghosh A. (1998). Identification of a signaling pathway involved in calcium regulation of BDNF expression. *Neuron* 20:727-40.

Si Y.L., Zhang J.Y. & Yan G.T. (2009). Protective effect of leptin against cerebral ischemia/reperfusion injury in mice. *Nan. Fang Yi Ke Da Zue Xue Bao* 29:598-601.

- Siemkowicz E. & Gjedde A. (1980).** Post-ischemic coma in rat: Effect of different pre-ischemic blood glucose levels on cerebral metabolic recovery after ischemia. *Acta. Physiol. Scand.* 110:225-232
- Sierra-Honigmann M.R., Nath A.K., Murakami C., García-Cardena G., Papapetropoulos A., Sessa W.C., Madge L.A., Schechner J.S., Schwabb M.B., Polverini P.J. & Flores-Riveros J.R. (1998).** Biological action of leptin as an angiogenic factor. *Science* 28:1683-6.
- Sierra-Johnson J., Romero-Corral A., Lopez-Jimenez F., Gami A.S., Sert Kuniyoshi F.H., Wolk R. & Somers V.K. (2007).** Relation of increased leptin concentrations to history of myocardial infarction and stroke in the United States population. *Am. J. Cardiol.* 100:234-9.
- Signore A.P., Zhang F., Weng Z., Gao Y. & Chen J. (2008).** Leptin neuroprotection in the CNS: mechanisms and therapeutic potentials. *J. Neurochem.* 106:1977-90.
- Silver I.A. & Erecińska M. (1992).** Ion homeostasis in rat brain in vivo: intra- and extracellular $[Ca^{2+}]$ and $[H^{+}]$ in the hippocampus during recovery from short-term, transient ischemia. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 12:759-72.
- Söderberg S., Stegmayr B., Stenlund H., Sjöström L.G., Agren A., Johansson L., Weinehall L. & Olsson T. (2004).** Leptin, but not adiponectin, predicts stroke in males. *J. Intern. Med.* 256:128-36.
- Sofroniew M.V. (2005).** Reactive astrocytes in neural repair and protection. *Neuroscientist.* 11:400-407.
- Sokoloff L. (1999).** Energetics of functional activation in neural tissues. *Neurochem. Res.* 24:321-329.
- Solaroglu I., Tsubokawa T., Cahill J. & Zhang J.H. (2006).** Anti-apoptotic effect of granulocyte-colony stimulating factor after focal cerebral ischemia in the rat. *Neuroscience* 143:965-974.

- Soler-Lopez M., Petosa C., Fukuzawa M., Ravelli R., Williams J.G. & Müller C.W. (2004).** Structure of an activated Dictyostelium STAT in its DNA-unbound form. *Mol. Cell.* 13:791-804.
- Somera-Molina K.C., Nair S., Van Eldik L.J., Watterson D.M. & Wainwright M.S. V. (2009).** Enhanced microglial activation and proinflammatory cytokine upregulation are linked to increased susceptibility to seizures and neurologic injury in a 'two-hit' seizure model. *Brain Res.* 1282:162-172.
- Soriano S.G., Coxon A., Wang Y.F., Frosch M.P., Lipton S.A., Hickey P.R. & Mayadas T.N. (1999).** Mice deficient in Mac-1 (CD11b/CD18) are less susceptible to cerebral ischemia/reperfusion injury. *Stroke* 30:134-139.
- Stahl N., Farruggella T.J., Boulton T.G., Zhong Z., Darnell J.E. Jr. & Yancopoulos G.D. (1995).** Choice of STATs and other substrates specified by modular tyrosine-based motifs in cytokine receptors. *Science* 267:1349-53.
- Starr R. & Hilton D.J. (2003).** Defining control: regulation of dendritic cell activation and immune homeostasis by SOCS1. *Immunity* 19:308-316.
- Stephanou A., Brar B.K., Knight R.A. & Latchman D.S. (2000).** Opposing actions of STAT-1 and STAT-3 on the Bcl-2 and Bcl-x promoters. *Cell Death Differ.* 7:329-30.
- Stephens L., Anderson K., Stokoe D., Erdjument-Bromage H., Painter G.F., Holmes A.B., Gaffney P.R., Reese C.B., McCormick F., Tempst P., Coadwell J. & Hawkins P.T. (1998).** Protein kinase B kinases that mediate phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate-dependent activation of protein kinase B. *Science* 279:710-4.
- Stoll G., Schroeter M., Jander S., Siebert H., Wollrath A., Kleinschnitz C. & Bruck W. (2004).** Lesion-associated expression of transforming growth factor-beta-2 in the rat nervous system: evidence for down-regulating the phagocytic activity of microglia and macrophages. *Brain Pathol.* 14:51-58.

- Stromberg H., Svensson S.P. & Hermanson O. (2000).** Distribution of the transcription factor signal transducer and activator of transcription 3 in the rat central nervous system and dorsal root ganglia. *Brain Res.* 853:105-114.
- Sughrue M.E., Mehra A., Connolly E.S. Jr. & D'Ambrosio A.L. (2004).** Anti-adhesion molecule strategies as potential neuroprotective agents in cerebral ischemia: a critical review of the literature. *Inflamm Res.* 53:497-508.
- Sun G.Y., Zhang J.P., Lin T.A., Lin T.N., He Y.Y. & Hsu C.Y. (1995).** Inositol trisphosphate, polyphosphoinositide turnover, and high-energy metabolites in focal cerebral ischemia and reperfusion. *Stroke* 26:1893-900.
- Suzuki K., Nakajima H., Ikeda K., Tamachi T., Hiwasa T., Saito Y. & Iwamoto I. (2003).** Stat6-protease but not Stat5-protease is inhibited by an elastase inhibitor ONO-5046. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 309:768-73.
- Suzuki S., Tanaka K., Nogawa S., Dembo T., Kosakai A. & Fukuuchi Y. (2001).** Phosphorylation of signal transducer and activator of transcription-3 (Stat3) after focal cerebral ischemia in rats. *Exp. Neurol.* 170:63-71.
- Swanson R.A., Morton M.M., Sagar S.M. & Sharp F.R. (1992).** Sensory stimulation induces local cerebral glycogenolysis: demonstration by autoradiography. *Neuroscience* 51:451-461.
- Sweeney G., Keen J., Somwar R., Konrad D., Garg R. & Klip A. (2001).** High leptin levels acutely inhibit insulin-stimulated glucose uptake without affecting glucose transporter 4 translocation in l6 rat skeletal muscle cells. *Endocrinology* 142:4806-12.
- Symon L., Crockard H.A., Dorsch N.W., Branston N.M. & Juhasz J. (1975).** Local cerebral blood flow and vascular reactivity in a chronic stable stroke in baboons. *Stroke* 6:482-492.

- Szanto I. & Kahn C.R. (2000).** Selective interaction between leptin and insulin signaling pathways in a hepatic cell line. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 97:2355-60.
- Takagi K., Zhao W., Busto R. & Ginsberg M.D. (1995).** Local hemodynamic changes during transient middle cerebral artery occlusion and recirculation in the rat: A [14C]iodoantipyrine autoradiographic study. *Brain Res.* 691:160-168.
- Takanaga H., Yoshitake T., Hara S., Yamasaki C. & Kunimoto M. (2004).** cAMP-induced astrocytic differentiation of C6 glioma cells is mediated by autocrine interleukin-6. *J. Biol. Chem.* 279:15441-15447
- Takeda K., Noguchi K., Shi W., Tanaka T., Matsumoto M., Yoshida N., Kishimoto T. & Akira S. (1997).** Targeted disruption of the mouse Stat3 gene leads to early embryonic lethality. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:3801-3804.
- Takizawa T., Yanagisawa M., Ochiai W., Yasukawa K., Ishiguro T., Nakashima K. & Taga T. (2001).** Directly linked soluble IL-6 receptor-IL-6 fusion protein induces astrocyte differentiation from neuroepithelial cells via activation of STAT3. *Cytokine* 13:272-279.
- Tamura A., Graham D.I., McCulloch J. & Teasdale G.M. (1981).** Focal cerebral ischaemia in the rat: Description of technique and early neuropathological consequences following middle cerebral artery occlusion. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 1:53-60.
- Tanaka T., Soriano M.A. & Grusby M.J. (2005).** SLIM is a nuclear ubiquitin E3 ligase that negatively regulates STAT signaling. *Immunity.* 22:729-36.
- Tao X., Finkbeiner S., Arnold D.B., Shaywitz A.J. & Greenberg M.E. (1998).** Ca²⁺ influx regulates BDNF transcription by a CREB family transcription factor-dependent mechanism. *Neuron* 20:709-26.

- Tappe A., Klugmann M., Luo C., Hirlinger D., Agarwal N., Benrath J., Ehrenbruber M.U., During M.J. & Kuner R. (2006).** Synaptic scaffolding protein homer-1a protects against chronic inflammatory pain. *Nature Med.* 12:677-681.
- Tartaglia L.A. (1997).** The leptin receptor. *J. Biol. Chem.* 272:6093-6.
- Tartaglia L.A., Dembski M., Weng X., Deng N.H., Culpepper J., Devos R., Richards G.J., Campfield L.A., Clark F.T., Deeds J., Muir C., Sanker S., Moriarty A., Moore K.J., Smutko J.S., Mays G.G., Woolf E.A., Monroe C.A. & Tepper R.I. (1995).** Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R. *Cell* 83:1263-1271.
- Terao S., Yilmaz G., Stokes K.Y., Ishikawa M., Kawase T. & Granger D.N. (2008).** Inflammatory and injury responses to ischemic stroke in obese mice. *Stroke* 39:943-50.
- Toker A. & Newton A.C. (2000).** Cellular signaling: pivoting around PDK-1. *Cell* 103:185-8.
- Thornberry N.A., Bull H.G., Calaycay J.R., Chapman K.T., Howard A.D., Kostura M.J., Miller D.K., Molineaux S.M., Weidner J.R., Aunins J., et al. (1992)** A novel heterodimeric cysteine protease is required for interleukin-1 beta processing in monocytes. *Nature* 356:768-74.
- Tsuda K. (2009).** Neuroprotective effects of leptin and nitric oxide against cerebral ischemia. *Stroke* 40, e406.
- Tu H., Kastin A.J., Hsueh H. & Pan W.H. (2008).** Soluble receptor inhibits leptin transport. *J. Cell Physiol.* 14:301-305.
- Tu J.C., Xiao B., Yuan J. P., Lanahan A. A., Leoffert K., Li M., Linden D. J. & Worley P. F. (1998).** Homer binds a novel proline-rich motif and links group 1 metabotropic glutamate receptor with IP3 receptors. *Neuron* 21:717-26.

- Türeyen K., Vemuganti R., Sailor K.A. & Dempsey R.J. (2004).** Infarct volume quantification in mouse focal cerebral ischemia: a comparison of triphenyltetrazolium chloride and cresyl violet staining techniques. *J. Neurosci. Methods* 203-7.
- Tyson G.W., Teasdale G.M., Graham D.I. & McCulloch J. (1984).** Focal cerebral ischemia in the rat: Topography of hemodynamic and histopathological changes. *Ann. Neurol.* 15:559-567.
- Udagawa J. & Otani H. (2007).** The role of leptin in fetal brain development. *Early Hum Dev.* 83:S45-S45.
- Uemura A., Takizawa T., Ochiai W., Yanagisawa M., Nakashima K. & Taga T. (2002).** Cardiotrophin-like cytokine induces astrocyte differentiation of fetal neuroepithelial cells via activation of STAT3. *Cytokine* 18:1-7.
- Vaisse C., Halaas J.L., Horvath C.M., Darnell J.E. Jr, Stoffel M. & Friedman J.M. (1996).** Leptin activation of Stat3 in the hypothalamus of wild-type and ob/ob mice but not db/db mice. *Nat. Genet.* 14:95-7.
- Valerio A., Dossena M., Bertolotti P., Boroni F., Sarnico I., Faraco G., Chiarugi A., Frontini A., Giordano A., Liou H.C., De Simoni M.G., Spano P.F., Carruba M.O., Pizzi M. & Nisoli E. (2009).** Leptin is induced in the ischemic cerebral cortex and exerts neuroprotection through NFkappaB/c-Rel-dependent transcription. *Stroke* 40:610-17.
- Van Wagoner N.J. & Benveniste E.N. (1999).** Interleukin-6 expression and regulation in astrocytes. *J. Neuroimmunol.* 100:124-39.
- Verkhatsky A. & Steinhauser C. (2000).** Ion channels in glial cells. *Brain Res. Rev.* 32:380-412.
- Vilchez D., Ros S., Cifuentes D., Pujadas L., Vallès J., García-Fojeda B., Criado-García O., Fernández-Sánchez E., Medraño-Fernández I., Domínguez J., García-**

- Rocha M., Soriano E., Rodríguez de Córdoba S. & Guinovart J.J. (2007).** Mechanism suppressing glycogen synthesis in neurons and its demise in progressive myoclonus epilepsy. *Nat. Neurosci.* 10:1407-1413.
- Vitkovic L., Maeda S. & Sternberg E. (2001).** Anti-inflammatory cytokines: expression and action in the brain. *Neuroimmunomodulation* 9:295-312.
- Wallace A.M., McMahon A.D., Packard C.J., Kelly A., Shepherd J., Gaw A. & Sattar N. (2001).** Plasma leptin and the risk of cardiovascular disease in the west of Scotland coronary prevention study (WOSCOPS). *Circulation* 104:3052-6.
- Walz W. (2000).** Role of astrocytes in the clearance of excess extracellular potassium. *Neurochem. Int.* 36:291-300.
- Wang C., Nguyen H.N., Maguire J.L. & Perry D.C. (2002).** Role of intracellular calcium stores in cell death from oxygen-glucose deprivation in a neuronal cell line. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 22:206-14.
- Wang J.L., Liu R., Hawkins M., Barzilai N. & Rossetti L. (1998).** A nutrient-sensing pathway regulates leptin gene expression in muscle and fat. *Nature* 393:684-688.
- Wang Q., Tang X.N. & Yenari MA. (2007).** The inflammatory response in stroke. *J Neuroimmunol.* 184:53-68.
- Wang X., Lou N., Xu Q., Tian G.F., Peng W.G., Han X., Kang J., Takano T. & Nedergaard M. (2006).** Astrocytic Ca²⁺ signaling evoked by sensory stimulation in vivo. *Nat. Neurosci.* 9:816-823.
- Wen T.C., Peng H., Hata R., Desaki J. and Sakanaka M. (2001).** Induction of phosphorylated- STAT3 following focal cerebral ischemia in mice. *Neurosci. Lett.* 303:153-156.
- Weng Z., Signore A.P., Gao Y., Wang S., Zhang F., Hastings T., Yin X.M. & Chen J. (2007).** Leptin protects against 6-hydroxydopamine-induced dopaminergic cell

death via mitogen-activated protein kinase signaling. *J. Biol. Chem.* 282: 34479-34491.

Weston R.M., Jones N.M., Jarrott B. & Callaway J.K. (2007). Inflammatory cell infiltration after endothelin-1-induced cerebral ischemia: histochemical and myeloperoxidase correlation with temporal changes in brain injury. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 27:100-114.

Wetzel M., Rosenberg G.A. & Cunningham L.A. (2003). Tissue inhibitor of metalloproteinase-3 and matrix metalloproteinase-3 regulate neuronal sensitivity to doxorubicin-induced apoptosis. *Eur. J. Neurosci.* 18:1050-1060.

White B.C., Sullivan J.M., De Garcia D.J., O'Neil B.J., Neumar R.W., Grossman L.I., Rafols J.A. & Krause G.S. (2000). Brain ischemia and reperfusion: molecular mechanisms of neuronal injury. *J. Neurol. Sci.* 179:1-33.

Wilhelmsson U., Bushong E.A., Price D.L., Smarr B.L., Phung V., Terada M., Ellisman M.H. & Pekny M. (2006). Redefining the concept of reactive astrocytes as cells that remain within their unique domains upon reaction to injury *PNAS* 103:17513-17518.

Wilson D.M. & Bianchi C. (1999). Improved immunodetection of nuclear antigens after sodium dodecyl sulfate treatment of formaldehyde-fixed cells. *J. Histochem. Cytochem.* 47:1095-100.

Wilson JX. (1997). Antioxidant defense of the brain: a role for astrocytes. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 75:1149-1163.

Winter Y., Rohrmann S., Linseisen J., Lanczik O., Ringleb P.A., Hebebrand J. & Back T. (2008). Contribution of obesity and abdominal fat mass to risk of stroke and transient ischemic attacks. *Stroke* 39:3145-51.

- Winters B., Mo Z., Brooks-Asplund E., Kim S., Shoukas A., Li D., Nyhan D. & Berkowitz D.E. (2000).** Reduction of obesity, as induced by leptin, reverses endothelial dysfunction in obese (Lep(ob)) mice. *J. Appl. Physiol.* 89:2382-90.
- Wolk R., Berger P., Lennon R.J., Brilakis E.S., Johnson B.D. & Somers V.K. (2004).** Plasma leptin and prognosis in patients with established coronary atherosclerosis. *J. Am. Coll. Cardiol.* 44:1819-24.
- Woods S.C, Lotter E.C, McKay L.D. & Porte D. (1979).** Chronic intracerebroventricular infusion of insulin reduces food intake and body weight of baboons. *Nature* 282:503-505.
- Xuan Y.T., Guo Y., Han H., Zhu Y. & Bolli R. (2001).** An essential role of the JAK-STAT pathway in ischemic preconditioning. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98:9050-9055.
- Yamashita T., Sawamoto K., Suzuki S., Suzuki N., Adachi K., Kawase T., Mihara M., Ohsugi Y., Abe K. & Okano H. (2005).** Blockade of interleukin-6 signaling aggravates ischemic cerebral damage in mice: possible involvement of Stat3 activation in the protection of neurons. *J. Neurochem.* 94:459-68.
- Yanagisawa M., Nakashima K. & Taga T. (1999).** STAT3-mediated astrocyte differentiation from mouse fetal neuroepithelial cells by mouse oncostatin M. *Neurosci. Lett.* 269:169-172.
- Yang G., Chan P.H., Chen J., Carlson E., Chen S.F., Weinstein P., Epstein C.J. & Kamii H. (1994).** Human copper-zinc superoxide dismutase transgenic mice are highly resistant to reperfusion injury after focal cerebral ischemia. *Stroke* 25:165-170.
- Yang G.Y., Gong C., Qin Z., Ye W., Mao Y. & Bertz A.L. (1998).** Inhibition of TNF α attenuates infarct volume and ICAM-1 expression in ischemic mouse brain. *Neuroreport* 9:2131-2134.

- Yang G.Y., Zhao Y.J., Davidson B.L. & Betz A.L. (1997).** Overexpression of interleukin-1 receptor antagonist in the mouse brain reduces ischemic brain injury. *Brain Res.* 751:181-8.
- Yang Y., Candelario-Jalil E., Thompson J.F., Cuadrado E., Estrada E.Y., Rosell A., Montaner J. & Rosenberg G.A. (2010).** Increased intranuclear matrix metalloproteinase activity in neurons interferes with oxidative DNA repair in focal cerebral ischemia. *J. Neurochem.* 112:134-49.
- Yong V.W. (2005).** Metalloproteinases: mediators of pathology and regeneration in the CNS. *Nat .Rev. Neurosci.* 6:931-944.
- Zha J., Harada H., Yang E., Jockel J. & Korsmeyer S.J. (1996).** Serine phosphorylation of death agonist BAD in response to survival factor results in binding to 14-3-3 not BCL-X(L). *Cell* 87:619-28.
- Zhang F. & Chen J. (2008).** Leptin protects hippocampal CA1 neurons against ischemic injury. *J. Neurochem.* 107:578-87.
- Zhang F., Wang S., Signore A.P. & Chen J. (2007).** Neuroprotective effects of leptin against ischemic injury induced by oxygen-glucose deprivation and transient cerebral ischemia. *Stroke* 38:2329-36.
- Zhang J.J., Zhao Y., Chait B.T., Lathem W.W., Ritzi M., Knippers R. & Darnell J.E. Jr. (1998).** Ser727-dependent recruitment of MCM5 by Stat1alpha in IFN-gamma-induced transcriptional activation. *EMBO J.* 17:6963-71.
- Zhang Z., Chopp M. & Powers C. (1997).** Temporal profile of microglial response following transient (2 h) middle cerebral artery occlusion. *Brain Res.* 744:189-198.
- Zhang Z. & Yenari M.A. (2004).** Post-ischemic inflammation: molecular mechanisms and therapeutic implications. *Neurol. Res.* 26:884-92.
- Zhao A.Z., Shinohara M.M., Huang D., Shimizu M., Eldar-Finkelman H., Krebs E.G., Beavo J.A. & Bornfeldt K.E. (2000).** Leptin induces insulin-like signaling that

antagonizes cAMP elevation by glucagon in hepatocytes. *J. Biol. Chem.* 275:11348-54.

Zhao H., Sapolsky R. M. & Steinberg G. K. (2006). Phosphoinositide-3-kinase/Akt survival signal pathways are implicated in neuronal survival after stroke. *Mol. Neurobiol.* 34:249-269.

Zhao H., Shimohata T., Wang J. Q., Sun G., Schaal D. W., Sapolsky R. M., & Steinberg G. K. (2005). Akt contributes to neuroprotection by hypothermia against cerebral ischemia in rats. *J. Neurosci.* 25:9794-9806.

Zhong Z., Wen Z. & Darnell J.E. Jr. (1994). Stat3: a STAT family member activated by tyrosine phosphorylation in response to epidermal growth factor and interleukin-6. *Science* 264:95-98.

Zhu Y., Roth-Eichhorn S., Braun N., Culmsee C., Rami A. & Kriegstein J. (2000). The expression of transforming growth factor-beta1 (TGF-beta1) in hippocampal neurons: a temporary upregulated protein level after transient forebrain ischemia in the rat. *Brain Res.* 866:286-298.

Zierath D., Thullbery M., Hadwin J., Gee J.M., Savos A., Kalil A. & Becker K.J. (2010). CNS immune responses following experimental stroke. *Neurocrit. Care* 12:274-284.

Zonta M., Sebelin A., Gobbo S., Fellin T., Pozzan T. & Carmignoto G. (2003). Glutamate-mediated cytosolic calcium oscillations regulate a pulsatile prostaglandin release from cultured rat astrocytes. *J. Physiol.* 553:407-414.

PRODUZIONE SCIENTIFICA

Pubblicazioni scientifiche

Armogida M., Spalloni A., Amantea D, Nutini M., Petrelli F., Longone P, Bagetta G., Nisticò R. e Mercuri N.B. (2011). On the protective role of catalase against cerebral ischemia in *vitro* and in *vivo*. *Journal of Immunopathology and Pharmacology* 24:735-47.

Amantea D., Russo R., Petrelli F., Tassorelli C., Morrone L.A., Bagetta G. and Corasaniti M.T. (2011) Neuroprotection by leptin in a rat model of permanent cerebral ischemia: effects on STAT3 phosphorylation in discrete cells of the brain. *Cell Death and Disease*, *in press*.

Comunicazioni a congressi internazionali:

- 1) Amantea D., Tassorelli C., Petrelli F., Bagetta G., Corasaniti M., "Dissection of a role for matrix metalloproteinases (MMPs) in the neuroinflammatory and detrimental response triggered by transient middle cerebral artery occlusion (MCAo) in the brain of rat". Atti del convegno "18th European Society for Neurochemistry Meeting - 4th Conference on Advances in Molecular Mechanisms of Neurological Disorders", Leipzig, Germany, 11 - 14 July, 2009, *Journal of Neurochemistry Wiley - Blackwell:Oxford (UK)*, 2009, Vol. 110 suppl. 1, pp. 24.

- 2) Greco C., Mangione A.S., Amantea D, Petrelli F., Nappi G., Blandini F., Bagetta G. e Tassorelli C. C418 Modulation of the express of RAGE isoforms in a rat model of transient middle cerebral occlusion. 8th IBRO world congress of neuroscience. International Brain Research Organization. Florence- Italy July 14-18, 2011.

Comunicazioni a congressi nazionali:

- 1) Petrelli F., Amantea D., Bagetta G., Corasaniti M. T., "Fast activation of matrix metalloproteinases (MMPs) by transient middle cerebral artery occlusion (MCAo) enhances interleukin (IL)-1beta in the brain of rat". Contributo a New Perspective in Neuroscience: Research Results of Young Italian Neuroscientists, Napoli, 17 Aprile , 2009.
- 2) Petrelli F., Amantea D., Bagetta G., Corasaniti M. T., "Transient middle cerebral artery occlusion (MCAo) enhances interleukin(IL)-1beta via a mechanism implicating activation of MMPs in the brain of rat". Contributo a XII Workshop on Apoptosis in Biology and Medicine, Parghelia (VV), Italia, 22-22 maggio, 2009.
- 3) Amantea D., Petrelli F., Bagetta G., Corasaniti M. T., "Temporal and brain regional definition of the neuroinflammatory response to transient focal cerebral ischemia in rat". Atti del convegno "XXXIV National Congress of the Italian Pharmacological Society", Rimini, Italia, 14-17 ottobre, 2009, pp. S2/2/-1.

- 4) Amantea D., Petrelli F., Russo R., Bagetta G e Corasaniti M.T. “Enhanced STAT-3 phosphorylation is implicated in the neuroprotection afforded by leptin in rats subjected to permanent middle cerebral artery occlusion”. Atti del convegno “XXXV National Congress of the Italian Pharmacological Society”, Bologna, Italia, 14-17 settembre, 2011, pp. P-3/1.

- 5) Petrelli F. “UNICAL-52 011: a drug to target neuroinflammation in stroke”. Comunicazione al workshop “Translational research in stroke therapy”, Rende (CS), Italia, 16 Novembre, 2011.