



UNIVERSITÀ DELLA CALABRIA  
Facoltà di Farmacia e Scienze  
della Nutrizione e della Salute

Dipartimento Farmaco-Biologico

Dottorato di Ricerca XXIII ciclo  
Farmacologia e Biochimica della morte cellulare

Settore scientifico-disciplinare prevalente  
BIO/14 Farmacologia

Nuove strategie sperimentali per la  
comprensione e il trattamento  
dell'ischemia cerebrale

Coordinatore  
Chiar.mo Prof. Giacinto Bagetta

Relatore

Chiar.mo Prof. Giacinto Bagetta

Co-relatori

Chiar.mo Prof. Michael A. Moskowitz

Chiar.mo Prof. Alberto Chiarugi

Candidato

Dr. Francesco Blasi

# Indice

Indice

Elenco delle abbreviazioni

Abstract

Capitolo 1 - Introduzione

1.1 - Ischemia cerebrale: epidemiologia e classificazione

1.2 - Aspetti patofisiologici: eccitotossicità, morte cellulare e neuroinfiammazione

1.3 - Trattamento farmacologico dello *stroke* ischemico: nuove strategie terapeutiche

1.4 - Ipotermia terapeutica e AMP

1.5 - Tolleranza ischemica e PARP

1.6 - Demenza vascolare e Small Vessel Disease

Capitolo 2 - Materiali e metodi

2.1 Ipotermia terapeutica e AMP

2.2 Tolleranza ischemica e PARP

2.3 Demenza vascolare e Small Vessel Disease

Capitolo 3 - Risultati

3.1 Ipotermia terapeutica e AMP

3.2 Tolleranza ischemica e PARP

3.3 Demenza vascolare e Small Vessel Disease

Capitolo 4 - Discussione

4.1 Ipotermia terapeutica e AMP

4.2 Tolleranza ischemica e PARP

4.3 Demenza vascolare e Small Vessel Disease

Elenco della pubblicazioni

Bibliografia

## Elenco delle abbreviazioni

nNOS - neuronal Nitric Oxide Sintase  
eNOS - endothelial Nitric Oxide Sintase  
iNOS - inducible Nitric Oxide Sintase  
COX-2 - Cyclooxygenase-2  
NF-kB - Nuclear factor-kB  
MAPK - Mitogen Activated Protein Kinase  
NMDA - N-methyl-D-aspartic acid  
AMPA -  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid  
ASIC - Acid-sensing Ion Channel  
TRP - Transient Receptor Potential Channel  
ROS - Reactive Oxygen Species  
NO - Nitric Oxide  
RNS - Reactive Nitrogen Species  
PARP - Poly-(ADP-ribose) Polymerase  
TNF- $\alpha$  - Tumor Necrosis Factor- $\alpha$   
IL-1 - Interleukin-1  
MCP-1 - Monocyte Chemotactic Protein 1  
ICAM-1 - Inter-Cellular Adhesion Molecule 1  
STAT - Signal Transducer and Activator of Transcription  
AP-1 - Activator Protein 1  
TNFR-1 - Tumor Necrosis Factor Receptor 1  
RIP-1/3 - Receptor-interacting Protein 1/3  
MPTP - Mitochondrial Permeability Transition Pore  
AIF - Apoptosis Inducing Factor  
NINDS - The National Institute of Neurological Disorders and *Stroke*  
**BBB** - Blood Brain Barrier  
**MMP** - Matrix Metalloproteinase  
**SIRN** - Società Italiana Riabilitazione Neurologica  
**AMP** - Adenosine Monophosphate  
**IPC** - Ischemic Preconditioning  
**NAD** - Nicotine Adenine Nucleotide  
**Akt/PKB** - Akt/ Protein Kinase B  
**MCAo** - Middle Cerebral Artery occlusion  
**SVD** - Small Vessel Disease  
**CADASIL** - Cerebral Autosomal Dominant Arteriopathy with Subcortical Infarcts and Leucoencephalopathy  
**tPA** - Tissue Plasminogen Activator  
**H&E** - Hematoxylin and Eosin  
**LFB** - Luxol Fast Blue

## Abstract

Ischemic stroke is a leading cause of death and long-term disabilities worldwide.

Although the pathophysiology of stroke has been studied extensively and several drugs have been proposed in preclinical trials, the pharmacological approach to stroke treatment still remains limited to thrombolysis. The development of neuroprotective strategies is crucial to preserve the integrity of the so-called neurovascular unit (the network of neurons, glial components and endothelial cells which interact regulating brain homeostasis) during and following an ischemic event, and then to increase the chances of neurological recovery.

Furthermore, a relevant part of all stroke subtypes has not been studied yet, because the lack of specific animal models able to mimic their pathological features.

This Ph.D. Thesis, indeed, was aimed both at study new therapeutic strategies to treat stroke pathology and at elucidate pathophysiological mechanisms not yet fully understood.

In the first part of this dissertation, I propose a new drug to treat acute ischemic stroke, the 5'-adenosine monophosphate (AMP). AMP administration reduces the infarct size after 90' of middle cerebral artery occlusion acting on the modulation of body temperature. In particular, AMP reduces the temperature in a dose-dependent manner through the stimulation of Adenosine-1 receptors in the Central Nervous System, as demonstrated using specific inhibitors. Since endogenous AMP is also able to modulate body temperature, I conclude that the stimulation of AMP signaling pathway is beneficial in an experimental model of stroke and may offer a new target to design neuroprotective drugs.

In the second part of my Ph.D. Thesis I show the relationship between PARP-1 inhibitors and the mechanisms of ischemic tolerance. PARP-1 inhibition have been shown to improve stroke outcome in several animal models of cerebral ischemia, but its unclear if their use affects the development of brain tolerance. To investigate this aspect, I have studied PARP-1 activity in an animal model of ischemic preconditioning and I have evaluated the extent of neuroprotection provided by the brain conditioning using both pharmacological and genetic modulation of PARP-1. My results show that PARP-1 is not involved in our model of ischemic preconditioning and its pharmacological modulation doesn't affect the mechanisms of brain tolerance.

The last chapter is focused on a new animal model to study the lacunar stroke. Deep white matter and lacunar strokes accounts for more than one quarter of all ischemic strokes, but our knowledges of this stroke subtype are incomplete. I have characterized a selective model of sub-cortical white matter stroke, showing both axonal and myelin degeneration and behavioral deficits induced by a lesion strategically located to mimic human pathology. Since the development of vascular dementia, a neurological condition leading to progressive cognitive skills loss and strictly connected to lacunar strokes, is associated with blood brain barrier (BBB) disruption, I have studied the time-course of BBB opening in this animal model to clarify the relationship between white matter fiber degeneration and BBB breakdown leading to vasogenic edema. This model can help to better understand important pathophysiological mechanisms in the field of ischemic lacunar strokes.

## Capitolo 1 - Introduzione

### *1.1 - L'ischemia cerebrale: epidemiologia e classificazione*

L'ischemia cerebrale è una patologia neurologica causata dall'interruzione, permanente o transitoria, dell'apporto ematico al cervello. La conseguente morte delle cellule nervose e la perdita o riduzione delle normali funzioni cerebrali viene definita con il termine *ictus* o *stroke*.

Lo *stroke* è la seconda causa di morte nei paesi industrializzati e costituisce la principale causa d'invalidità permanente e la seconda causa di demenza dopo la malattia di Alzheimer (Moskowitz et al. 2010).

Dal punto di vista epidemiologico, nei soli Stati Uniti si registrano circa 800.000 casi di *stroke* ogni anno, che si traducono in quasi 200.000 decessi (Lloyd-Jones 2010). I pazienti che sopravvivono all'evento acuto riportano spesso gravi deficit neurologici invalidanti, e nel 30% dei casi necessitano continua assistenza. Secondo una stima dello NIH (National Institute of Health), la spesa sanitaria legata allo *stroke* ammonta a circa 73 miliardi di dollari ogni anno, ed è destinata a salire ulteriormente a causa dell'aumento dell'età media della popolazione (Lloyd-Jones et al. 2009). In Italia la situazione non è differente. Lo *stroke*, infatti, rappresenta la principale causa di neurodisabilità, con una prevalenza di circa 200 emiplegici ogni 100.000 abitanti (studio SIRN, 2006), mentre l'incidenza annuale varia tra i 165-350 casi fra gli uomini e i 130-275 casi fra le donne ogni 100.000 abitanti (Sacco et al. 2011). Le statistiche sono implacabili non solo nei paesi occidentalizzati, infatti in Russia e Cina si stima che il numero di decessi in seguito a *stroke* sia anche 5-10 volte superiore a quello degli Stati Uniti (Lloyd-Jones et al. 2009).

Lo *stroke* rappresenta quindi un'emergenza medica a carattere globale.

Lo *stroke* viene classificato secondo la sua eziologia in *stroke* ischemico (80-85% dei casi) e *stroke* emorragico (15-20%) (Caplan 2011). A differenza dello *stroke* emorragico, causato dalla rottura di un vaso, l'*ictus* ischemico è determinato nella maggior parte dei casi dall'occlusione di un'arteria cerebrale in seguito ad un embolo o ad una trombosi locale. Secondo l'Oxfordshire Community Stroke Project (OCSP) (Bamford et al. 1991) lo *stroke* ischemico viene classificato in quattro sottotipi a seconda del territorio arterioso interessato e delle manifestazioni cliniche correlate. Si distinguono, quindi, infarti che coinvolgono l'intera circolazione anteriore (TACI), che rappresentano circa il 25% e sono associati ad un esito molto sfavorevole, *stroke* che coinvolgono zone più circoscritte del cervello come gli infarti lacunari (LACI, 30%) o comprendono solo parzialmente la circolazione anteriore (PACI, 30%), ed infine infarti determinati da un'interruzione della circolazione cerebrale posteriore (POCI, 15%) (Paci et al. 2011). Il pronto riconoscimento dell'eziologia e del sottotipo di *stroke* permettono il trattamento del paziente in tempi rapidi, ed aumentano così le possibilità di un robusto recupero delle funzionalità neurologiche.

## 1.2 - Aspetti patofisiologici: eccitotossicità, morte cellulare e neuroinfiammazione

L'interruzione, anche breve, del flusso ematico cerebrale ha un effetto devastante sulle cellule nervose. Il cervello è infatti un organo estremamente sensibile agli insulti ischemici sia a causa del suo elevato consumo metabolico (esso infatti utilizza circa il 25% dell'energia prodotta dal metabolismo basale), sia poiché dipende interamente dal catabolismo glucidico, in quanto i depositi di glicogeno sono assai limitati (Lee et al. 2000).

L'ischemia determina una rapida riduzione dei substrati energetici (ossigeno e glucosio) e la perdita dell'omeostasi cellulare, innescando una cascata di eventi spazio-temporali che si evolvono per ore e giorni (Dirnagl et al. 1999). Il centro (core) del territorio ischemico subisce una crisi energetica irreversibile, mentre l'area circostante (penumbra) risulta elettrofisiologicamente silente ma ancora in grado di sostenere un metabolismo basale grazie a una perfusione tissutale non completamente compromessa (Astrup et al. 1981). La *penumbra* costituisce più della metà dell'intero territorio ischemico e denota una regione funzionalmente alterata ma ancora salvabile. In quest'area infatti i neuroni non sono più in grado di "sparare" potenziali d'azione (firing) ma riescono a conservare il potenziale di membrana a riposo (resting). Se la circolazione viene ripristinata, la capacità di *firing* neuronale si ristabilisce, altrimenti dopo prolungata ischemia la depolarizzazione anossica persistente determina la morte cellulare (Astrup et al. 1977). La *penumbra* rappresenta, quindi, il naturale *target* biologico di ogni terapia farmacologica mirata a proteggere il cervello dal danno ischemico.

I meccanismi che determinano la morte delle cellule nervose in seguito a ischemia sono differenti. Quelli maggiormente studiati e caratterizzati sono eccitotossicità e squilibrio ionico, stress ossidativo e nitrossidativo, neuroinfiammazione e morte cellulare necrotica e/o apoptotica (Moskowitz et al. 2010).

La perdita dei potenziali di membrana indotta dall'ischemia causa l'accumulo di glutammato, il neurotrasmettitore eccitatorio maggiormente presente nel cervello dei mammiferi, nello spazio extracellulare (Choi & Rothman 1990). Il glutammato non può essere ricaptato dagli astrociti poiché l'acidosi metabolica e la deplezione energetica indotte dall'ischemia causano il fallimento delle pompe di trasporto (Swanson et al. 1995), e questo determina la prolungata stimolazione dei recettori ionotropi per NMDA, AMPA e Kainato (Lipton 1999). Gli ioni calcio ( $Ca^{2+}$ ) rilasciati in seguito all'apertura del canale all'interno del

recettore inducono l'attivazione di fosfolipasi e proteasi che degradano la membrana e le proteine necessarie per l'integrità cellulare (Ankarcrona et al. 1995) e stimolano enzimi come fosfolipasi A, nNOS e ciclossigenasi che alimentano la cascata del segnale. Il glutammato in eccesso lega anche i recettori metabotropi, determinando sia effetti neuroprotettivi (Pellegrini-Giampietro et al. 1999) che neurodegenerativi (Bruno et al. 2001). L'accumulo di calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) intracellulare non è determinato solo dall'attivazione del recettore glutammatergico. Sono stati, infatti, dimostrati essere attivati e implicati nel processo di morte ischemico diversi pompe e canali ionici, come lo scambiatore  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ , i canali ionici attivati in condizioni di acidosi (ASICs), e i *transient receptor potential* (TRP) channels (Annunziato et al. 2007). L'accumulo di glutammato e lo squilibrio ionico contribuiscono al danno ischemico non solo a livello cellulare ma anche determinando effetti a livello tissutale. Nel territorio ischemico, infatti, si propagano onde di depolarizzazione (peri-infarct depolarizations) che coinvolgono sia glia che neuroni e sono state dimostrate contribuire al progredire della lesione ischemica in maniera proporzionale al loro numero e durata (Shin et al. 2007).

Le specie radicaliche di ossigeno (ROS) e nitrossido (RNS) rappresentano mediatori-chiave del danno ischemico (Lo et al. 2003). Lo squilibrio ionico determina, infatti, la produzione di radicali liberi come l'anione superossido ( $\text{O}_2^-$ ) e il perossinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ) che si accumulano rapidamente nelle cellule nervose a causa del *mismatch* con gli enzimi e le molecole antiossidanti ed agiscono sia direttamente che indirettamente nella genesi del danno. Le specie radicaliche, infatti, agiscono a livello mitocondriale causando il disaccoppiamento della fosforilazione ossidativa che porta alla produzione di ulteriori radicali liberi che amplificano il processo, ed inoltre causano direttamente danno alle strutture cellulari (Chan 2001). Il nitrossido (NO) gioca un ruolo particolare nel processo ischemico. Il NO, infatti, media la morte neuronale tramite vari meccanismi come la S-nitrosilazione di

varie proteine cellulari (Gu et al. 2002) e l'attivazione dell'enzima Poli-(ADP-ribosio) Polimerasi (PARP) (Pacher et al. 2007), ma è anche un neurotrasmettitore ad azione vasodilatante, quindi con effetti potenzialmente benefici sul ripristino del flusso cerebrale. Il duplice ruolo del NO durante l'ischemia cerebrale è determinato dall'esistenza di tre isoforme dell'enzima NOS, localizzate in diversi distretti tissutali (Dalkara et al. 1994). È stato, infatti, dimostrato in modelli animali di ischemia cerebrale che la delezione genica dell'isoforma presente nei neuroni (nNOS) ha un effetto neuroprotettivo, mentre l'inibizione dell'isoforma presente sull'endotelio vascolare (eNOS) determina l'aumento del volume di infarto (Huang et al. 1994; Endres et al. 2004).

L'ischemia induce l'attivazione di numerosi geni e proteine pro-infiammatorie, che sono responsabili della fase secondaria o ritardata della cascata ischemica (Iadecola & Anrather 2011). Citochine e chemochine (TNF- $\alpha$ , IL-1, MCP-1) e molecole di adesione (ICAM-1, E e P-selectine) promuovono la migrazione di leucociti e linfociti dal torrente circolatorio nel parenchima cerebrale già 1-2 giorni dopo l'insulto ischemico, mentre il picco di monociti e macrofagi viene registrato dopo 5-7 giorni (del Zoppo 2009). Anche la glia partecipa attivamente al processo infiammatorio, infatti, dopo 24 ore dall'ischemia si registra proliferazione degli astrociti (astrogliosi) ed attivazione dei macrofagi residenti (microglia) (Yenari et al. 2010). Il processo di fagocitosi determina la produzione di metaboliti tossici e l'induzione di molecole pro-infiammatorie che amplificano la cascata del segnale. Tra queste, iNOS e COX-2 hanno un ruolo centrale nel processo neuroinfiammatorio, infatti, l'inibizione farmacologica e la delezione genica di queste molecole si sono rivelate protettive in numerosi modelli sperimentali di *stroke* (Iadecola et al. 1997; Sugimoto & Iadecola 2003). La cascata ischemica determina l'induzione di numerosi geni e fattori di trascrizione, come NF- $\kappa$ B, MAPK, STAT e AP-1, che a loro volta contribuiscono ad esacerbare il danno post-ischemico (Wang et al. 2007). In particolare NF- $\kappa$ B gioca un ruolo centrale nell'omeostasi neuronale e

recenti studi hanno dimostrato come in risposta a differenti stimoli esterni esso sia in grado di mediare sia la morte che la sopravvivenza cellulare (Pizzi et al. 2009).

L'attivazione della cascata ischemica determina come evento ultimo la morte delle cellule nervose. I due principali meccanismi di morte cellulare coinvolti in questo processo sono necrosi e apoptosi. In generale, mentre la morte cellulare necrotica è il principale meccanismo che si verifica nel core ischemico, l'apoptosi caratterizza la *penumbra*, dove il flusso sanguigno residuo permette di mantenere livelli di ATP sufficienti per attivare la cascata apoptotica. Sono, infatti, i livelli intracellulari di ATP, insieme alla natura e all'intensità dello stimolo e al tipo cellulare, ad essere determinanti nella decisione tra necrosi ed apoptosi (Bonfoco et al. 1995; Nicotera et al. 1998). Il mitocondrio gioca un ruolo fondamentale nei processi di morte cellulare. Il danno ossidativo ed eccitotossico media la formazione del poro di transizione mitocondriale (MPTP) e il rilascio nel citosol di citocromo C e diverse proteine pro-apoptotiche, che formano il complesso macromolecolare apoptosoma ed attivano le caspasi (Yuan & Yankner 2000). Le caspasi rappresentano le proteine esecutrici del processo apoptotico, infatti, la loro inibizione protegge il tessuto cerebrale dal danno ischemico (Endres et al. 1998). L'apoptosi può indurre morte cellulare anche in maniera caspasi-indipendente, tramite l'attivazione dell'enzima PARP e la traslocazione di AIF (apoptosis inducing factor) nel nucleo, dove induce la condensazione della cromatina (Yu et al. 2002; Wang et al. 2009). L'impiego di PARP inibitori inibisce la morte cellulare apoptotica caspasi-indipendente e riduce il volume di infarto in modelli animali di ischemia focale (Yu et al. 2003; Li et al. 2010). Recentemente è stato dimostrato come anche una forma programmata di necrosi, denominata necroptosi, sia coinvolta nei meccanismi di morte cellulare in seguito ad ischemia. Questo tipo di morte cellulare caspasi-indipendente condivide aspetti in comune con necrosi, apoptosi e autofagia, ed è mediata da un *death receptor* (TNFR1) e da un complesso molecolare formato da due chinasi, RIP-1 e

RIP-3 (Galluzzi et al. 2011). L'inibizione farmacologica della chinasi RIP-1 tramite il composto necrostatina-1 (Nec-1) si è rivelata essere neuroprotettiva in un modello murino di *stroke*, fornendo un nuovo potenziale target per il trattamento del danno cerebrale post-ischemico (Degterev et al. 2005).

### 1.3 - Trattamento farmacologico dello stroke ischemico: nuove strategie terapeutiche

Nonostante gli enormi progressi compiuti nella comprensione dei meccanismi alla base della morte cellulare post-ischemica e la scoperta di numerosi composti capaci di ridurre il danno causato dall'ischemia, risulta molto difficile traslare nella pratica clinica i risultati positivi ottenuti sui modelli animali. Ad oggi, infatti, l'unico composto approvato dalla Food & Drug Administration (FDA) per il trattamento dell'*ictus* ischemico acuto è l'attivatore del plasminogeno tissutale (tPA) (Donnan & Davis 2008; Grotta et al. 2008). Tale composto è la versione ricombinante dell'attivatore tissutale del plasminogeno che si trova naturalmente nell'organismo umano, con la funzione di sciogliere i piccoli coaguli che normalmente si formano nel sangue. Il tPA presenta comunque differenti difficoltà di impiego. Si tratta, infatti, di un composto con una finestra terapeutica ristretta (circa 3 h), per cui il numero di pazienti colpiti da *stroke* che possono usufruire degli effettivi benefici del farmaco è basso (6 pazienti ogni 1000 casi di *stroke*, Gilligan et al. 2005; è molto efficace nel ridurre i deficit neurologici, ma non riduce la mortalità (Hacke et al. 2004); può determinare, come effetto avverso, emorragia cerebrale (6-7% dei casi). A ciò va aggiunto che, a causa della natura repentina degli attacchi ischemici, anche nelle aree maggiormente attrezzate e dotate di *stroke* unit all'avanguardia solo il 10% dei pazienti riceve un trattamento immediato (The National Institute of Neurological Disorders and *Stroke* rt-PA *Stroke* Study Group, 1995; Cloft et al. 2009). Il fatto che la terapia trombolitica, con le sopraelencate limitazioni, rappresenti ancora l'unico protocollo terapeutico per il trattamento dello *stroke* acuto, è la testimonianza concreta delle difficoltà nel riuscire a tradurre i numerosi risultati sperimentali attualmente disponibili in composti clinicamente efficaci. In particolare, è soprattutto la ricerca di sostanze ad azione neuroprotettiva a non aver prodotto risultati traslabili in campo clinico. Infatti, nonostante siano stati testati sia *in vitro* che *in vivo* numerosi composti in grado di

interferire con la cosiddetta cascata ischemica, molti dei quali con risultati entusiasmanti in campo sperimentale (a partire dagli antagonisti per il recettore NMDA, passando per farmaci capaci di ridurre la produzione di radicali liberi e l'infiammazione, fino a composti in grado di inibire il processo apoptotico), nessuno ha ancora superato i *trial* necessari per essere impiegati nella pratica clinica (Green 2008; Segura et al. 2008). La protezione dei neuroni e delle altre cellule cerebrali dal danno ischemico, invece, dovrebbe essere alla base della strategia terapeutica, e procedere di pari passo con il ripristino del flusso sanguigno.

Le cause che hanno determinato il fallimento dei numerosi *stroke clinical trial* sono diverse, e negli ultimi anni un crescente numero di esponenti della comunità scientifica si sta interrogando a proposito (Moskowitz 2010).

Uno dei dubbi maggiormente espressi riguarda il concetto di neuroprotezione.

Classicamente con il termine di neuroprotezione ci si riferisce alla protezione dei neuroni da un insulto di varia natura, e in questa direzione sono stati rivolti la maggior parte degli sforzi della ricerca pre-clinica degli ultimi decenni. La protezione dei neuroni potrebbe non essere sufficiente poiché il tessuto danneggiato dall'ischemia comprende anche altri elementi cellulari, la cui importanza è stata estensivamente delucidata (Arai & Lo 2009). Sia glia che cellule endoteliali sono, infatti, indispensabili per la funzionalità neuronale. La glia fornisce la guaina mielinica per la trasmissione assonica (oligodendrociti) e regola l'emodinamica neurovascolare (astrociti), le cellule endoteliali sono fondamentali per il mantenimento delle proprietà selettive della barriera emato-encefalica (BBB). L'insieme di queste cellule (neuroni, glia e cellule endoteliali) costituisce la cosiddetta unità neurovascolare, un sistema altamente integrato e regolato alla base delle normali funzioni cerebrovascolari (del Zoppo 2010).

La necessità di proteggere l'intera unità neurovascolare anziché i soli neuroni esige l'impiego di strategie terapeutiche con effetti pleiotropici. L'ipotermia terapeutica e la

tolleranza ischemica si sono rivelate essere due meccanismi di protezione capaci di agire con questa modalità (Moskowitz et al. 2010), e sono stati analizzati in maniera critica nel corso del mio dottorato di ricerca. In particolare, è stato verificato l'impiego di composti biologici ad azione ipotermizzante in corso di ischemia cerebrale ed è stato valutato il ruolo dell'enzima PARP nello sviluppo della tolleranza ischemica. Tali aspetti verranno trattati rispettivamente nelle sezioni "Ipotermia terapeutica e AMP" e "Tolleranza ischemica e PARP".

Un'altra problematica largamente sottolineata dalla comunità scientifica internazionale riguarda la capacità dei modelli animali attualmente a disposizione di mimare l'ischemia cerebrale nell'uomo. Nel corso delle ultime due decadi, infatti, la maggior parte della ricerca sperimentale *in vivo* si è concentrata sull'impiego di modelli animali capaci di generare una larga area di infarto, soprattutto nella materia grigia corticale e sub-corticale, che coinvolge quasi l'intero emisfero ipsilaterale. Al contrario, la maggior parte degli *stroke* nell'uomo sono di dimensioni piccole, localizzati nelle regioni profonde e meno irrorate del cervello e comprendono una larga componente di materia bianca (Carmichael 2005). Secondo le statistiche, infatti, solo il 23% degli *stroke* nell'uomo comprende ampi territori vascolari, mentre più del 60% sono *ictus* piccoli e strategicamente localizzati, ed associati con deficit neurologici a lungo termine (Paci et al. 2011).

Lo sviluppo di modelli animali che maggiormente rispecchiano sia l'estensione che i deficit neurologici riscontrati nell'uomo è una priorità sia per la comprensione della fisiopatologia dello *stroke* che per la produzione di farmaci efficaci anche nei trial clinici. La seconda parte del mio dottorato è stata, infatti, incentrata sullo studio dell'ischemia della materia bianca sottocorticale, una condizione patologica spesso associata nell'uomo alla demenza, e verrà trattata nella sezione "Demenza vascolare e Small Vessel Disease".

#### 1.4 - Ipotermia terapeutica e AMP

L'ottenimento di una riduzione precisa e controllata della temperatura corporea rappresenta attualmente una delle maggiori problematiche per l'applicazione dell'ipoteremia terapeutica in diverse condizioni patologiche, ed in modo particolare nello *stroke*. È ormai opinione consolidata, infatti, che la riduzione della temperatura fino ad una scala di valori compresi tra 32-36°C (mild hypothermia) determina una importante riduzione del volume d'infarto in modelli animali di ischemia globale e focale (Krieger & Yenari 2004; van der Worp & van Gijn 2007; Lazzaro & Prabhakaran 2008). I meccanismi d'azione finora ipotizzati sono molteplici, e variano dalla riduzione del metabolismo cellulare alla riduzione delle *peri-infarct depolarization*, all'inibizione di necrosi ed apoptosi alla stimolazione della via del segnale akt/PKB, fino alla riduzione dei livelli di MMP-9 e alla protezione della microvascolarizzazione cerebrale (Zhao et al. 2007; Burk et al. 2008).

Recentemente, è stato evidenziato un ruolo dell'AMP nei meccanismi di termoregolazione (Zhang et al. 2006).

La 5'-adenosina monofosfato (AMP) è un nucleotide appartenente alla famiglia delle purine, ed è formato da uno zucchero pentoso (ribosio), una base azotata (adenina) ed un gruppo fosfato. Oltre a costituire uno dei monomeri dell'RNA, l'AMP è implicato nei meccanismi di omeostasi energetica e di trasduzione del segnale. Esso, infatti, funge sia da substrato che da prodotto nella via metabolica dell'ATP, inoltre, è uno dei ligandi endogeni, assieme ad Adenosina, ADP ed ATP, per i recettori purinergici (Burnstock 2006).

La somministrazione di AMP riduce in maniera dose-dipendente la temperatura corporea, alterando al tempo stesso le funzioni cardio-circolatorie; questi effetti sembrano essere mediati dai recettori purinergici a livello centrale e/o periferico, anche se i particolari di questa interazione restano ancora da elucidare (Swoap et al. 2007).

Attualmente molti sono i *trial* clinici in corso basati su una terapia ipotermizzante, e quelli che già si sono conclusi hanno riportato risultati positivi ed incoraggianti (Ginsberg 2008; Kollmar et al. 2009). Resta da stabilire ancora però quale sia la migliore modalità per l'induzione dell'ipotermia stessa, in modo da non creare scompensi fisiologici nel paziente e garantire allo stesso tempo una sua pratica e rapida applicazione (van der Worp et al. 2010)

Sulla base di queste premesse, risultano evidenti le potenzialità di un composto endogeno dotato di proprietà ipotermizzanti come la 5'-adenosina monofosfato, per cui l'obiettivo del mio lavoro è stato quello di caratterizzarne le proprietà farmacologiche, studiarne la cinetica ed il meccanismo d'azione, e di testare il suo effetto in un modello animale di occlusione dell'arteria cerebrale media.

### 1.5 - Tolleranza ischemica e PARP

Con il termine preconditionamento (o tolleranza) si intende un naturale meccanismo protettivo, filogenicamente molto conservato in varie cellule, tessuti e specie animali, che consiste nell'aumentata resistenza ad uno stimolo nocivo ed è determinata da una precedente esposizione a stimoli della stessa natura ma sottoliminali (Gidday 2006). Nel corso degli ultimi anni, la ricerca biomedica ha sviluppato dei modelli sia *in vitro* che *in vivo* capaci di mimare questi fenomeni adattativi, con il potenziale, duplice, scopo di comprendere i meccanismi biomolecolari alla base della tolleranza e di poterli rielaborare ed applicare a varie strategie terapeutiche (Dirnagl et al. 2009). Una parte molto rilevante degli studi sui meccanismi di tolleranza è rappresentata da modelli sperimentali applicati al danno da ischemia-riperfusion. Descritto per la prima volta nel miocardio (Murry et al. 1986), il fenomeno del preconditionamento ischemico è stato rilevato nel cervello agli inizi degli anni '90 (Kitagawa et al. 1990) ed ha successivamente trovato rapida applicazione nello studio del danno cerebrale conseguente ad ischemia globale o focale, la più comune ed importante causa di neurodisabilità nel mondo. Numerosi sono i geni e le proteine coinvolte nei meccanismi di preconditionamento ischemico (IPC), in particolare è stato dimostrato come eventi molecolari quali l'attivazione di proteine chinasi, l'induzione di fattori di trascrizione, la neosintesi di molecole neuroprotettive, giochino un ruolo fondamentale nello sviluppo di tali processi (Pignataro et al. 2009). Nonostante le recenti scoperte nel campo della tolleranza ischemica, però, molti degli eventi biochimici che ne sono alla base restano ancora da chiarire e comprendere.

La PARP (Poli-(ADP-ribosio) Polimerasi) è un enzima a localizzazione nucleare che utilizza il NAD per formare lunghi polimeri di ADP(ribosio)(PAR) e regolare differenti funzioni cellulari (D'Amours et al. 1999). In particolare la PARP si attiva in seguito al danno

del DNA e, in condizioni fisiologiche, l'enzima partecipa ai meccanismi di mantenimento dell'integrità della cromatina e della riparazione degli acidi nucleici. L'iperattivazione della PARP in seguito ad un danno massivo del DNA causa invece la morte cellulare (suicide hypothesis, Berger 1985) in quanto, come è stato osservato in vari tipi di cellule tra cui i neuroni, l'estesa poli-ADP-ribosilazione determina un elevato consumo di NAD e la profonda deplezione cellulare di ATP. Recentemente, accanto all'ipotesi del suicidio è stato evidenziato come la PARP influisca sulla morte neuronale sia incidendo sul processo trascrizionale che provocando l'attivazione di segnali di morte cellulare (Chiarugi 2005). In particolare, sono state proposte la "transcriptional hypothesis", che sottolinea come diversi geni proinfiammatori (iNOS, IL-1 $\beta$ , COX-2, TNF- $\alpha$ ) vengano trascritti in seguito ad attivazione PARP (Chiarugi 2002), e la "signalling hypothesis" che trova il suo razionale nella morte cellulare *apoptosis-like* innescata dal rilascio di AIF dal mitocondrio (Chiarugi & Moskowitz 2002). Con questa azione pleiotropica la PARP ha un ruolo fondamentale nei meccanismi di morte neuronale conseguenti al danno ischemico, infatti sia la sua inibizione farmacologica che delezione genica riducono sensibilmente i volumi di infarto in vari modelli animali di ischemia cerebrale (Eliasson et al. 1997; Endres et al. 1997; Moroni & Chiarugi 2009).

Il coinvolgimento della PARP-1 nei meccanismi di tolleranza è stato precedentemente dimostrato *in vivo* nel miocardio di ratto (Liaudet et al. 2001) ed *in vitro* in colture miste corticali (Garnier et al. 2003), ma la sua attività nel cervello ancora non è stata studiata.

Lo scopo del mio lavoro è stato quindi investigare se la PARP-1 e la sua attività enzimatica sono coinvolte nei meccanismi di tolleranza che riducono la sensibilità del cervello all'evento ischemico e se l'impiego di inibitori PARP compromette l'attivazione dei meccanismi di tolleranza naturale in seguito a *stroke*.

## 1.6 - Demenza vascolare e Small Vessel Disease

La demenza vascolare è il secondo tipo più comune di demenza subito dopo la malattia di Alzheimer, ed è causata da un danno di natura ischemica nelle regioni profonde e meno irrorate del cervello (Román et al. 2002; Vermeer et al. 2007). Recenti osservazioni hanno correlato il deterioramento cognitivo tipico di questo stato patologico con la cosiddetta malattia dei piccoli vasi (Small Vessel Disease, SVD), una forma di arteriolosclerosi cerebrale che colpisce le piccole arterie, le arteriole, le venule ed i capillari (Pantoni & Gorelick 2011). Le SVDs sono causate da vari fattori spesso concomitanti come l'ipertensione (Khan et al. 2007), l'aterosclerosi e la formazione di microateromi (Hassan et al. 2003), l'angiopatia amiloide cerebrale (Haglund et al. 2004), fenomeni di tipo infiammatorio cronico e rare malattie genetiche. Le due manifestazioni cliniche più comuni delle SVDs sono gli infarti lacunari e la leucoaraiosi (Lam et al. 2008). In entrambi i casi, il danno di natura ischemica, cronico nel caso della degenerazione della materia bianca e acuto e focale per gli infarti lacunari, sembra essere alla base della patogenesi (Fisher 1968; Fisher 1982). Nonostante questo tipo di patologia rappresenti più di un quarto di tutti gli *stroke* ischemici, la mancanza di modelli animali capaci di mimare sia lo sviluppo che la progressione della malattia ha fortemente limitato la comprensione e la produzione di specifici trattamenti per le SVDs (Hainsworth & Markus 2008).

Una condizione clinica ben definita che include tutte le caratteristiche patologiche delle SVDs è il disordine genetico noto come CADASIL. La CADASIL (Cerebral Autosomal Dominant Arteriopathy with Subcortical Infarcts and Leucoencephalopathy) è una raro disordine genetico scoperto alla metà del XX secolo e caratterizzato da ricorrenti *stroke* lacunari, leucoaraiosi, emicrania e demenza (Chabriat et al. 2009). Descritta per la prima volta nel 1955 da Van Bogaert come una “malattia di Binswanger a rapido corso”, è nota

oggi essere causata dalla mutazione, a livello del cromosoma 19, del gene NOTCH3, che codifica per un recettore transmembranario prevalentemente espresso sulle cellule muscolari lisce arteriolari (Joutel et al. 1996). La lesione vascolare caratteristica della CADASIL è un'unica, sistemica arteriopatia che, sebbene coinvolge principalmente le arterie cerebrali, è caratterizzata da una prominente alterazione di tutte le cellule muscolari lisce arteriolari ed un patognomonico accumulo di granuli osmiofilici, il cui maggior componente è l'ectodominio dei recettori NOTCH3 (Joutel et al. 2000). Grazie allo sviluppo di linee murine transgeniche che esprimono diverse varianti della mutazione umana alla base della CADASIL è ora possibile studiare l'effetto dell'ipoperfusione a livello subcorticale e comprendere come la riduzione del flusso ematico cerebrale influisce sulla degenerazione della materia bianca tipica delle SVDs (Joutel et al. 2010). I topi transgenici che esprimono la mutazione CADASIL si sono, infatti, dimostrati essere più suscettibili allo *stroke* indotto tramite MCAo rispetto agli animali *wild type*, ed inoltre sviluppano spontaneamente lesioni a livello della materia bianca a 16-20 mesi di età (Arboleda-Velasquez et al. 2008, 2011). L'impiego di questi animali transgenici ha reso possibile la comprensione dell'importanza di NOTCH3 nella regolazione cerebrovascolare e può fornire la base sperimentale per interpretare correttamente la patogenesi della CADASIL e delle SVDs ed aiutare nello sviluppo di nuovi tool preclinici per la sperimentazione di nuove terapie.

Nonostante i CADASIL *mutant mice* hanno fornito preziosi dati sperimentali in linea con le osservazioni cliniche, la mancanza di un modello animale capace di riprodurre i meccanismi patofisiologici della leucoaraiosi e dello *stroke* lacunare impedisce ancora di colmare la distanza tra i risultati preclinici e lo sviluppo di nuovi approcci terapeutici (Ayata 2010). Lo scopo del mio lavoro è stato quindi caratterizzare un nuovo modello animale che causa l'ischemia selettiva della materia bianca sottocorticale nel topo (Sozmen et al. 2009) per studiare l'evoluzione della lesione e comparare il fenotipo ischemico in animali *wild type*

e mutanti CADASIL, in modo da fornire nuove indicazioni sperimentali sulla fisiopatologia di uno dei tipi di ischemia meno conosciuti e magari fornire nuovi *target* farmacologici per il trattamento degli *stroke* sottocorticali.

## Capitolo 2 - Materiali e metodi

### 2.1 Ipotermia terapeutica ed AMP

#### Procedure chirurgiche

Gli esperimenti condotti sugli animali sono stati effettuati nel pieno rispetto dei protocolli sperimentali del Dipartimento di Farmacologia Preclinica e Clinica (Università di Firenze) e delle direttive della Comunità Europea 86/609, incluso il D.M. 116/1992 del Ministero della Salute Italiano.

Per l'intero lavoro sono stati impiegati topi SV-129 maschi di 6-8 settimane, 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 ad acqua e cibo.

Durante le procedure chirurgiche l'anestesia è stata indotta con il 5% di isoflurano in aria e mantenuta successivamente ad una percentuale compresa tra 1,5 e 2%. La temperatura corporea è stata mantenuta a  $37\pm 0,5^{\circ}\text{C}$  tramite un tappetino riscaldato. Il flusso ematico cerebrale è stato misurato tramite un Laser-Doppler (PF2B; Perimed, Stockholm, Sweden).

Per l'induzione dello *stroke* è stato impiegato il metodo dell'occlusione dell'arteria cerebrale media; in breve, dopo aver isolato ed legato definitivamente sia l'arteria carotide esterna che la carotide comune di destra, è stato effettuato una piccola arteriotomia a monte della legatura sulla carotide comune per permettere l'inserimento di un filamento siliconato (Doccol Co., CA) nella carotide interna destra fino ad occludere il circolo di Willis a livello dell'arteria cerebrale media. Gli animali sono stati quindi suturati, disinfettati e sistemati nelle

gabbie durante il periodo dell'ischemia. I gruppi d animali trattati con il veicolo e con l'AMP sono stati sistemati nelle gabbie originarie, mentre il gruppo trattato con AMP e mantenuto alla temperatura fisiologica ( $38\pm 0,5^{\circ}\text{C}$ ) è stato sistemato in un incubatore settato a  $30^{\circ}\text{C}$  per compensare la riduzione di temperatura AMP-dipendente. Dopo 90' di ischemia, gli animali sono stati anestetizzati brevemente e il filamento è stato rimosso in modo da permettere la riperfusione del tessuto. Gli animali sono stati quindi suturati, disinfettati e sistemati nelle gabbie originarie.

#### Valutazione delle aree e dei volumi di infarto

Per la valutazione degli infarti, gli animali sono stati sacrificati per decapitazione ed i cervelli immediatamente asportati e congelati. Successivamente, i cervelli sono stati tagliati al criostato in modo da ottenere per ogni cervello 14 sezioni coronali distanti  $500\ \mu\text{m}$  l'una dall'altra e dello spessore di  $20\ \mu\text{m}$ . I vetrini con le sezioni coronali sono stati colorati tramite il metodo della toluidina blu (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA), un colorante polare che si lega agli acidi nucleici colorando in blu solo il tessuto vivo. Le sezioni colorate sono state quindi digitalizzate e le aree di infarto calcolate tramite il software ImageJ 1.4 (NIH, Bethesda MD). I volumi di infarto sono stati calcolati a partire dalla somma delle 14 sezioni coronali presenti in ciascun vetrino moltiplicata per la distanza tra le sezioni.

#### Composti utilizzati

AMP, Adenosina, (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA), l'antagonista non-selettivo 8-SPT (8-(p-Sulfophenyl)theophylline hydrate) e l'inibitore dell'enzima 5'-

nucleotidasi AMPCP (adenosine 5'-[ $\alpha,\beta$ -methylene]di-phosphate, Tocris, UK) sono stati solubilizzati in PBS (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA). L'antagonista selettivo DPCPX (8-Cyclopentyl-1,3-dipropylxanthine, Tocris, UK) è stato solubilizzato in DMSO (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA).

#### Somministrazione dei farmaci

AMP, antagonisti adenosinici, AMPCP e rispettivi veicoli sono stati somministrati per via intraperitoneale, intracerebroventricolare ed inraipotalamica. Per via intraperitoneale, AMP, DPCPX, 8-SPT e rispettivi veicoli sono stati somministrati mediante una siringa da insulina nel quadrante addominale inferiore sinistro dell'animale. I composti idrosolubili (AMP, 8-SPT ed il veicolo PBS) sono stati somministrati nel volume di 100  $\mu$ L/iniezione, mentre il DPCPX ed il suo veicolo DMSO sono stati somministrati nel volume di 50  $\mu$ L al fine di limitare gli effetti ipotermizzanti del DMSO stesso.

Per via intracerebroventricolare, AMP, DPCPX, 8-SPT, AMPCP e rispettivi veicoli sono stati somministrati nel ventricolo cerebrale laterale destro mediante una siringa Hamilton (Hamilton Company, 1701 RN, 26Gs) nel volume di 5  $\mu$ L/iniezione. Solo nel caso della doppia somministrazione intracerebroventricolare di AMP e AMPCP è stato utilizzato il volume di 3  $\mu$ L/iniezione, in modo da ridurre il volume totale iniettato nel ventricolo.

Per via inraipotalamica, AMP, Adenosina e il veicolo PBS sono stati somministrati mediante una siringa Hamilton (Hamilton Company, 1701 RN, 26Gs) nell'ipotalamo anteriore dell'animale. Brevemente, l'animale è stato anestetizzato con lo stesso regime anestesologico riportato in precedenza (sezione "Procedure chirurgiche"), e sistemato in un apparato stereotassico (David Kopf instruments). È stato quindi effettuato, con un trapano chirurgico, un piccolo foro nella porzione di cranio sovrastante la regione di interesse, e

quindi sono state iniettate le sostanze nel volume di 1  $\mu\text{L}$  alle seguenti coordinate stereotassiche: AP + 0.10 mm; ML + 0.80 mm; DV -4.50 mm (The Mouse Brain Atlas in Stereotaxic coordinates, Paxinos&Franklin). L'iniezione è stata effettuata in un tempo di 10' (velocità 100  $\mu\text{L}/\text{min}$ ) mediante l'ausilio di una pompa per microiniezioni (WPI, Ultramicropump II), e successivamente l'ago è stato lasciato in sito per un tempo di 5' al fine di ridurre i fenomeni di reflusso.

Dopo ogni somministrazione, gli animali sono stati riposti nelle gabbie originarie ed osservati regolarmente per registrare le modificazioni del comportamento.

#### Misurazione della temperatura corporea

Durante tutti gli esperimenti, gli animali sono stati monitorati costantemente al fine di registrare le oscillazioni della core body temperature. Le misurazioni sono state effettuate per mezzo di sistema omeotermico per il controllo della temperatura connesso ad un probe rettale (Harvard Apparatus), ad intervalli di 10'.

## 2.2 Tolleranza ischemica e PARP

### Procedure chirurgiche

Gli esperimenti condotti sugli animali sono stati effettuati nel pieno rispetto dei protocolli sperimentali del Dipartimento di Farmacologia Preclinica e Clinica (Università di Firenze) e delle direttive della Comunità Europea 86/609, incluso il D.M. 116/1992 del Ministero della Salute Italiano.

Per l'intero lavoro sono stati impiegati topi C57BL/6 maschi PARP-1<sup>+/+</sup> e PARP-1<sup>-/-</sup>, di 6-8 settimane, 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 ad acqua e cibo.

Durante ogni tecnica chirurgica, l'anestesia è stata indotta con il 5% di isofluorano in aria e mantenuta successivamente ad una percentuale compresa tra 1,5 e 2%. La temperatura corporea è stata mantenuta a 37±0,5°C tramite un tappetino riscaldato. Il flusso ematico cerebrale è stato costantemente misurato tramite un Laser-Doppler (PF2B; Perimed, Stockholm, Sweden).

Per l'induzione dell'IPC è stato semplificato un modello precedentemente descritto (Cho et al., 2005); in breve, dopo aver effettuato una piccola incisione a livello del collo, le arterie carotidi comuni sono state isolate tramite fili da sutura chirurgica (Ethicon, CA) e successivamente occluse (BCCAO) per mezzo di clip atraumatiche per un tempo di 5'. Al termine dell'occlusione, le clip sono state rimosse, ed accertata l'avvenuta ripresa del flusso sanguigno diretto al cervello, gli animali sono stati suturati, disinfettati e stabulati prima di essere sacrificati a diversi tempi per le analisi biochimiche e bioenergetiche o prima di subire

l'occlusione dell'arteria cerebrale media (MCAo). Nel caso degli Sham, gli animali hanno subito la stessa operazione chirurgica ma senza la BCCAo.

L'occlusione dell'arteria cerebrale media è stata effettuata 24 h dopo l'induzione dell'IPC; in breve, dopo aver isolato ed legato definitivamente sia l'arteria carotide esterna che la carotide comune di destra, è stato effettuato un piccolo foro a monte della legatura sulla carotide comune per permettere l'inserimento di un filamento siliconato (Doccol Co., CA) nella carotide interna destra fino ad occludere il circolo di Willis a livello dell'arteria cerebrale media. Dopo 20', il filamento è stato rimosso in modo da ottenere la riperfusione del tessuto. Gli animali sono stati quindi suturati, disinfettati e stabulati per 72 ore fino al momento del sacrificio.

#### Somministrazione del PARP inibitore PJ34

L'inibitore PARP, N-(6-Oxo-5,6-dihydro-phenanthridin-2-yl)-N,N dimethylacetamide (PJ34, Inotek), è stato somministrato in 100 µL di soluzione salina (NaCl, 0.9%) alla dose di 20 mg/Kg nella finestra temporale compresa tra l'induzione dell'IPC e la MCAo, ed in particolare immediatamente dopo la BCCAo, 8 ore dopo e 16 ore dopo. Gli animali di controllo hanno ricevuto la stessa quantità di veicolo.

#### Valutazione delle aree e dei volumi di infarto

Per la valutazione degli infarti, gli animali sono stati sacrificati per decapitazione ed i cervelli immediatamente asportati e congelati. Successivamente, i cervelli sono stati tagliati

al criostato in modo da ottenere per ogni cervello 13 sezioni coronali distanti 500  $\mu\text{m}$  l'una dall'altra e dello spessore di 20  $\mu\text{m}$ . I vetrini con le sezioni coronali sono stati colorati tramite il metodo della toluidina blu, un colorante polare che si lega agli acidi nucleici colorando in blu solo il tessuto vivo. Le sezioni colorate sono state quindi digitalizzate e le aree di infarto calcolate tramite il software ImageJ 1.4 (NIH, Bethesda MD). I volumi di infarto sono stati calcolati a partire dalla somma delle sezioni coronali presenti in ciascun vetrino moltiplicata per la distanza tra le sezioni.

#### Valutazione dei livelli di NAD e ATP

Per la misurazione dei livelli di NAD e ATP tissutali sono state prelevati, per mezzo di un criostato, dei frammenti striatali a partire dalle sezioni coronali dei cervelli di animali sacrificati a vari time-points dall'induzione dell'IPC. I frammenti sono stati trasferiti in provette *ependorf* contenenti 100  $\mu\text{L}$  di  $\text{HClO}_4$  0,4 N, quindi sonicati fino al dissolvimento del tessuto. Ogni campione è stato quindi suddiviso in due aliquote, rispettivamente per il dosaggio di NAD e ATP. Per il NAD, il campione è stato prima neutralizzato con 100  $\mu\text{L}$  di KOH 1 N e successivamente tamponato con 200  $\mu\text{L}$  di Bicina pH 8, quindi centrifugato a 14000 rpm, 4°C, 5'. 100  $\mu\text{L}$  di supernatante sono stati quindi aggiunti ad una miscela di reazione contenente 23  $\mu\text{L}/\text{mL}$  di etanolo, 0,17 mg/mL di MTT, 0,57 mg/mL di fenazina etosulfato e 10  $\mu\text{g}$  di alcool deidrogenasi; dopo 20' di incubazione, è stata letta l'assorbanza a 550 nm. Per la valutazione dell'ATP, l' aliquota di campione in acido è stata processata per mezzo del kit ATPlite (Perkin Elmer, Zaventem, Belgium) ed effettuata la lettura al luminometro. I risultati, rapportati alla quantità di proteine presenti in ogni campione, sono stati espressi come media  $\pm$ S.E.M.

## Western Blotting

Per la valutazione dei livelli di PAR, del clivaggio della PARP-1 e della Caspasi-3 sono stati prelevati, per mezzo del criostato, dei frammenti striatali a partire dalle sezioni coronali dei cervelli di animali sacrificati a vari time-points dall'induzione dell'IPC. I frammenti sono stati quindi lisati in un buffer contenente 50 mM Tris pH 7.4, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF, 1 % SDS, 4  $\mu$ g/mL aprotinina e leupeptina, e le proteine isolate e misurate con il metodo del Bradford; dopo l'aggiunta di blu di bromofenolo per seguirne la corsa, sono stati caricati 20-40  $\mu$ g di proteine/pozzetto in gel a gradiente 4-20% Tris-Glicina (Invitrogen, Milano, Italia). Dopo l' SDS-PAGE, le proteine sono state trasferite O/N su membrane di nitrocellulosa (Millipore, Milano, Italia). Dopo aver constatato l'avvenuto trasferimento delle proteine tramite la colorazione con il Ponceau rosso, la membrana è stata bloccata 1 h con TBS-T/ 5% Milk e quindi incubata con l'anticorpo primario per 2 h a RT o O/N a 4°C. Gli anticorpi primari utilizzati sono stati rispettivamente anti-PAR monoclinale (Alexis, Italia), Cleaved-PARP e anti-Caspase-3 (Cell Signaling, Boston), impiegati alle rispettive diluizioni. Le membrane sono state quindi lavate tre volte in TBS-T/ 2,5% Milk e successivamente incubate con il rispettivo anticorpo secondario (1:2000). Dopo tre lavaggi per eliminare l'eccesso di anticorpo secondario, le membrane sono state esposte alla reazione con l'ECL (Amersham, UK) per visualizzare sulle lastre fotografiche le bande corrispondenti alla proteina ricercata. L'analisi densitometrica, basata sul rapporto con la  $\beta$ -Actina (Sigma, Italia) presente in ogni pozzetto, è stata ottenuta mediante il software ImageJ 1.4 (NIH, Bethesda MD); i risultati sono stati espressi come media  $\pm$ S.E.M.

## Caspase-3 Assay

Per la valutazione dell'attività della Caspasi-3 è stato utilizzato un kit fluorimetrico (Invitrogen, Italia), impiegato secondo le istruzioni del produttore. In breve, sono stati prelevati campioni striatali a partire da cervelli di animali sacrificati a vari time-points dall'induzione dell'IPC, congelati immediatamente in azoto liquido e successivamente omogenati in un buffer di lisi per mezzo di un pestello vetro-teflon. Dopo una breve centrifugazione a 5000 rpm, 4°C, 5', per eliminare i detriti cellulari, il supernatante ottenuto è stato aggiunto ad una miscela di reazione contenente DTT 1 M, buffer di reazione, e una sequenza peptidica (DEVD) coniugata con il fluoroforo AFC (7-amino-4-trifluoromethyl coumarin). Dopo incubazione a 37°C per 30', è stata effettuata la lettura della fluorescenza (400 nm eccitazione, 505 nm emissione). I risultati, rapportati alla quantità di proteine presente in ogni campione, sono stati espressi come media  $\pm$ S.E.M.

### 2.3 Demenza vascolare e Small Vessel Disease

#### Procedure chirurgiche

I protocolli sperimentali che hanno coinvolto gli animali sono stati approvati dal Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC) del Massachusetts General Hospital (Boston, USA).

Per il lavoro sono stati impiegati topi C57BL/6J maschi di età compresa tra 2 e 3 mesi stabulati in condizioni controllate di temperatura (22°C) ed umidità relativa (70%), sottoposti a condizioni d'illuminazione artificiale controllata, con un ciclo luce/buio di 12 ore, con libero accesso ad acqua e cibo.

Durante ogni procedura chirurgica, l'anestesia è stata indotta con il 5% di isoflurano in una mistura 30:70 di ossigeno e ossido nitroso (30:70 O<sub>2</sub>/N<sub>2</sub>O) e mantenuta successivamente ad una percentuale compresa tra 1,5 e 2%. La temperatura corporea è stata mantenuta a 37±0,5°C tramite un tappetino riscaldato.

Per l'induzione dell'ischemia della materia bianca, gli animali sono stati posizionati su un apparecchio stereotassico (Stoelting Co., USA) ed il cranio fissato saldamente mediante due barre laterali per le orecchie ed un morso frontale. Dopo aver rasato e disinfettato con betadina e etanolo 70% il sito chirurgico, è stata praticata un'incisione longitudinale in modo da rivelare le suture craniche (bregma e lambda) e quindi permettere la determinazione delle esatte coordinate. Una piccola (2x2 mm) *cranial window* è stata quindi creata, sotto costante raffreddamento con soluzione salina, utilizzando un trapano elettrico per microchirurgia (FHC, USA) e ponendo particolare attenzione a non danneggiare le meningi cerebrali ed i vasi dei seni sagittali che decorrono paralleli alle suture craniche. Sono state quindi effettuate tre microiniezioni del vasocostrittore endotelina-1 (American Peptide, USA) nel corpo

calloso alle seguenti coordinate: Antero-posteriore + 0.50, + 0.90, + 1.30 mm dal Bregma; Medio-laterale - 0.15 mm dal Bregma; Dorso-ventrale - 2.20 mm dalla superficie della dura mater. Le iniezioni sono state effettuate con un angolo di 36° in modo da seguire l'orientamento degli assoni ed evitare danni di tipo meccanico nel corpo calloso.

L'endotelina-1 (1 e 0.3 mg/mL) è stata solubilizzata in soluzione salina sterile ed iniettata al volume di 120 nL per sito d'iniezione, come riportato da Sozmen e colleghi (2009). Le iniezioni sono state effettuate utilizzando micropipette (diametro della punta tra 20 e 30 µm, WPI, USA) precedentemente preparate utilizzando un puller automatico (Sutter Instruments Inc., USA). Le micropipette sono state collegate ad un sistema di iniezione a pressione (Picospritzer, General Valve, USA) e quindi allo stereotassico tramite un *pipette holder*. Le iniezioni sono state effettuate ad una pressione compresa tra 20 e 40 psi e con una durata di apertura della valvola pneumatica compresa tra 5 e 30 msec. Per determinare accuratamente il volume iniettato è stato impiegato un micrometro ottico collocato nell'oculare dello stereomicroscopio. Dopo ogni iniezione, la pipetta è stata mantenuta in sito per 5', quindi estratta molto lentamente per evitare fenomeni di reflusso. Al termine della procedura, lo scalpo è stato suturato con seta chirurgica 4/0 e disinfettato con betadina e alcool 70%. L'anestetico bupivacaina (0.1 mg/Kg, s.c) è stato somministrato localmente per alleviare il dolore post-operatorio. Gli animali sono stati successivamente posti in un incubatore settato a 28°C per due ore e quindi nelle loro gabbie con cibo ed acqua *ad libitum*.

## Processazione dei tessuti

Gli animali sono stati anestetizzati e sacrificati a determinati intervalli dall'induzione dell'ischemia mediante perfusione intracardiaca con 10 mL di soluzione salina, quindi

decapitati ed il cervello congelato rapidamente in isopentano alla temperatura di -40°C. Sezioni coronali dello spessore di 20 µm sono state ottenute mediante l'impiego di un criostato. Le sezioni sono state montate su vetrini portaoggetto e conservate a -80°C fino al momento dell'utilizzo.

### Istologia e valutazione della degenerazione mielinica

Per le analisi istologiche, le sezioni sono state processate in modo da evidenziare il danno alla mielina e l'infiltrazione leucocitaria mediante la colorazione di Kluver-Barrera (Luxol Fast Blue - Cresyl Violet, LFB-CV) e l'ematossilina-eosina (H&E). Le sezioni sono state quindi visualizzate al microscopio ed acquisite mediante il programma di imaging ImageJ (versione 3.12, NIH, USA). Per l'analisi della degenerazione mielinica, le sezioni sono state colorate con il Luxol Fast Blue quindi digitalizzate mediante uno scanner ad alta definizione (Nikon, USA) e convertite in formato scala di grigio tramite il programma ImageJ.

### Immunofluorescenza e valutazione del danno assonale

La perdita assonale, la gliosi reattiva e l'infiltrazione monocito/macrofagica nel sito dell'ischemia sono state valutate tramite la tecnica di *immunostaining* con anticorpi specifici.

Per quantificare il danno alle fibre assoniche nel corpo calloso le sezioni coronali precedentemente ottenute sono state incubate con un anticorpo primario specifico per un antigene presente nel citoplasma dei neurofilamenti ad alto peso molecolare (NF200). Le

sezioni sono state fissate in etanolo per 10', reidratate in PBS, bloccate per 30' con una soluzione contenente 0.3% TritonX-100 e 10% *donkey serum*, quindi incubate per 60' con l'anticorpo primario rabbit anti-NF200 (1:200 in 3% donkey serum/PBS, Sigma, USA). Le sezioni sono state lavate per eliminare l'eccesso di anticorpo primario e quindi incubate per 60' con l'anticorpo secondario *donkey anti-rabbit* FITC-coniugato (1:200 in PBS, Jackson ImmunoResearch, USA). Infine, le sezioni sono state lavate nuovamente, incubate per 10' con Hoechst 33342 (1:1000 in PBS, Invitrogen, USA) e quindi montate con vetrini coprioggetto e conservate a + 4°C. Le immagini sono state acquisite tramite un microscopio dotato di illuminazione ad epifluorescenza ed il programma ImageJ, utilizzando ogni volta lo stesso ingrandimento (100X) e lo stesso tempo di esposizione (5").

L'astrogliosi e l'infiltrazione dei macrofagi nel corpo calloso sono state studiate utilizzando rispettivamente un anticorpo rivolto verso GFAP (Glial Fibrillary Acidic Protein) e un anticorpo specifico per l'antigene di membrana CD68 espresso da microglia e macrofagi. Le sezioni coronali sono state fissate in acetone per 10', reidratate in PBS, bloccate per 30' con una soluzione contenente 10% *donkey serum*, quindi incubate per 60' con l'anticorpo primario *rabbit anti-CD68* (1:200 in 3% donkey serum/PBS, AdB Serotec, USA). Le sezioni sono state lavate per eliminare l'eccesso di anticorpo primario e quindi incubate per 60' con l'anticorpo secondario *donkey anti-rabbit* FITC-coniugato (1:200 in PBS, Jackson ImmunoResearch, USA). Le sezioni sono state quindi incubate per 60' con l'anticorpo primario mouse anti-GFAP Cy3-coniugato (1:400 in PBS, Sigma, USA) e quindi lavate per rimuovere l'eccesso di anticorpo. Infine, le sezioni sono state incubate per 10' con Hoechst 33342 (1:1000 in PBS, Invitrogen, USA) e quindi montate con vetrini coprioggetto e conservate a + 4°C. Le immagini sono state acquisite tramite un microscopio dotato di illuminazione ad epifluorescenza ed il programma ImageJ.

## Valutazione dell'integrità della barriera emato-encefalica

Per valutare l'integrità alla barriera emato-encefalica è stata impiegata la tecnica dell'Evans Blue. L'Evans Blue è un colorante capace di emettere fluorescenza (picco di eccitazione a 540 nm ed emissione a 680 nm) quando lega l'albumina serica, e per questo viene impiegato per tracciare la fuoriuscita delle proteine dai vasi nel parenchima cerebrale quando la barriera emato-encefalica è danneggiata. L'Evans Blue è stato solubilizzato in soluzione salina sterile alla concentrazione di 2% ed iniettato tramite la vena caudale alla dose di 4mL/Kg. Le iniezioni sono state effettuate immediatamente dopo l'ischemia ed i topi sacrificati dopo 4 ore dalla somministrazione del colorante, in modo da permettere la massima penetrazione nei tessuti. Gli animali sono stati sacrificati come riportato in precedenza ed i cervelli sezionati al criostato in modo da ottenere sezioni coronali.

L'extravasazione è stata valutata qualitativamente tramite un microscopio dotato di illuminazione ad epifluorescenza e le immagini acquisite mediante il programma ImageJ.

## Iniezione intracerebrale di Hoechst 33342

Il composto bis-benzamide (Hoechst 33342) è un colorante che emette fluorescenza quando si lega alle molecole di DNA (eccitazione/emissione 352/461 nm), marcando quindi i nuclei delle cellule. L'Hoechst è stato iniettato nel corpo calloso assieme all'endotelina-1 con il duplice intento di confermare il corretto sito di iniezione ed inoltre di evidenziare le aree cerebrali raggiunte dagli assoni presenti nel territorio ischemico.

L'Hoechst è stato iniettato alla concentrazione di 0.4 mg/mL in soluzione salina, quindi gli animali sacrificati dopo 2 e 7 giorni come descritto in precedenza e le sezioni

coronali analizzate tramite un microscopio dotato di illuminazione ad epifluorescenza e le immagini acquisite mediante il programma ImageJ. Per studiare l'interruzione delle reti neuronali dopo il danno alla materia bianca l'Hoechst è stato iniettato 6 giorni dopo l'iniezione di endotelina nel corpo calloso controlaterale alla lesione.

### Valutazione dei deficit neurologici

I deficit neurologici sono stati valutati mediante l'impiego di specifici test comportamentali per la determinazione delle disfunzioni sia cognitive che motorie.

Tutti i test sono stati effettuati in una stanza espressamente dedicata allo studio del comportamento con luminosità e temperatura controllate e allo stesso orario (2 PM - 7 PM) in modo da escludere possibili differenze dovute ai fattori esterni o al ritmo circadiano. Gli animali sono stati prima abituati al contatto con il ricercatore e alla stanza e quindi sottoposti ad una prima batteria di test per definire le condizioni basali (baseline, d=-1). 7 giorni dopo l'induzione dell'ischemia gli animali sono stati sottoposti nuovamente alla stessa batteria di test (post-ischemia, d=7), nello stesso ordine, e quindi sacrificati per ottenere i campioni istologici. Tutte le sessioni dei test sono state registrate per mezzo di una videocamera ad alta definizione (Sony, USA) ed i video analizzati in slow-motion mediante il programma Kinovea (USA) da un investigatore non a conoscenza dei gruppi sperimentali.

Per determinare i deficit motori sono stati utilizzati il test del cilindro (cylinder test) e della griglia (grid-walking test), che si sono dimostrati essere molto sensibili nel rivelare anche leggeri deficit neurologici in modelli murini di *stroke* (Baskin et al. 2003; Tennant & Jones 2009). Per il *cylinder test* il topo è collocato in un cilindro trasparente e registrato per 5'. L'ambiente ristretto e nuovo stimola l'animale a sollevandosi sulle zampe posteriori per

esplorare le pareti del cilindro con le zampe anteriori. Il numero di volte che il topo tocca le pareti del cilindro con ogni zampa viene registrato e comparato con il numero totale delle esplorazioni per estrapolare la percentuale di esplorazioni per ogni zampa e l'indice di asimmetria, calcolato con la formula: % esplorazioni zampa destra / % esplorazioni zampa sinistra. Per il *grid-walking test* il topo è collocato su una griglia metallica (20 cm x 30 cm) sollevata un metro da terra e registrato per 5'. Il topo percorre la griglia ed il numero di volte che commette un passo falso mettendo una zampa in un anello della griglia viene registrato per determinare il numero totale di passi falsi, la percentuale e l'indice di asimmetria, calcolato con la formula: % passi falsi zampa sinistra / % passi falsi zampa destra.

Per l'analisi dei deficit cognitivi è stato utilizzato il *Novel Object Recognition Test* (NORT), estremamente impiegato per quantificare i deficit cognitivi in modelli animali di malattia di Alzheimer e che si è dimostrato capace di evidenziare i deficit cognitivi in topi soggetti a ischemia della materia bianca (Yoshizaki et al. 2008). Il NORT si basa sulla naturale tendenza degli animali ad esplorare maggiormente un oggetto non-familiare rispetto ad un oggetto che già conoscono. Il NORT prevede infatti una prima sessione durante la quale il topo viene esposto a due oggetti identici (A e B) per forma e dimensioni (exploration), ed una seconda fase (recognition) in cui il topo esplora uno degli oggetti familiari della prima fase (B) ed un nuovo oggetto, delle stesse dimensioni ma di forma e colore differente (C). Ogni fase ha la durata di 5', e l'intervallo tra le due sessioni è di un ora. Il tempo che l'animale spende esplorando ogni oggetto durante le due sessioni viene registrato ed utilizzato per calcolare il *discrimination index*, secondo la formula: tempo speso per esplorare oggetto A o C / tempo speso per esplorare oggetto B.

## Capitolo 3 - Risultati

### *3.1 Ipotermia terapeutica ed AMP*

La somministrazione sistemica di AMP riduce la temperatura corporea in modo dose-dipendente

Il primo obiettivo della nostra ricerca è stato quello di studiare l'entità e la cinetica della variazione della temperatura corporea in seguito alla somministrazione di AMP. Con questo scopo, l'AMP è stato iniettato intraperitonealmente in topi C57BL/6J adulti e la temperatura misurata ogni 10' dalla somministrazione mediante una sonda rettale connessa ad un sistema omeotermico per il controllo della temperatura. Come riportato in Fig.1, la somministrazione di AMP determina una riduzione della temperatura in maniera dose-dipendente. La dose minima efficace è risultata essere 50 mg/Kg ed è stata per questo scelta come dose di riferimento per il continuo dello studio. In seguito alla somministrazione di AMP gli animali riducono l'attività locomotoria e sospendono le normali attività di esplorazione nella gabbia, entrando gradualmente in uno stato simile alla sedazione sempre più marcato con l'aumentare delle dosi. Anche in questo caso, i maggiori effetti si sono riscontrati alle dosi più elevate (100, 250 e 500 mg/Kg), mentre alle dosi di 25 e 50 mg/Kg tali effetti sono molto limitati e comprendono solo una ridotta attività esplorativa. Per tutte le dosi efficaci, l'effetto dell'AMP è molto rapido, e raggiunge nella maggior parte dei casi, con l'eccezione della dose massima testata 500 mg/Kg, il picco massimo dopo 20' dalla somministrazione mentre i valori di temperatura tornano normali dopo 40-60'.

L'AMP riduce la temperatura corporea agendo a livello ipotalamico

Per individuare il sito d'azione dell'AMP sono state effettuate delle somministrazioni intracerebroventricolari, ipotizzando che la sua azione potesse essere principalmente a livello centrale. I risultati hanno infatti confermato la nostra ipotesi. Come riportato in Fig.2, infatti, la somministrazione di AMP riduce in maniera dose-dipendente la temperatura corporea, con una curva dose-risposta molto simile a quella precedentemente ricavata in seguito alla somministrazione sistemica. In questo caso, però, la cinetica della reazione ipotermica è molto più veloce. Infatti, il massimo effetto ipotermizzante si ottiene già dopo 10', mentre per la stabilizzazione a valori fisiologici di temperatura sono sempre necessari circa 50-60'. È da riportare una leggera riduzione della temperatura anche negli animali trattati con il veicolo, molto probabilmente dovuta alla breve anestesia necessaria per effettuare la somministrazione.

Si è cercato ancora di fare un ulteriore passo avanti nella comprensione del sito d'azione, testando l'effetto della somministrazione di AMP direttamente nell'ipotalamo, ed in particolare nella porzione anteriore dello stesso, deputata al controllo dei processi termoregolatori. La Fig.3 mostra l'andamento di questa riduzione. L'AMP riduce molto rapidamente la temperatura corporea, raggiungendo il picco già dopo 10'. Nello stesso contesto sperimentale è stata anche testata l'Adenosina, ipotizzando per entrambi un medesimo sito d'azione. A differenza dell'Adenosina però, che determina anch'essa una riduzione della temperatura già dopo 10', l'azione dell'AMP è più duratura, effetto probabilmente dovuto al fatto che l'AMP agisce sulla temperatura sia direttamente che indirettamente dopo la sua degradazione ad Adenosina. Questo concetto sarà ripreso e investigato in seguito.

L'AMP esercita la sua azione ipotermizzante tramite il legame ai recettori adenosinici del sistema nervoso centrale

Sulla base delle nostre ipotesi e di quanto riportato in letteratura, abbiamo voluto dimostrare che l'azione ipotermizzante dell'AMP viene esercitata tramite il legame con i recettori adenosinici presenti a livello centrale. È stato quindi utilizzato l'antagonista selettivo dei recettori adenosinici di tipo 1 (AR1), l' 8-Cyclopentyl-1,3-dipropylxanthine (DPCPX). In Fig.4 viene mostrato come il DPCPX, somministrato 20' prima dell'AMP, mitighi la riduzione della temperatura AMP-mediata. Delle due dosi testate (0.1 e 1 mg/Kg), la più bassa ha riportato essere, anche se leggermente, la più efficace nell'antagonizzare gli effetti dell'AMP sulla temperatura, probabilmente a causa di un effetto agonista-antagonista del DPCPX. Nonostante la riduzione del volume di iniezione a 50  $\mu$ L, non è stato possibile evitare gli effetti ipotermizzanti del DMSO, veicolo del DPCPX.

Successivamente abbiamo cercato di dimostrare che il legame dell'AMP ai recettori adenosinici avviene a livello centrale, per cui è stato utilizzato l'inibitore non selettivo AR 8-(p-Sulfophenyl) theophylline (8-SPT). La caratteristica di questo composto è che non può attraversare la barriera ematoencefalica, quindi, somministrandolo in periferia per via intraperitoneale e centralmente per via intracerebroventricolare è stato possibile dimostrare a che livello l'AMP si legasse. Come riportato in Fig.5,a, infatti, il pretrattamento con 8-SPT somministrato intraperitonealmente riduce solo in parte l'effetto sulla temperatura corporea AMP-dipendente. La completa reversione dell'effetto dell'AMP si è registrata invece in seguito al pretrattamento con 8-SPT somministrato per via intracerebroventricolare (Fig5,b), a dimostrazione della nostra originaria teoria che l'AMP si legasse ai recettori adenosinici nel sistema nervoso centrale.

L'AMP modula la temperatura corporea in maniera diretta e non tramite la sua conversione in Adenosina

Abbiamo cercato di dimostrare, quindi, se l'azione dell'AMP fosse mediata dalla sua conversione in Adenosina o dal suo legame diretto con il recettore A1. Poiché la degradazione dell'AMP in Adenosina è mediata dall'enzima ecto-5'-Nucleotidasi che scinde il gruppo fosfato dai nucleotidi, liberando i risultanti nucleosidi, abbiamo utilizzato un inibitore altamente selettivo di questo enzima per bloccarne l'attività. Come riportato in Fig.6,a la somministrazione dell'inibitore *Adenosine methylene diphosphate* (AMPCP) non riduce l'effetto ipotermizzante dell'AMP, anzi lo potenzia. L'azione diretta dell'AMPCP sulla temperatura è meglio evidenziata nella Fig.6,b.

La somministrazione di AMP riduce il volume di infarto in seguito a MCAo in maniera temperatura-dipendente

Definita l'attività dell'AMP sulla temperatura e chiaritone la cinetica, abbiamo cercato di applicare l'ipotermia AMP-indotta ad un protocollo neuroprotettivo in un modello animale di occlusione transiente dell'arteria cerebrale media. Come riportato in Fig.7,a e Fig.7,b la somministrazione di AMP durante il periodo di ischemia, e la conseguente riduzione della temperatura nel *range* neuroprotettivo 34-35°C, ha determinato una drastica riduzione delle aree e del volume di infarto. Il protocollo terapeutico scelto è stato disegnato in modo tale da mimare una condizione di intervento acuto in seguito al manifestarsi dei segni clinici dell'ischemia. Abbiamo dimostrato inoltre che l'effetto neuroprotettivo dell'AMP non può verificarsi nel caso in cui la temperatura corporea venga mantenuta ai valori fisiologici (38°C), per cui l'azione benefica dell'AMP sullo *stroke* non può prescindere dal suo effetto ipotermizzante.

## **Legend to Figures**

### **Figure 1. Effect of AMP administration (i.p.) on body temperature**

AMP (25, 50, 100, 250, 500 mg/Kg) or Vehicle (PBS) were administrated intraperitoneally and temperature variations recorded for 60'.

### **Figure 2. Effect of AMP administration (ICV) on body temperature**

AMP (30, 100, 300 ug) or Vehicle (PBS) were administrated intracerebroventricularly and temperature variations recorded for 90'.

### **Figure 3. Effect of AMP administration (intra-hypothalamic) on body temperature**

AMP (30 ug), Adenosine (30 ug) or Vehicle (PBS) were administrated intra-hypothalamicly and temperature variations recorded for 90'.

### **Figure 4. DPCPX antagonizes AMP-dependent temperature reduction**

DPCPX (0.1, 1 mg/Kg) or Vehicle (DMSO) were injected intraperitoneally 20' before AMP (50 mg/Kg) administration, and temperature variations recorded for 90'. \*\*, \*\*\* and ### 2-ways ANOVA plus Bonferroni's post hoc test.

### **Figure 5. AMP acts on SNC adenosine receptors**

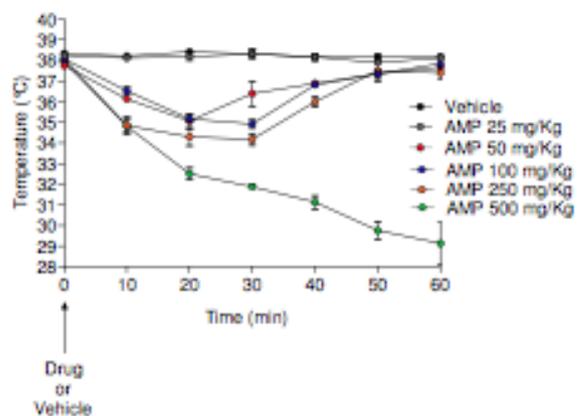
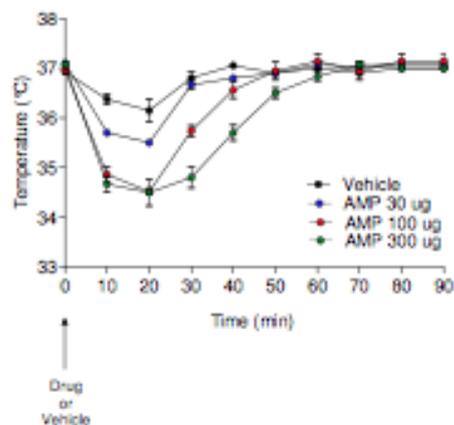
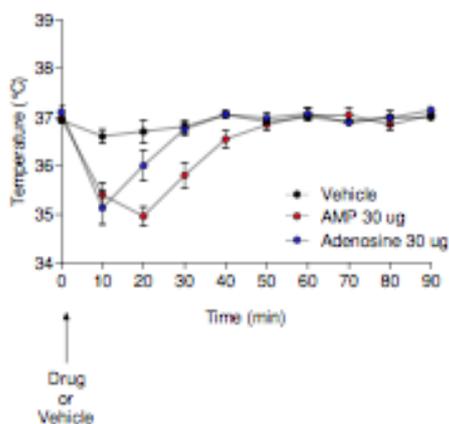
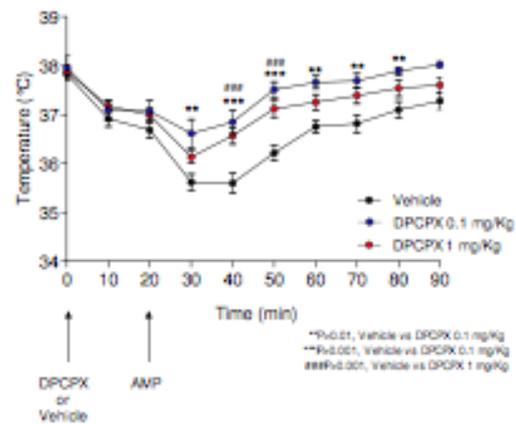
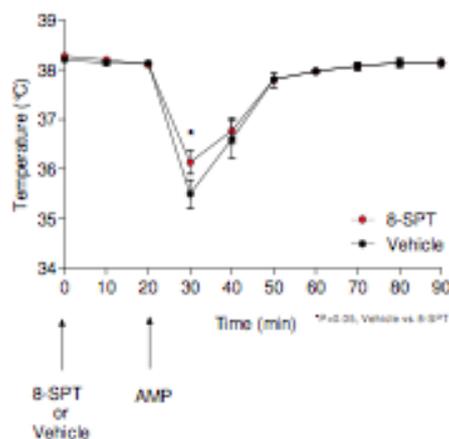
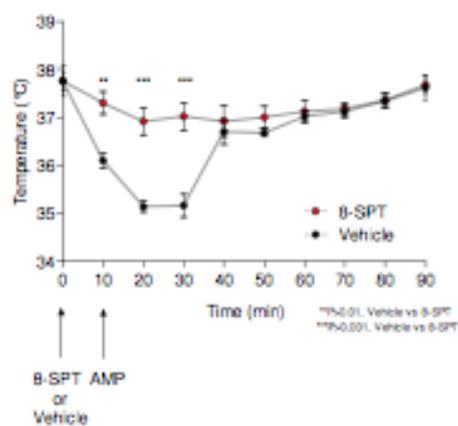
8-SPT or Vehicle (PBS) were administrated i.p. (30 mg/Kg, Fig.5,a) and ICV (50 ug, Fig.5,b) before AMP (50 mg/Kg) injection, and temperature variations recorded for 90'. \*, \*\* and \*\*\* 2-ways ANOVA plus Bonferroni's post hoc test.

**Figure 6. AMP effect is not blocked by AMPCP administration**

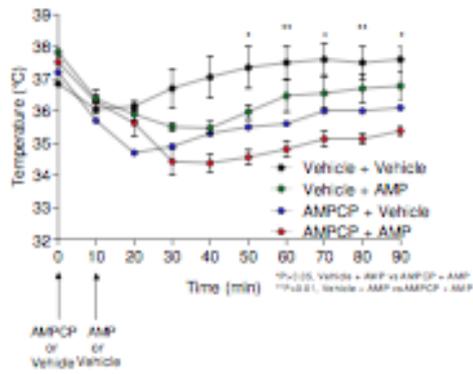
Fig.6,a. AMPCP (50 ug) or Vehicle (PBS) were injected ICV 10' before AMP (50 ug) or Vehicle (PBS) ICV administration, and temperature variations recorded for 90'. \* and \*\* 2-ways ANOVA plus Bonferroni's post hoc test. Fig.6,b. AMPCP (10, 50, 100 ug) or Vehicle (PBS) were injected ICV and temperature variations recorded for 90'.

**Figure 7. AMP-dependent hypothermia reduces infarct size in a mouse model of MCAo**

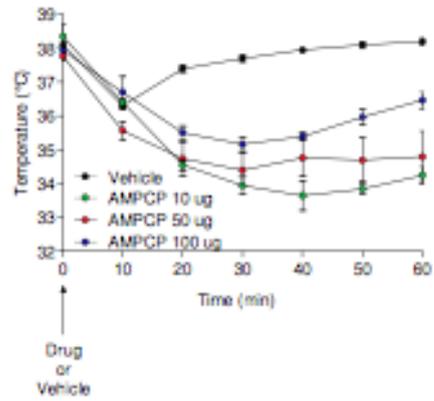
Ischemic areas (7,a) and volumes (7,b) of mice underwent 90' MCAo and 24 h of reperfusion. \* and # 1-way ANOVA plus Tukey's post hoc test.

**Fig.1****Fig.2****Fig.3****Fig.4****Fig.5,a****Fig.5,b**

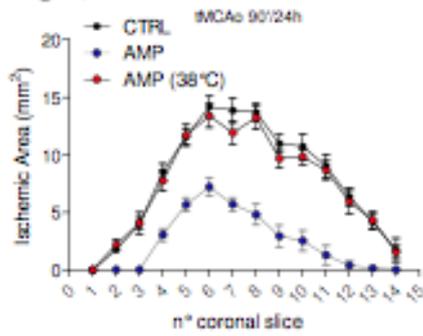
**Fig.6,a**



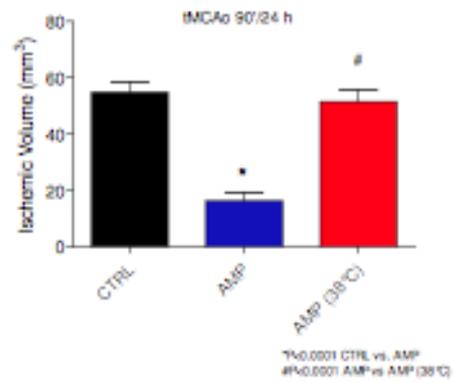
**Fig.6,b**



**Fig.7,a**



**Fig.7,b**



### 3.2 Tolleranza ischemica e PARP

Il preconditionamento ha effetto neuroprotettivo su un successivo insulto ischemico

Al fine di identificare il migliore modello neuroprotettivo per lo studio dell'IPC, gli animali sono stati esposti a differenti insulti ischemici 24 h dopo l'induzione del *preconditioning* (Fig. 1a). In particolare è stato visto che 5' di BCCAO non hanno alcun effetto neuroprotettivo su protocolli con 2 h MCAo ( $74\pm 2$  negli Sham e  $69\pm 8$  mm<sup>3</sup> negli animali preconditionati; n = 5/gruppo; not shown) o 1 h MCAo ( $57\pm 7$  negli Sham e  $55\pm 8$  mm<sup>3</sup> negli animali preconditionati; n = 5/gruppo; not shown); l'IPC seguito da 30' MCAo invece è stato visto avere una leggera tendenza neuroprotettiva ( $46\pm 8$  negli Sham e  $39\pm 9$  mm<sup>3</sup> negli animali preconditionati; n = 8/gruppo; Fig. 1b, c) e conferire una significativa neuroprotezione in un modello di 20' MCAo/72 Rep ( $27\pm 3$  negli Sham e  $10\pm 0.8$  mm<sup>3</sup> negli animali preconditionati; n = 8/gruppo; Fig. 1d, e). L'effetto protettivo è stato riscontrato sia nella valutazione in toto dei volumi di infarto che esclusivamente a livello corticale e striatale (Fig.1e).

Effetto dell'inibizione farmacologica di PARP-1 durante l'induzione dell'IPC

Per comprendere il ruolo dell'attività PARP-1 nei meccanismi di innesco del *preconditioning*, è stato somministrato il potente PARP inibitore PJ34 nella finestra temporale compresa tra la BCCAO e la MCAo alla dose ed ai tempi descritti nella sezione metodi. La somministrazione del PJ34 non ha mostrato effetti su parametri fisiologici quali temperatura, pressione, pH ematico, PaO<sub>2</sub>, PaCO<sub>2</sub> e peso. Il trattamento con PJ34 non ha

determinato alcun cambiamento nei volumi di infarto negli animali preconditionati ( $10 \pm 1,7$  mm<sup>3</sup>; n = 10/gruppo; Fig 1d, e) né tantomeno differenze a livello della distribuzione del territorio preconditionato (Fig. 1f). Per escludere eventuali fenomeni di carryover del farmaco sia durante che dopo la MCAo, il PJ34 è stato somministrato in topi naïve alla stessa dose (20 mg/Kg, i.p.) 24 h, 16 h e 8 h prima di 20' MCAo. I volumi di infarto, valutati sempre dopo 72 h di riperfusione, non sono risultati essere statisticamente differenti ( $25 \pm 5$  nei controlli e  $23 \pm 6$  mm<sup>3</sup> negli animali pretrattati; n = 5/gruppo; *not shown*).

#### Effetti dell'IPC su PAR, NAD, ATP, Caspasi-3 e PARP-1

Dopo aver dimostrato che l'inibizione della PARP-1 non ha effetti sui meccanismi dell'IPC, sono stati valutati nel tessuto preconditionato i livelli di Poli(ADP-ribosio)(PAR), prodotto diretto dell'attività della PARP. Come riportato in Fig. 2a e b, il contenuto striatale di PAR non varia significativamente in seguito all'induzione dello stimolo preconditionante né tantomeno in seguito al pretrattamento degli animali con PJ34. I livelli di PAR non subiscono variazioni anche dopo tempi più lunghi (10 - 15') di BCCAo, seguiti da 30' di riperfusione (Fig. 2c e d).

Come ulteriore evidenza è stata misurata la quantità di NAD, substrato della PARP nel processo di formazione del PAR. Nel tessuto preconditionato è stata riscontrata solo una lieve tendenza, non significativa, alla riduzione dei livelli di NAD dopo BCCAo 5' e nei successivi 15' di riperfusione (Fig. 2e). A differenza del NAD, l'ischemia di 5' causa una netta deplezione dei livelli striatali di ATP, che tornano a valori basali in seguito alla riperfusione (Fig. 2f).

La valutazione dell'attività della Caspasi-3 è riportata in Fig. 2g, h e i. Tramite metodologia *Western Blotting* non è stata evidenziata alcuna alterazione dei livelli del frammento clivato a 17 kDa della Caspasi-3, a dimostrazione che in seguito a BCCAO 5' non si verifica un significativo clivaggio della proteina. Per avvalorare questo dato è stata misurata anche l'attività della Caspasi-3 mediante l'impiego di un kit fluorimetrico; sorprendentemente, nessun incremento dei livelli di Caspasi-3 è stato riscontrato nella finestra temporale compresa tra l'induzione dell'IPC e la MCAo.

Per dimostrare che la PARP-1 non viene clivata in seguito ad IPC è stato impiegato un anticorpo altamente specifico per il frammento clivato dell'enzima; come riportato in Fig.2 l, durante il preconditionamento non si assiste ad un incremento del frammento a 89kDa, a testimonianza dell'integrità funzionale dell'enzima al momento della successiva ischemia.

La delezione genica della PARP-1 non influisce sull'effetto neuroprotettivo dell'IPC

Per avere un'ulteriore conferma che la PARP-1 non è coinvolta nei meccanismi di IPC in questo modello sperimentale sono stati impiegati dei topi transgenici con una delezione specifica del gene PARP-1. Come ci aspettavamo, è stato visto che anche in assenza del gene PARP-1 il preconditionamento cerebrale può avvenire (Fig. 3a, b); infatti, mentre nei topi Sham PARP-1<sup>-/-</sup> il volume di infarto è di  $19 \pm 2 \text{ mm}^3$  (n = 6), nei topi PARP-1<sup>-/-</sup> preconditionati il valore è considerevolmente ridotto ( $9 \pm 1,6 \text{ mm}^3$ ; n = 7).

## Legend to Figures

### Figure 1. Effect of PJ34 on brain IPC

(a) Schematic representation of the different experimental protocols. Ischemic areas (b) and volumes (c) of control and preconditioned (PC, 5 min BCCAO/30 min MCAO) mice. Ischemic areas (d) and volumes (e) of control, preconditioned (PC, 5 min BCCAO/20 min MCAO), and preconditioned plus PJ34 mice. PJ34 was injected at 20 mg/kg i.p. after BCCAO and 8 and 16 hrs later. (f) Infarct areas in coronal section of control, preconditioned (PC) and preconditioned plus PJ34 mice. \*\*\* $p < 0.001$  vs Control. ANOVA plus Tukey's post hoc test.

### Figure 2. Effects of BCCAO on PAR, PARP-1 and NAD/ATP in the mouse striatum.

Effect of 5 min BCCAO  $\pm$  10-30 min reperfusion (a) or 5-15 min BCCAO and 30 min reperfusion (REP) (c) on striatal PAR. (b) and (d) Densitometric evaluation of PAR content shown in control and preconditioned striatum. Effect of 5 min BCCAO $\pm$ 15 min reperfusion on NAD (e) and ATP (f) striatal content. In (a) basal brain PAR contents from a PARP-1 WT and KO are shown. The effect of a 60 min pretreatment with PJ34 20 mg/kg i.p. on NAD content in reperused mice is shown in (e). The effect of 5 min BCCAO and different times of reperfusion on levels of 17 kDa-Caspase-3, Caspase-3 activity and PARP-1 cleavage in the striatum are shown in (g), (i) and (l), respectively. (h) Densitometric evaluation of 17 kDa-caspase-3 in control and preconditioned striatum. In (l) PARP-1 expression in extracts from control or etoposide-treated (Eto) Jurkat cells (J. Cells) is shown as positive control of PARP-1 cleavage. An experiment representative of 3 or 2 is shown in (a, l) and (c, g), respectively. In (e), (f) and (i) columns represent the mean $\pm$ SEM of 3 experiments.

**Figure 3. Brain IPC in PARP-1 null mice.**

Ischemic areas (a) and volumes (b) of sham and preconditioned (PC, 5 min BCCAO/20 min MCAO) PARP-1<sup>-/-</sup> mice. \*\*\* $p < 0.001$  vs Control. Student's t-test.

# Figures

Fig. 1

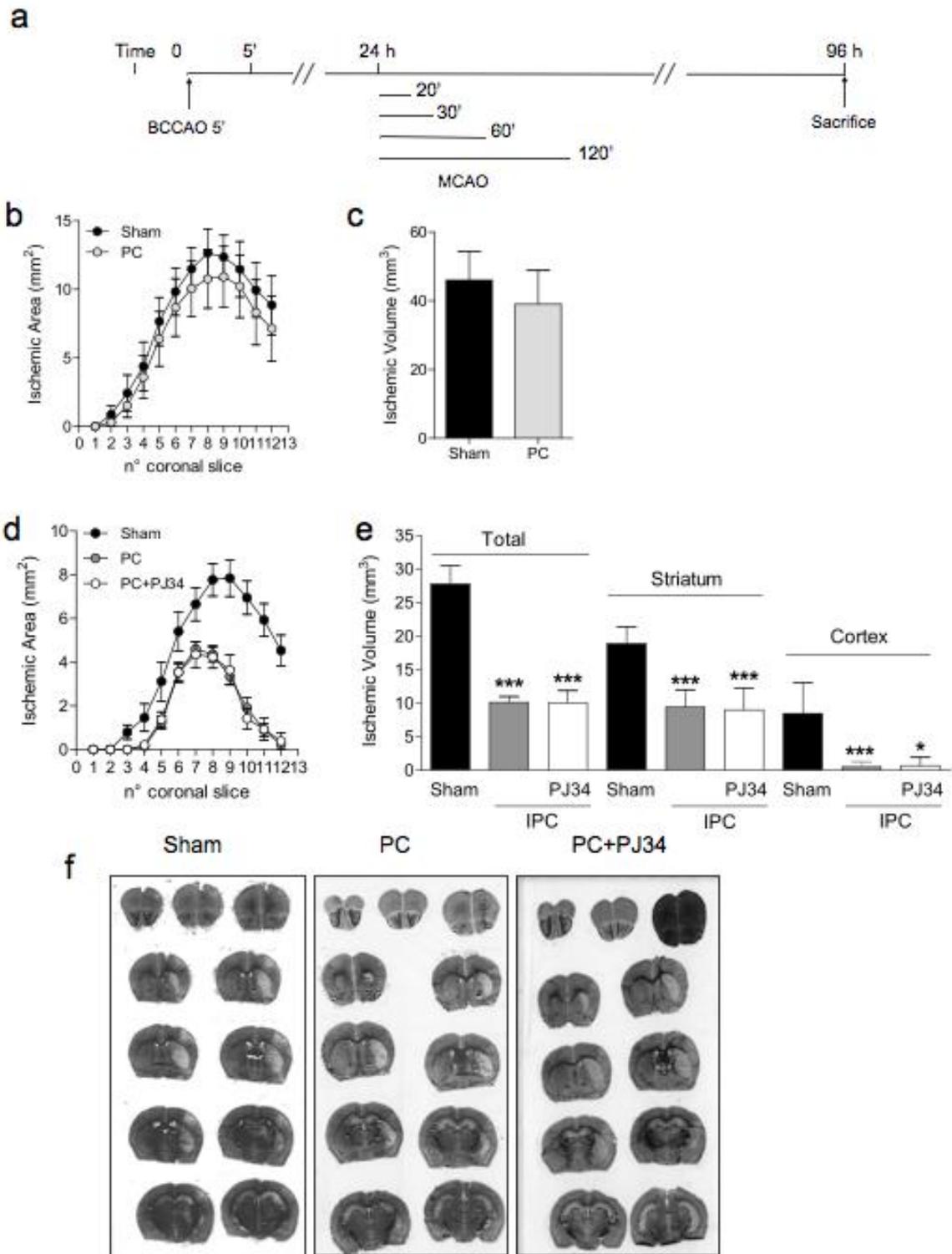


Fig. 2

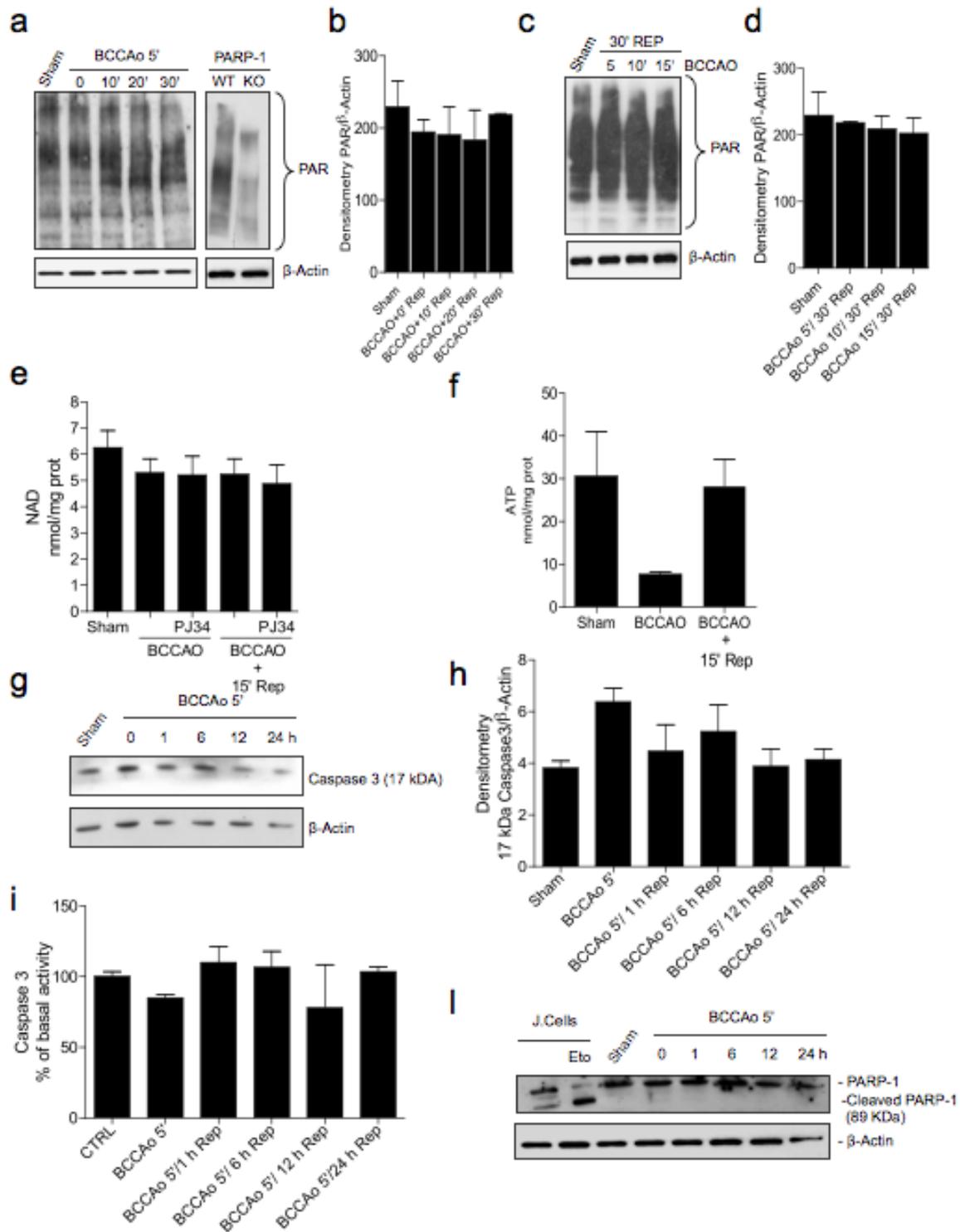
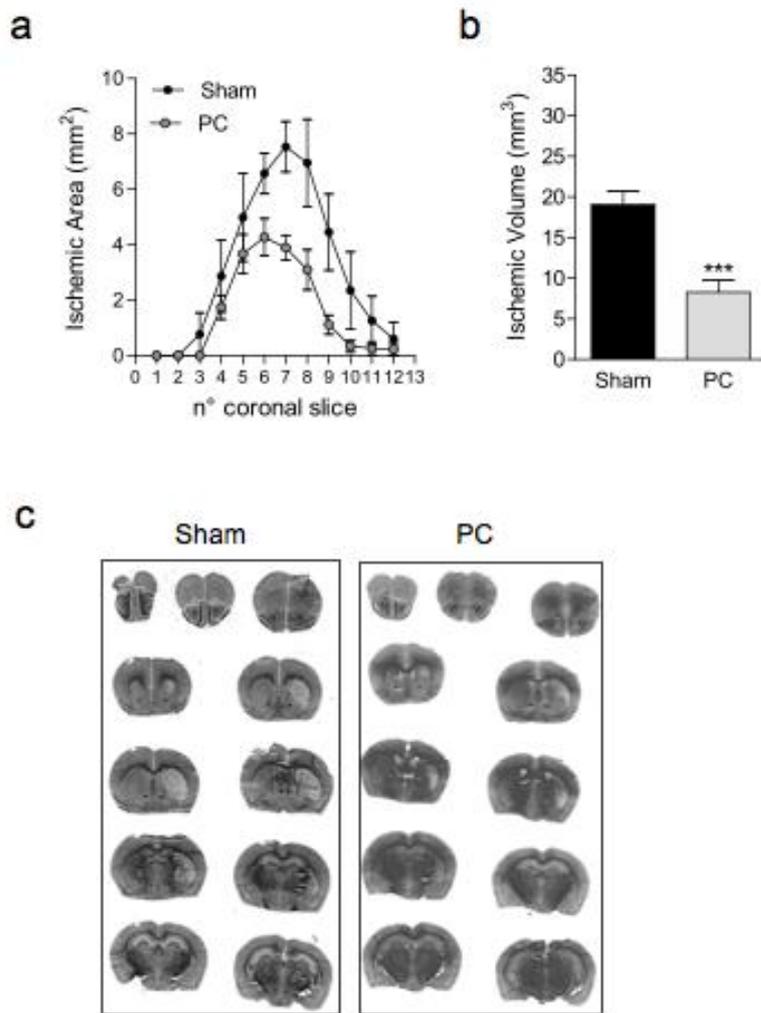


Fig. 3



### 3.3 Demenza vascolare e Small Vessel Disease

L'iniezione di endotelina-1 nella materia bianca sub-corticale riproduce le caratteristiche patologiche dello *stroke* lacunare

Il primo obiettivo del nostro lavoro è stato la caratterizzazione del modello animale e della lesione alla materia bianca sub-corticale. In seguito all'iniezione del potente vasocostrittore endotelina-1 direttamente nel corpo calloso si assiste ad una progressiva degenerazione della guaina mielinica (oligodendrociti) e delle fibre nervose (assoni). In particolare, a due giorni dall'iniezione la sostanza bianca appare già rarefatta, ma la lesione raggiunge la massima estensione solo dopo 5-7 giorni in concomitanza con il picco di infiltrazione cellulare nel sito dell'iniezione (Fig. 1a, b). Poiché la lesione dopo 7 giorni appare maggiormente riproducibile in termini di estensione e dimensioni, le successive analisi sono state effettuate a questo *time-point*. Estrema attenzione è stata posta nell'escludere un possibile danno meccanico alla sostanza bianca determinato dalle iniezioni per se e non dall'azione vasocostrittrice dell'endotelina. L'iniezione del solo veicolo (0.9% NaCl, sterile), come da noi ipotizzato, non determina nessuna alterazione istologica, a differenza dell'endotelina che causa un'evidente disorganizzazione della cito-architettura del corpo calloso e un'imponente infiltrazione cellulare (Fig. 1c, d). Per studiare la risposta della materia bianca a diverse intensità di stimolo sono state testate due concentrazioni di endotelina, 1 mg/mL e 0.3 mg/mL. L'iniezione di endotelina alla concentrazione 1 mg/mL determina una perdita massiccia delle fibre mieliniche nel sito ischemico ed una più estesa area di lesione, come rivela la colorazione di Kluver-Barrera (Fig. 1e), mentre la concentrazione più bassa (0.3 mg/mL) induce la rarefazione della mielina e la formazione di piccole lacune nel corpo calloso (Fig. 1f). Per ridurre al minimo l'interessamento delle aree di

materia grigia adiacenti al corpo calloso (corteccia cerebrale e corpo striato), la concentrazione 0.3 mg/mL è stata preferita per i successivi esperimenti.

Per studiare la degenerazione assonica è stato utilizzato un anticorpo selettivo rivolto verso i neurofilamenti (NF200). Come riportato in figura 2, all'area di demielinizzazione evidenziata dalla colorazione con LFB (a) corrisponde l'area di danno assonale (b, c), come dimostra la riduzione dello staining per NF200. Anche in questo caso, nelle lesioni lacunari si nota una marcata infiltrazione cellulare (d). Poichè nell'uomo lo *stroke* lacunare è caratterizzato da una reazione infiammatoria che coinvolge soprattutto astrociti e microglia/macrofagi, è stato studiato il profilo neuroinfiammatorio della lesione. Come già evidenziato con la colorazione H&E, 7 giorni dopo l'iniezione di endotelina il core della lesione mostra una marcata infiltrazione di cellule infiammatorie, che si sono dimostrate essere CD68 positive (Fig. 3a, b). La peri-infarct area presenta invece una gliosi reattiva, in particolare astrociti-GFAP positivi (Fig. 3c, d). Un aumento, anche se molto lieve, delle cellule GFAP-positive è presente anche nel corpo calloso controlaterale degli animali ischemici e nel corpo calloso ipsi- e controlaterale degli animali a cui è stato iniettato il veicolo, mentre nessuna cellula CD68-positiva è stata riscontrata (not shown).

Lo *stroke* sub-corticale induce deficit motori e cognitivi: effetto dell'interruzione delle reti neurali

La perdita delle funzionalità neurologiche in seguito allo *stroke* della materia bianca è stata valutata mediante l'impiego di specifici test per il rilevamento dei deficit motori (Cylinder test e Grid-walking test) e cognitivi (Novel Object Recognition Test).

Il test del cilindro misura l'impiego delle zampe anteriori nell'attività esploratoria. Gli animali mostrano chiari segni di preferenza nell'utilizzo della zampa ipsilaterale alla lesione (destra) 7 giorni dopo l'iniezione di endotelina nella materia bianca, a testimoniare uno scompenso motorio della zampa controlaterale. La preferenza nell'utilizzo della zampa destra risulta statisticamente significativa se comparata con il valore basale registrato dallo stesso gruppo di animali un giorno prima della chirurgia (Fig. 4a).

Il test della griglia rileva difetti della coordinazione e del piazzamento delle zampe durante una normale attività quotidiana (camminare ed esplorare una superficie). Gli animali mostrano un'aumentata tendenza a commettere errori ed inciampare negli anelli della griglia 7 giorni dopo l'iniezione di endotelina, in maniera statisticamente significativa se comparati con i valori basali (Fig. 4b, c). Inoltre, il numero di errori commessi con la zampa sinistra si sono rivelati essere maggiori degli errori commessi con la destra, rivelando un'asimmetria nel comportamento non riscontrata durante la registrazione dei valori basali (Fig. 4d).

Il NORT consente di evidenziare deficit cognitivi mediante la valutazione della capacità degli animali di ricordare gli oggetti precedentemente esplorati e mostrare maggiore interesse verso un oggetto mai incontrato in precedenza. Mentre prima della lesione nel corpo calloso gli animali mostrano un maggiore interesse verso un oggetto mai esplorato rispetto quelli familiari, 7 giorni dopo la lesione tale preferenza viene persa (Fig. 4e).

Il composto Hoechst 33342 è stato utilizzato per tracciare le connessioni neurali ed evidenziare eventuali interruzioni nella trasmissione dovuti alla lesione alla materia bianca.

L'iniezione di Hoechst (0.4 mg/mL) nella sostanza bianca rivela diverse proiezioni sia corticali (interemisferiche) che sottocorticali (intraemisferiche), che interessano in particolare la corteccia motoria e somatosensoriale (Fig. 5a). L'iniezione di Hoechst nell'area del corpo calloso controlaterale alla lesione rivela invece l'interruzione delle connessioni cortico-

corticali interemisferiche, mentre le connessioni con le aree sub-corticali intraemisferiche rimangono intatte (Fig. 5b).

L'ischemia della materia bianca determina l'aumento della permeabilità della barriera emato-encefalica

La somministrazione di Evans Blue (4 mg/mL, 2%, i.v.) immediatamente dopo l'iniezione di endotelina nel corpo calloso permette di determinare le conseguenze dell'ischemia della materia bianca sulla permeabilità della barriera ematoencefalica (BBB). 4 ore dopo l'inizio dell'ischemia, la BBB appare danneggiata, come rivela l'extravasazione del colorante nel parenchima cerebrale (Fig. 6a). Gli animali controllo (iniezione del veicolo nel corpo calloso) invece non mostrano extravasazione dell'Evans Blue nel corpo calloso, ma solo nelle aree del cervello dove la BBB è fisiologicamente meno impermeabile (Fig. 6b).

## Legend to Figures

### **Figure 1. Sub-cortical white matter stroke: histological analysis.**

Coronal sections stained using Luxol Fast Blue - Cresyl Violet (LFB-CV) show the progression of the lesion after 2 days (a) and 7 days (b). Hematoxylin & Eosin (H&E) staining shows the cellular infiltration into the *core* of the lesion in endothelin-injected mice (c) and the absence of mechanical damage in vehicle-injected animals (d). LFB-CV staining reveals the different extent of demyelination and cellular infiltration induced injecting endothelin 1 mg/mL (e) and endothelin 0.3 mg/mL (f). n = 6-7/group.

### **Figure 2. Myelin and axonal loss following endothelin injection in the white matter.**

Horizontal section stained using Luxol Fast Blue (a, LFB) and then converted to grey-scale to enhance the differences between the area of demyelination (yellow box) and the controlateral side (blue box). Axonal loss correlates with demyelination (b and c). Cellular infiltration is seen in the lacunar area using Hoechst dye (d). NF200, red; Hoechst, blue. n = 6-7/group.

### **Figure 3. Microglia/macrophages infiltration and astrogliosis in white matter after stroke.**

Endothelin injection induces microglia/macrophages infiltration in the corpus callosum 7 days after the onset of the ischemia (a and b). Reactive astrocytes fill the peri-infarct area all around the macrophages (c and d). CD68, green; GFAP, red; Hoechst, blue. n = 5-6/group.

### **Figure 4. Behavioral deficits after white matter stroke.**

In the cylinder test, mice show an increased preference to use the right paw after endothelin injection compared to the baseline (a). Grid-walking test reveals an increased number of

faults (b and c), especially with the left paw (d), after white matter ischemia compared to the pre-*stroke* baseline. Cognitive deficits are revealed by Novel Object Recognition Test (e). Data are expressed as mean  $\pm$  SD. \*  $p < 0.05$ , Student's t-test and 2-way ANOVA plus Bonferroni's post-hoc test.  $n = 6-7/\text{group}$ .

**Figure 5. Hoechst neurotracing.**

Inter-hemispheric connections through the corpus callosum are showed using the neurotracer Hoechst 33342 (a). Interruption of neural pathways after endothelin injection (b).  $n = 3/\text{group}$ .

**Figure 6. Evans Blue extravasation.**

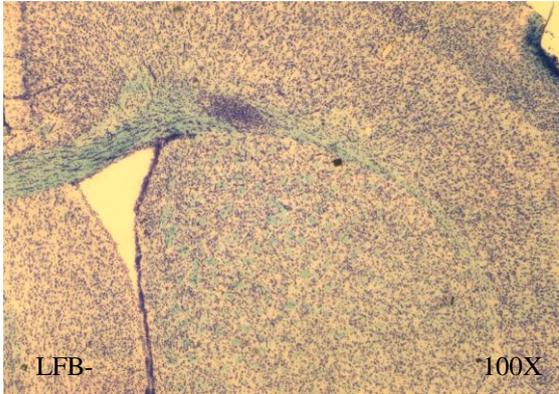
Evans Blue fluorescence in the corpus callosum of endothelin-injected mice 4 hours after *stroke* onset (a). Evans Blue fluorescence in the choroid plexus of vehicle-injected mice (b). Evans Blue, red; Hoechst, blue.  $n = 3/\text{group}$ .

Fig. 1

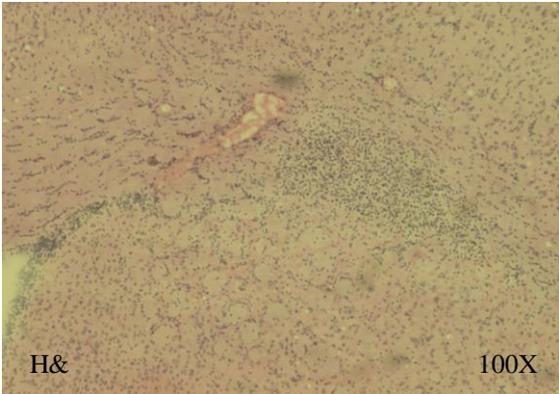
a



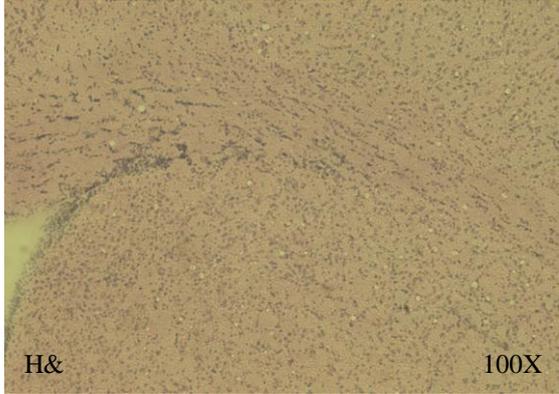
b



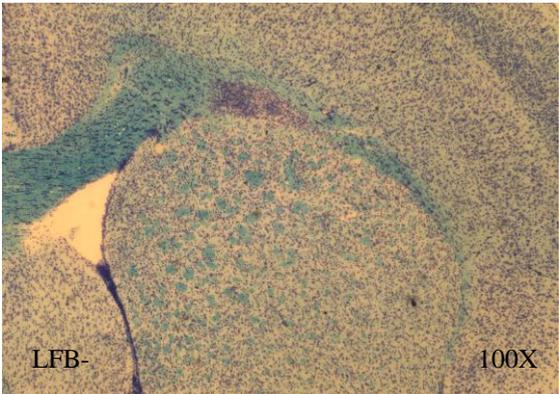
c



d



e

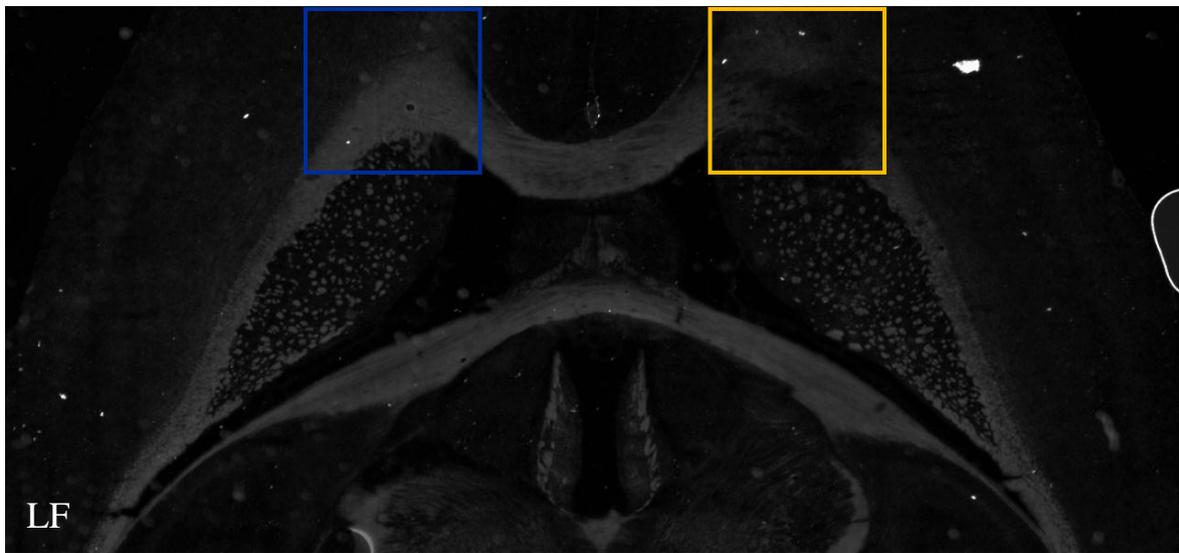


f

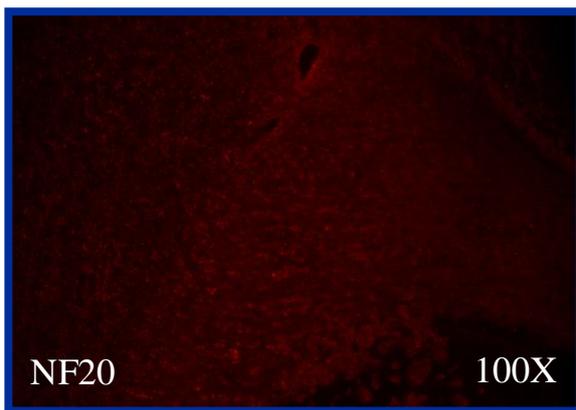


Fig. 2

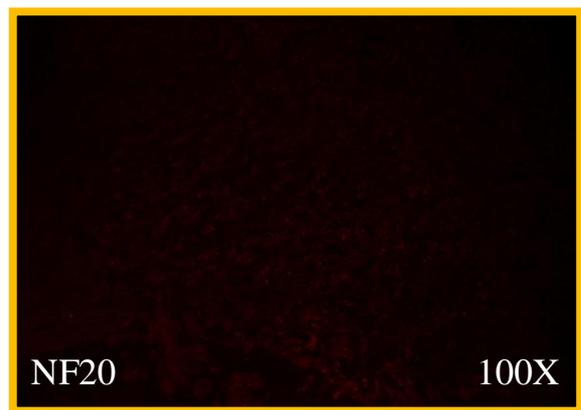
a



b



c



d

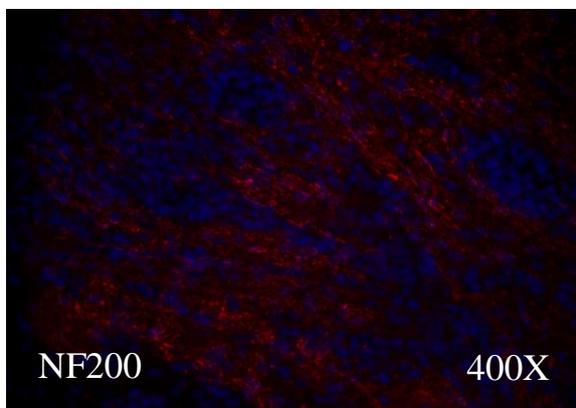
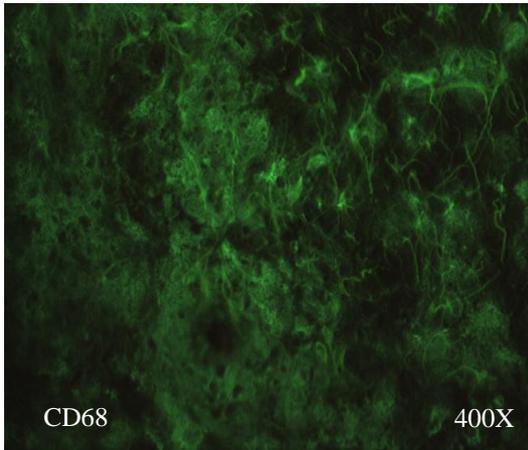
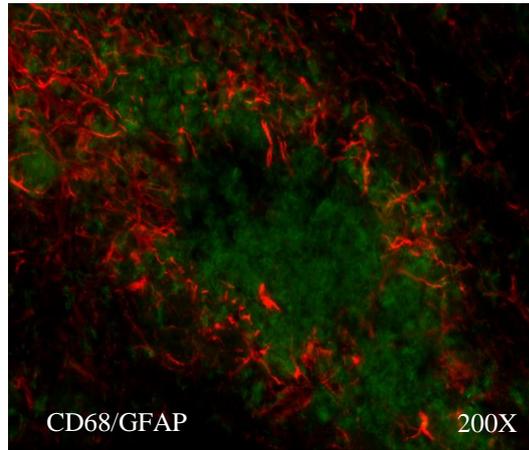


Fig. 3

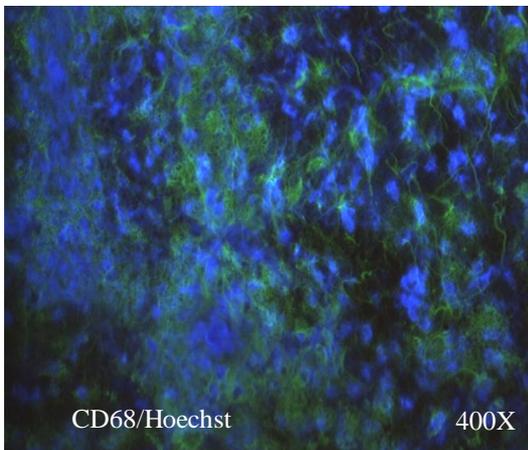
a



c



b



d

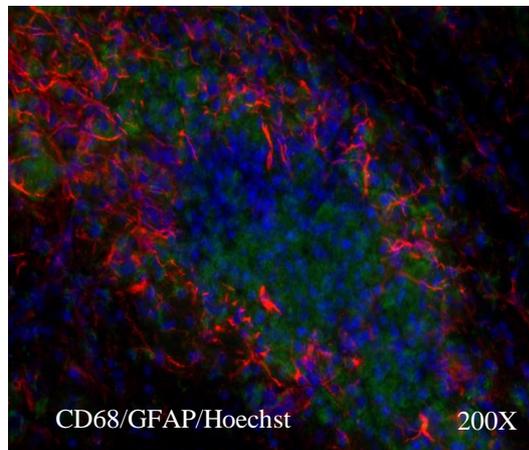
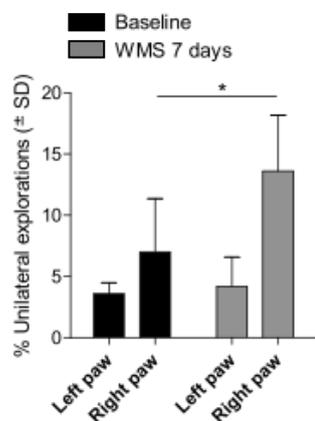


Fig.4

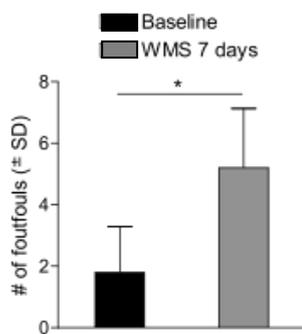
a

Cylinder test - % Unilateral explorations



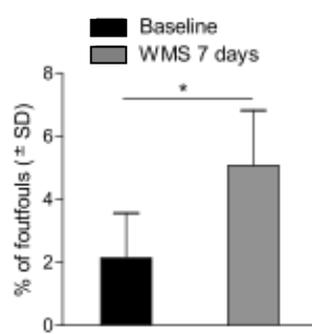
b

Grid-walking test - # of foutfouls



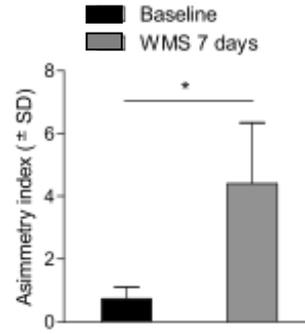
c

Grid-walking test - % of foutfouls



d

Grid-walking test - asymmetry index



e

Novel Object Recognition Test

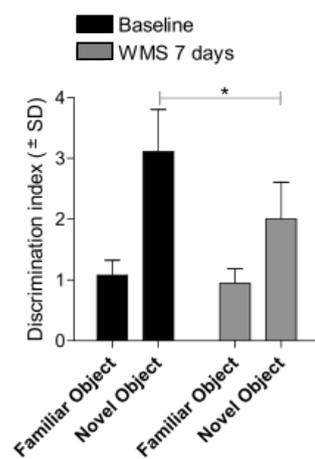
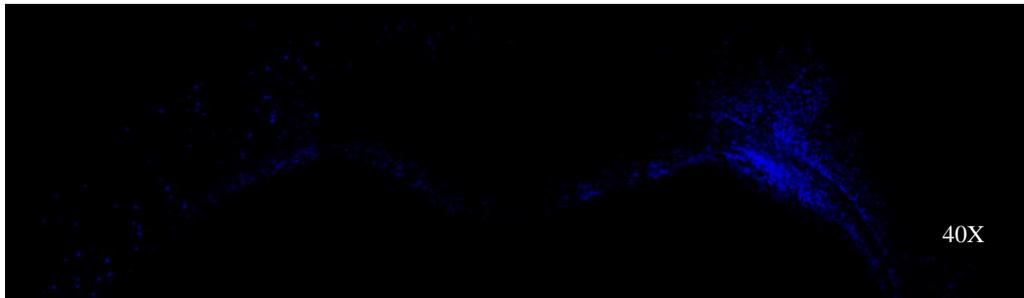


Fig.5

a



b

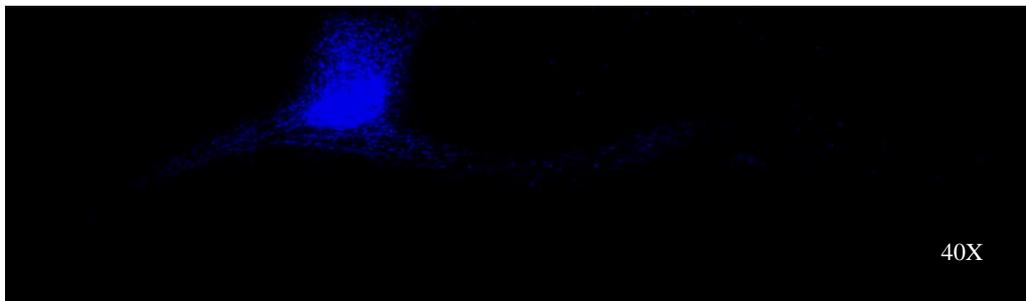
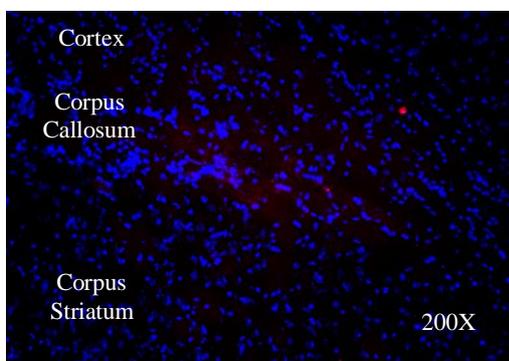
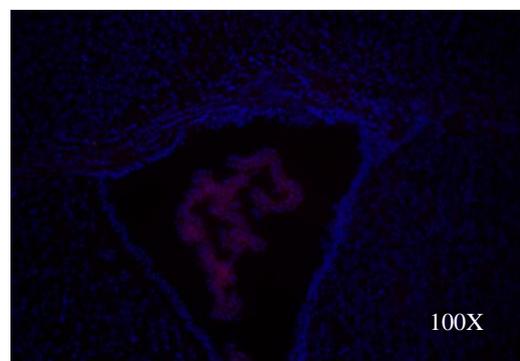


Fig.6

a



b



## Capitolo 4 - Discussione

### 4.1 Ipotermia terapeutica ed AMP

In questo lavoro abbiamo voluto dimostrare come l'impiego di un composto endogeno con attività ipotermizzante possa determinare una sensibile riduzione delle aree e del volume di infarto in un modello animale di ischemia cerebrale focale transiente. L'ipotermia terapeutica rappresenta uno dei più potenti e promettenti metodi per ridurre le conseguenze di un insulto ischemico, come riportato in numerosi lavori sperimentali (Nagel et al. 2008) e per ora solo in pochi *trials* clinici (Bernard et al. 2002; Shankaran et al. 2005). Attualmente, uno dei maggiori problemi alla base dell'applicazione dell'ipotermia terapeutica risulta essere il metodo di induzione della stessa, a cui è strettamente collegata la velocità con la quale l'ipotermia si manifesta (van der Worp et al. 2010). È quindi evidente come la ricerca di sostanze capaci di indurre farmacologicamente una condizione di ipotermia sia estremamente importante al fine di fornire alla ricerca clinica nuovi farmaci da testare nei *clinical trials*.

Dal nostro studio emerge che il composto biologico 5'-adenosina monofosfato riduce la temperatura corporea in maniera dose-dipendente quando iniettato tramite diverse vie di somministrazione (intraperitoneale, intracerebroventricolare e inraipotalamica, Fig. 1-3).

Questo dato modifica la già nota nozione dell'effetto ipotermizzante dell'AMP (Zhang et al. 2006), suggerendo il sistema nervoso centrale come sito d'azione primario di questo composto. Inoltre, viene dimostrato che l'AMP agisce principalmente come agonista dei recettori adenosinici di tipo 1 a livello centrale (Fig. 4-5), innescando la via di trasduzione del segnale che porta all'inibizione dell'enzima adenilato ciclasi e alla modulazione della fosfolipasi C e dei canali ionici al  $\text{Ca}^{2+}$  e al  $\text{K}^+$ .

L'attività degli agonisti adenosinici sulla temperatura corporea è una nozione diffusa nella letteratura scientifica. In particolare, la somministrazione di agonisti A<sub>1</sub>, ma non A<sub>2</sub>, è stato dimostrato ridurre in maniera dose-dipendente la temperatura nel topo, e questo effetto può essere bloccato dal pretrattamento sia con antagonisti adenosinici non selettivi che con antagonisti A<sub>1</sub>-selettivi (Anderson et al. 1994). La modulazione della temperatura mediata dal sistema recettoriale adenosinico sembra, inoltre, giocare un importante ruolo nei meccanismi che regolano nell'animale lo stato di torpore e l'ibernazione (Drew et al. 2007).

L'azione termomodulatoria dei composti adenosinici è da attribuire al loro legame ai recettori A<sub>1</sub> presenti a livello centrale, nella regione del centro di termoregolazione ipotalamico. Infatti, l'iniezione inraipotalamica di antagonisti adenosinici modula la temperatura corporea nel ratto durante normossia ed ipossia (Barros et al. 2006). Dai nostri risultati anche l'AMP sembra agire a questo livello, modulando la temperatura direttamente tramite il legame ai recettori adenosinici.

A livello ipotalamico il controllo della temperatura è regolato, secondo il classico modello proposto da Hammel (1965), da un complesso sistema neuronale costituito da neuroni sensori (*warm-sensitive* and *warm-insensitive*) ed effettori. Tale sistema è estremamente controbilanciato, per cui i cambiamenti di temperatura si verificano solo quando un tipo di stimolo (termolitico o termogenetico) prevale sull'altro (Boulant 2006; Morrison et al. 2008). La nostra ipotesi è che l'AMP agisca proprio a questo livello, determinando un'inibizione dei neuroni sensori che governano la termogenesi (*warm-insensitive*), e causando un mancato controbilanciamento della via termolitica. Il principio che regola tale schema è il contrario di quello che normalmente si verifica nell'ipertermia febbrile, dove un altro mediatore endogeno (PGE<sub>2</sub>) si lega al suo recettore ma a livello dei neuroni *warm-sensitive*, inibendo lo *spike* neuronale e potenziando quindi la via

termogenetica. Per la dimostrazione di tale meccanismo però sono ancora necessari ulteriori esperimenti.

Per dimostrare che l'AMP agisce direttamente sui recettori adenosinici senza essere convertito in adenosina è stato utilizzato un inibitore selettivo dell'enzima 5'-Nucleotidasi, responsabile della conversione dei nucleosidi monofosfato in nucleotidi. Come nella nostra ipotesi, anche in presenza dell'inibitore (AMPCP, Fig. 6a) l'AMP determina una riduzione della temperatura, che viene addirittura potenziata dalla presenza dell'AMPCP. Questa azione ipotermizzante per se dell'AMPCP, riportata in una curva dose-risposta in Fig. 6b, può essere spiegata in parte da un suo possibile effetto di agonista sui recettori adenosinici e/o dall'azione dell'AMP endogeno, che si accumula in quanto non viene più degradato ad adenosina. Secondo le nostre conoscenze, questa è la prima testimonianza di un effetto ipotermizzante dell'AMPCP, ma la sua cinetica e i meccanismi alla base restano ancora da investigare.

Un importante concetto dimostrato in questo lavoro è l'effetto neuroprotettivo dell'AMP in seguito a MCAo nel topo. Se somministrato durante il corso dell'ischemia, infatti, l'AMP determina una riduzione del volume d'infarto di circa il 70.5% rispetto al volume ischemico riportato dagli animali a cui è stato iniettato il solo veicolo (Fig. 7,a,b). Questo effetto neuroprotettivo è determinato dall'ipotermia AMP-indotta; infatti, negli animali trattati con AMP ma mantenuti ad una temperatura fisiologica di 38°C la neuroprotezione non si verifica. Il protocollo terapeutico utilizzato, basato su somministrazioni durante il periodo di ischemia, suggerisce una possibile applicazione di questo composto nel trattamento iperacuto dello *stroke*. L'ipotermia, infatti, esercita un maggiore effetto neuroprotettivo se applicata durante il periodo ischemico, nelle prime fasi dello *stroke*, ed in particolare quando all'ischemia segue la ricanalizzazione (M. Yenari et al. 2008). Un impiego razionale della combinazione trombolitico-ipotermia in clinica medica ha

recentemente riportato risultati incoraggianti (Hemmen et al. 2010). Su questi presupposti si basa la nostra teoria di un possibile impiego combinato di un farmaco trombolitico (come l'Alteplase) e di un farmaco neuroprotettivo (l'AMP), in modo da produrre un'azione sinergica e ridurre drasticamente il danno indotto dall'ischemia.

## 4.2 Tolleranza ischemica e PARP

La continua ricerca di strategie terapeutiche per il trattamento dello *stroke* trova attualmente nella tolleranza ischemica un ottimo strumento per comprendere ed applicare i meccanismi molecolari che la caratterizzano (Dirnagl et al. 2009). Dal momento che in passato alcuni autori hanno ipotizzato un ruolo preponderante dell'enzima PARP-1 nei meccanismi che regolano il preconditionamento cardiaco (Liaudet et al. 2001) e delle cellule neurali (Garnier et al. 2003), lo scopo del nostro lavoro è stato quello di chiarire il ruolo della PARP-1 in un modello di preconditionamento cerebrale *in vivo*. Nel presente studio, infatti, dimostriamo che la PARP-1 non è coinvolta nei processi biochimici attivati da un insulto sottoliminale che conferiscono un'aumentata resistenza al cervello in corso di ischemia massiva. L'evidenza sperimentale che il preconditionamento si verifica, così come negli animali *wild type*, anche nei topi transgenici in cui è stata deleta il gene che codifica per la PARP-1, dimostra, inoltre, che non solo l'attività ma anche l'espressione stessa della proteina non è indispensabile per lo sviluppo dell'IPC.

Come riportato, l'impiego del PARP inibitore 3-aminobenzamide annulla l'effetto neuroprotettivo dell'IPC sul miocardio di ratto (Liaudet et al. 2001), mentre nel nostro modello sperimentale l'inibizione della PARP con il PJ34 non ha effetti sul preconditionamento. Questa differenza suggerisce che i meccanismi alla base del *preconditioning* differiscono da tessuto a tessuto (cuore, cervello); tale teoria potrebbe essere avvalorata anche dal fatto che nel cuore preconditionato la delezione del gene PARP-1 incrementa il volume di infarto (Liaudet et al. 2001), mentre nel cervello non vi sono differenze significative tra la percentuale di neuroprotezione conferita dall'IPC in topi PARP<sup>+/+</sup> e PARP<sup>-/-</sup> (rispettivamente, 59 e 53%). Così come nel cervello, anche in un altro tessuto di origine neurale come la retina è stato dimostrato che la PARP-1 non viene coinvolta nell'IPC

(Zhang et al. 2002). Occorre comunque avere sempre cautela nel confrontare studi sul preconditioning in diversi tessuti in quanto i meccanismi molecolari della tolleranza sono funzione dei vari tipi di stress (entità dello stimolo sottoliminale, finestra temporale tra l'IPC e l'ischemia, ecc) e possono dipendere da fattori strettamente caratteristici del tessuto stesso (vascolarizzazione, consumo metabolico, ecc). I nostri risultati, infatti, dimostrano che la PARP-1 non è strettamente necessaria per l'IPC, ma non escludono la possibilità che l'enzima possa avere un ruolo in differenti tessuti e condizioni sperimentali.

I nostri dati appaiono in contrasto con alcuni studi che affermano come il clivaggio della PARP-1 Caspasi-3 mediato sia un prerequisito per lo sviluppo del preconditionamento nei neuroni (Garnier et al. 2003). Questo risultato, *in vitro*, evidentemente non rispecchia la condizione che si viene ad instaurare *in vivo*; infatti, in un recente lavoro sul preconditionamento della retina di ratto, tessuto di origine neurale, viene dimostrato come l'induzione della tolleranza all'ischemia non abbia come prerequisito il clivaggio, e quindi secondo l'ipotesi di Garnier e colleghi la parziale inattivazione durante la successiva ischemia, della PARP-1 (Zhang et al. 2002).

L'impiego di PARP inibitori è attualmente testato in vari *trials* clinici, dove appaiono efficaci e ben tollerati. Un loro impiego futuro anche nel trattamento *post-stroke* è fortemente avvalorato da numerose evidenze sperimentali in cui i PARP inibitori determinano una robusta neuroprotezione in vari modelli animali di ischemia cerebrale (Moroni & Chiarugi 2009). Alla luce di questo, i nostri risultati da un lato indicano che la PARP ha un ruolo differente durante la maturazione del *preconditioning* e nell'ischemia conclamata, e dall'altro dimostrano che un potenziale trattamento futuro con PARP inibitori in seguito ad ischemia cerebrale non determinerebbe alterazione dei naturali processi di tolleranza endogena.

#### 4.3 Demenza vascolare e Small Vessel Disease

La patologia ischemica della materia bianca rappresenta una frazione significativa (circa il 25%) degli *stroke* ischemici, ma il suo studio è reso complesso dalla mancanza di modelli animali che ne riproducono le caratteristiche fisiopatologiche (Hainsworth & Markus 2008). Per questo motivo il mio lavoro è stato focalizzato sulla caratterizzazione di un nuovo modello di ischemia della materia bianca sub-corticale nel topo al fine di studiarne la progressione e fornire nuovi bersagli farmacologici per il suo trattamento.

Il maggior vantaggio fornito da questo modello è la possibilità di determinare una lesione strategica in un'area altrimenti non raggiungibile. L'iniezione localizzata di endotelina induce rapidamente la riduzione del flusso ematico cerebrale, che persiste per diverse ore (Hughes et al. 2003). L'attivazione precoce dei meccanismi di morte cellulare descritti da Sozmen e colleghi (2009) precede la degenerazione della mielina. Nel nostro modello, la disorganizzazione delle fibre mieliniche è un fenomeno acuto (12-36 ore) ma raggiunge il picco dopo 5-7 giorni, in contemporanea con la comparsa dell'infiltrato cellulare nel sito della lesione. Oltre alla perdita della mielina, infatti, nell'uomo lo *stroke* della materia bianca è caratterizzato dal punto di vista neuropatologico dalla riduzione della densità assonica, dall'infiltrazione macrofagica e dalla gliosi reattiva, per cui abbiamo cercato di evidenziare nel nostro modello anche queste caratteristiche, usando tecniche di immunofluorescenza. La degenerazione assonica procede con la stessa cinetica della perdita della mielina. Come mostrato in figura 2, infatti, questi due eventi chiave hanno un profilo temporale sovrapponibile e che risulta comparabile con la patologia nell'uomo (Markus 2008). La proliferazione di glia e microglia ha un ruolo non ancora delineato nella progressione della lesione ma è caratteristica della lesione ischemica irreversibile (Selnes & Vinters 2006). Anche il nostro modello è caratterizzato dalla comparsa di cellule CD68

positive (microglia e macrofagi) e GFAP positive (astrociti) nel focolaio della lesione (Fig. 3). È importante a questo proposito determinare se la proliferazione di questi tipi cellulari contribuisce ad esacerbare il danno o invece rappresenta il primo passaggio per l'attivazione dei meccanismi di riparazione. In entrambi i casi, l'intervento farmacologico con specifici modulatori del processo infiammatorio può rappresentare una prospettiva molto interessante per la comprensione ed il trattamento dello *stroke* lacunare.

Nell'uomo gli *stroke* lacunari sono strettamente correlati con il manifestarsi della demenza vascolare, una condizione neurologica molto diffusa soprattutto nella popolazione anziana che può determinare l'insorgenza di deficit sia cognitivi che motori (Román et al. 2002). L'insorgenza di una lesione strategicamente collocata nella materia bianca causa l'interruzione della normale trasmissione nervosa e delle connessioni inter- e intra-emisferiche (Kurz 2001). Il nostro modello animale rispecchia anche queste caratteristiche. Gli animali ischemici, infatti, mostrano l'insorgenza di alterazioni neurologiche, evidenziate tramite specifici test comportamentali, già 7 giorni dopo l'iniezione di endotelina. La coordinazione nei movimenti risulta alterata così come il normale comportamento esplorativo (figura 4). Il dato più interessante però riguarda il deterioramento delle capacità cognitive. Dopo 7 giorni dallo *stroke*, infatti, gli animali presentano un marcato deficit della memoria a breve termine determinato mediante il test NORT. Nell'uomo la disfunzione mnesica è caratteristica della demenza vascolare, e rappresenta una delle alterazioni funzionali maggiormente rilevanti nella malattia di Alzheimer. Molto spesso le due condizioni (demenza vascolare e malattia di Alzheimer) coesistono e determinano l'insorgenza di un quadro sintomatologico estremamente aggravato in termini di disturbi cognitivi. La presenza di infarti lacunari multipli, infatti, fa aumentare più del doppio il rischio di sviluppare demenza ed accelera il declino cognitivo in pazienti con malattia di Alzheimer (Vermeer et al. 2007).

La natura strategica della lesione in questo modello determina l'insorgenza del complesso quadro sintomatologico. Per dimostrare come una lesione estremamente limitata possa indurre deficit motori e cognitivi così importanti abbiamo tracciato le connessioni interemisferiche sia in condizioni fisiologiche che dopo lo *stroke* della materia bianca. In seguito alla degenerazione delle fibre mieliniche e degli assoni le connessioni cortico-corticali interemisferiche risultano alterate. L'integrità del corpo calloso, infatti, è critica per le funzioni cognitive ed è stato riportato come le alterazioni strutturali della materia bianca sottocorticale sono estremamente correlate con l'entità del declino cognitivo in condizioni patologiche come la demenza vascolare e la malattia di Alzheimer (Lee et al. 2010).

Un ulteriore aspetto rilevante degli *stroke* lacunari e in generale delle malattie dei piccoli vasi è l'alterazione della permeabilità della barriera emato-encefalica (BBB). Numerosi lavori riportano infatti come la degenerazione della materia bianca sia associata alla disfunzione della BBB e quindi al conseguente edema vasogenico (Taheri et al. 2011; Yang & Rosenberg 2011). Altri autori ipotizzano, invece, come l'alterazione della BBB possa costituire la causa, e non l'effetto dovuto all'ischemia, degli *stroke* lacunari e della demenza vascolare (Wardlaw 2003). Nel nostro modello abbiamo cercato di valutare la tempistica dell'apertura della barriera emato-encefalica, riscontrando extravasazione nel core della lesione già dopo 4 ore dall'iniezione di endotelina. Un modello animale di *stroke* lacunare che permette lo studio della BBB in condizioni patologiche può fornire importanti informazioni sulle dinamiche delle alterazioni dell'unità neurovascolare e chiarire così relazioni causa-effetto ancora non del tutto comprese.

Per concludere, la possibilità di utilizzare un modello che riproduce molte delle caratteristiche fisiopatologiche dello *stroke* lacunare consente di studiare diversi aspetti della patologia e rispondere ad alcune domande ancora non rivelate. Ad esempio, qual è il rapporto tra la degenerazione della materia bianca e l'ipoperfusione cronica tipica delle SVDs?

Possono i modelli genetici di SVDs come i CADASIL mutant mice fornirci delle indicazioni a riguardo? Inoltre, quali strategie neuroriparative garantiscono il migliore recupero delle funzionalità neurologiche? Infine, come variano i meccanismi e le tempistiche della degenerazione della materia bianca e del neurorepair in animali adulti e anziani rispetto ai topi giovani? Fornire delle risposte a queste domande può rivelare importanti indicazioni nella comprensione e nel trattamento delle patologie ischemiche lacunari. Queste tematiche rappresentano le mie attuali linee di ricerca.

## Elenco delle pubblicazioni

1: Lanzillotta A, Sarnico I, Ingrassia R, Boroni F, Branca C, Benarese M, Faraco G, Blasi F, Chiarugi A, Spano P, Pizzi M. The acetylation of RelA in Lys310 dictates the NF- $\kappa$ B-dependent response in post-ischemic injury. *Cell Death Dis.* 2010 Nov 4;1:e96. Erratum in: *Cell Death Dis.* 2010 Dec;1(12):e107. PubMed PMID: 21368872.

2: Faraco G\*, Blasi F\*, Min W, Wang ZQ, Moroni F, Chiarugi A. Brain ischemic preconditioning does not require PARP-1. *Stroke.* 2010 Jan;41(1):181-3. Epub 2009 Nov 5. PubMed PMID: 19892992.

\*Equally contribution

## Bibliografia

Anderson, R., Sheehan, M.J. & Strong, P., 1994. Characterization of the adenosine receptors mediating hypothermia in the conscious mouse. *British journal of pharmacology*, 113(4), p.1386-1390.

Ankarcrona, M. et al., 1995. Glutamate-induced neuronal death: a succession of necrosis or apoptosis depending on mitochondrial function. *Neuron*, 15(4), p.961-973.

Annunziato, L. et al., 2007. Glutamate-independent calcium toxicity: introduction. *Stroke; a journal of cerebral circulation*, 38(2 Suppl), p.661-664.

Arai, K. & Lo, E.H., 2009. Oligovascular signaling in white matter stroke. *Biological & pharmaceutical bulletin*, 32(10), p.1639-1644.

Arboleda-Velasquez, J.F. et al., 2011. Hypomorphic Notch 3 alleles link Notch signaling to ischemic cerebral small-vessel disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(21), p.E128-35.

Arboleda-Velasquez, J.F. et al., 2008. Linking Notch signaling to ischemic stroke. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(12), p.4856-4861.

Astrup, J., Nordström, C.H. & Rehncrona, S., 1977. Rate of rise in extracellular potassium in the ischemic rat brain and the effect of preischemic metabolic rate: evidence for a specific effect of phenobarbitone. *Acta neurologica Scandinavica. Supplementum*, 64, p.148-149.

Astrup, J., Siesjö, B.K. & Symon, L., 1981. Thresholds in cerebral ischemia - the ischemic penumbra. *Stroke; a journal of cerebral circulation*, 12(6), p.723-725.

Ayata, C., 2010. CADASIL: experimental insights from animal models. *Stroke; a journal of cerebral circulation*, 41(10 Suppl), p.S129-34.

Bamford, J. et al., 1991. Classification and natural history of clinically identifiable subtypes of cerebral infarction. *Lancet*, 337(8756), p.1521-1526.

Barros, R.C.H., Branco, L.G.S. & Cárnio, E.C., 2006. Respiratory and body temperature modulation by adenosine A1 receptors in the anteroventral preoptic region during normoxia and hypoxia. *Respiratory physiology & neurobiology*, 153(2), p.115-125.

Baskin, Y.K., Dietrich, W.D. & Green, E.J., 2003. Two effective behavioral tasks for evaluating sensorimotor dysfunction following traumatic brain injury in mice. *Journal of neuroscience methods*, 129(1), p.87-93.

- Berger, N.A., 1985. Poly(ADP-ribose) in the cellular response to DNA damage. *Radiation research*, 101(1), p.4-15.
- Bernard, S.A. et al., 2002. Treatment of comatose survivors of out-of-hospital cardiac arrest with induced hypothermia. *The New England journal of medicine*, 346(8), p.557-563.
- Bonfoco, E. et al., 1995. Apoptosis and necrosis: two distinct events induced, respectively, by mild and intense insults with N-methyl-D-aspartate or nitric oxide/superoxide in cortical cell cultures. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(16), p.7162-7166.
- Boulant, J.A., 2006. Neuronal basis of Hammel's model for set-point thermoregulation. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)*, 100(4), p.1347-1354.
- Bruno, V. et al., 2001. An activity-dependent switch from facilitation to inhibition in the control of excitotoxicity by group I metabotropic glutamate receptors. *The European journal of neuroscience*, 13(8), p.1469-1478.
- Burk, J. et al., 2008. Protection of cerebral microvasculature after moderate hypothermia following experimental focal cerebral ischemia in mice. *Brain research*, 1226, p.248-255.
- Burnstock, G., 2006. Pathophysiology and therapeutic potential of purinergic signaling. *Pharmacological reviews*, 58(1), p.58-86.
- Caplan, L.R., 2011. Stroke classification: a personal view. *Stroke; a journal of cerebral circulation*, 42(1 Suppl), p.S3-6.
- Carmichael, S.T., 2005. Rodent models of focal stroke: size, mechanism, and purpose. *NeuroRx : the journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics*, 2(3), p.396-409.
- Chabriat, H. et al., 2009. Cadasil. *Lancet neurology*, 8(7), p.643-653.
- Chan, P.H., 2001. Reactive oxygen radicals in signaling and damage in the ischemic brain. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 21(1), p.2-14.
- Chiarugi, A., 2005. Intrinsic mechanisms of poly(ADP-ribose) neurotoxicity: three hypotheses. *Neurotoxicology*, 26(5), p.847-855.
- Chiarugi, A., 2002. Poly(ADP-ribose) polymerase: killer or conspirator? The "suicide hypothesis" revisited. *Trends in pharmacological sciences*, 23(3), p.122-129.
- Chiarugi, A. & Moskowitz, M.A., 2002. Cell biology. PARP-1--a perpetrator of apoptotic cell death? *Science (New York, N.Y.)*, 297(5579), p.200-201.
- Choi, D.W. & Rothman, S.M., 1990. The role of glutamate neurotoxicity in hypoxic-ischemic neuronal death. *Annual review of neuroscience*, 13, p.171-182.

Cloft, H.J. et al., 2009. Intra-arterial stroke therapy: an assessment of demand and available work force. *AJNR. American journal of neuroradiology*, 30(3), p.453-458.

D'Amours, D. et al., 1999. Poly(ADP-ribosylation) reactions in the regulation of nuclear functions. *The Biochemical journal*, 342 ( Pt 2), p.249-268.

Dalkara, T. et al., 1994. Dual role of nitric oxide in focal cerebral ischemia. *Neuropharmacology*, 33(11), p.1447-1452.

Degterev, A. et al., 2005. Chemical inhibitor of nonapoptotic cell death with therapeutic potential for ischemic brain injury. *Nature chemical biology*, 1(2), p.112-119.

del Zoppo, G.J., 2009. Inflammation and the neurovascular unit in the setting of focal cerebral ischemia. *Neuroscience*, 158(3), p.972-982.

del Zoppo, G.J., 2010. The neurovascular unit in the setting of stroke. *Journal of internal medicine*, 267(2), p.156-171.

Dirnagl, U, Iadecola, C. & Moskowitz, M.A., 1999. Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. *Trends in neurosciences*, 22(9), p.391-397.

Dirnagl, U, Becker, K. & Meisel, A., 2009. Preconditioning and tolerance against cerebral ischaemia: from experimental strategies to clinical use. *Lancet neurology*, 8(4), p.398-412.

Donnan, G.A. & Davis, S.M., 2008. Breaking the 3 h barrier for treatment of acute ischaemic stroke. *Lancet neurology*, 7(11), p.981-982.

Drew, K.L. et al., 2007. Central nervous system regulation of mammalian hibernation: implications for metabolic suppression and ischemia tolerance. *Journal of neurochemistry*, 102(6), p.1713-1726.

Eliasson, M.J. et al., 1997. Poly(ADP-ribose) polymerase gene disruption renders mice resistant to cerebral ischemia. *Nature medicine*, 3(10), p.1089-1095.

Endres, M et al., 1998. Attenuation of delayed neuronal death after mild focal ischemia in mice by inhibition of the caspase family. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 18(3), p.238-247.

Endres, M et al., 1997. Ischemic brain injury is mediated by the activation of poly(ADP-ribose)polymerase. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 17(11), p.1143-1151.

Endres, Matthias et al., 2004. Targeting eNOS for stroke protection. *Trends in neurosciences*, 27(5), p.283-289.

Fisher, C.M., 1982. Lacunar strokes and infarcts: a review. *Neurology*, 32(8), p.871-876.

- Fisher, C.M., 1968. The arterial lesions underlying lacunes. *Acta neuropathologica*, 12(1), p.1-15.
- Galluzzi, L. et al., 2011. Programmed necrosis from molecules to health and disease. *International review of cell and molecular biology*, 289, p.1-35.
- Garnier, P., Ying, W. & Swanson, R.A., 2003. Ischemic preconditioning by caspase cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase-1. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 23(22), p.7967-7973.
- Gidday, J.M., 2006. Cerebral preconditioning and ischaemic tolerance. *Nature reviews. Neuroscience*, 7(6), p.437-448.
- Gilligan, A.K. et al., 2005. Stroke units, tissue plasminogen activator, aspirin and neuroprotection: which stroke intervention could provide the greatest community benefit? *Cerebrovascular diseases (Basel, Switzerland)*, 20(4), p.239-244.
- Ginsberg, M.D., 2008. Neuroprotection for ischemic stroke: past, present and future. *Neuropharmacology*, 55(3), p.363-389.
- Green, A.R., 2008. Pharmacological approaches to acute ischaemic stroke: reperfusion certainly, neuroprotection possibly. *British journal of pharmacology*, 153 Suppl 1, p.S325-38.
- Grotta, J.C. et al., 2008. Stroke program review group: an interim report. *Stroke; a journal of cerebral circulation*, 39(4), p.1364-1370.
- Gu, Z. et al., 2002. S-nitrosylation of matrix metalloproteinases: signaling pathway to neuronal cell death. *Science (New York, N.Y.)*, 297(5584), p.1186-1190.
- Hacke, W. et al., 2004. Association of outcome with early stroke treatment: pooled analysis of ATLANTIS, ECASS, and NINDS rt-PA stroke trials. *Lancet*, 363(9411), p.768-774.
- Haglund, M., Sjöbeck, M. & Englund, E., 2004. Severe cerebral amyloid angiopathy characterizes an underestimated variant of vascular dementia. *Dementia and geriatric cognitive disorders*, 18(2), p.132-137.
- Hainsworth, A.H. & Markus, H.S., 2008. Do in vivo experimental models reflect human cerebral small vessel disease? A systematic review. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 28(12), p.1877-1891.
- Hammel, H.T., 1965. Neurones and temperature regulation. AMRL-TR-65-232. AMRL-TR. Aerospace Medical Research Laboratories (6570th), p.1-32.
- Hassan, A. et al., 2003. Markers of endothelial dysfunction in lacunar infarction and ischaemic leukoaraiosis. *Brain : a journal of neurology*, 126(Pt 2), p.424-432.

- Hemmen, T.M. et al., 2010. Intravenous thrombolysis plus hypothermia for acute treatment of ischemic stroke (Ictus-L): final results. *Stroke; a journal of cerebral circulation*, 41(10), p.2265-2270.
- Huang, Z. et al., 1994. Effects of cerebral ischemia in mice deficient in neuronal nitric oxide synthase. *Science (New York, N.Y.)*, 265(5180), p.1883-1885.
- Hughes, P.M. et al., 2003. Focal lesions in the rat central nervous system induced by endothelin-1. *Journal of neuropathology and experimental neurology*, 62(12), p.1276-1286.
- Iadecola, C. & Anrather, J., 2011. The immunology of stroke: from mechanisms to translation. *Nature medicine*, 17(7), p.796-808.
- Iadecola, C et al., 1997. Delayed reduction of ischemic brain injury and neurological deficits in mice lacking the inducible nitric oxide synthase gene. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 17(23), p.9157-9164.
- Joutel, A et al., 2000. [CADASIL: genetics and physiopathology]. *Bulletin de l'Académie nationale de médecine*, 184(7), p.1535-42; discussion 1542-4.
- Joutel, Anne et al., 2010. Cerebrovascular dysfunction and microcirculation rarefaction precede white matter lesions in a mouse genetic model of cerebral ischemic small vessel disease. *The Journal of clinical investigation*, 120(2), p.433-445.
- Joutel, A et al., 1996. Notch3 mutations in CADASIL, a hereditary adult-onset condition causing stroke and dementia. *Nature*, 383(6602), p.707-710.
- Khan, U. et al., 2007. Risk factor profile of cerebral small vessel disease and its subtypes. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*, 78(7), p.702-706.
- Kitagawa, K. et al., 1990. "Ischemic tolerance" phenomenon found in the brain. *Brain research*, 528(1), p.21-24.
- Kollmar, R. et al., 2009. Ice-cold saline for the induction of mild hypothermia in patients with acute ischemic stroke: a pilot study. *Stroke; a journal of cerebral circulation*, 40(5), p.1907-1909.
- Krieger, D.W. & Yenari, M.A., 2004. Therapeutic hypothermia for acute ischemic stroke: what do laboratory studies teach us? *Stroke; a journal of cerebral circulation*, 35(6), p.1482-1489.
- Kurz, A.F., 2001. What is vascular dementia? *International journal of clinical practice. Supplement*, (120), p.5-8.
- Lam, A. et al., 2008. Cerebral small vessel disease: genetic risk assessment for prevention and treatment. *Molecular diagnosis & therapy*, 12(3), p.145-156.

- Lazzaro, M.A. & Prabhakaran, S., 2008. Induced hypothermia in acute ischemic stroke. *Expert opinion on investigational drugs*, 17(8), p.1161-1174.
- Lee, D.Y. et al., 2010. Vascular and Degenerative Processes Differentially Affect Regional Interhemispheric Connections in Normal Aging, Mild Cognitive Impairment, and Alzheimer Disease. *Stroke; a journal of cerebral circulation*, 41(8), p.1791-1797.
- Lee, J.M. et al., 2000. Brain tissue responses to ischemia. *The Journal of clinical investigation*, 106(6), p.723-731.
- Li, X. et al., 2010. Contributions of poly(ADP-ribose) polymerase-1 and -2 to nuclear translocation of apoptosis-inducing factor and injury from focal cerebral ischemia. *Journal of neurochemistry*, 113(4), p.1012-1022.
- Liaudet, L. et al., 2001. Myocardial ischemic preconditioning in rodents is dependent on poly (ADP-ribose) synthetase. *Molecular medicine (Cambridge, Mass.)*, 7(6), p.406-417.
- Lipton, P., 1999. Ischemic cell death in brain neurons. *Physiological reviews*, 79(4), p.1431-1568.
- Lloyd-Jones, D. et al., 2009. Heart Disease and Stroke Statistics--2009 Update: A Report From the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. *Circulation*, 119(3), p.480-486.
- Lloyd-Jones, D.M., 2010. Cardiovascular risk prediction: basic concepts, current status, and future directions. *Circulation*, 121(15), p.1768-1777.
- Lo, E.H., Dalkara, T. & Moskowitz, M.A., 2003. Mechanisms, challenges and opportunities in stroke. *Nature reviews. Neuroscience*, 4(5), p.399-415.
- Markus, H.S., 2008. Genes, endothelial function and cerebral small vessel disease in man. *Experimental physiology*, 93(1), p.121-127.
- Moroni, F. & Chiarugi, A., 2009. Post-ischemic brain damage: targeting PARP-1 within the ischemic neurovascular units as a realistic avenue to stroke treatment. *The FEBS journal*, 276(1), p.36-45.
- Morrison, S.F., Nakamura, K. & Madden, C.J., 2008. Central control of thermogenesis in mammals. *Experimental physiology*, 93(7), p.773-797.
- Moskowitz, M.A., 2010. Brain protection: maybe yes, maybe no. *Stroke; a journal of cerebral circulation*, 41(10 Suppl), p.S85-6.
- Moskowitz, M.A., Lo, E.H. & Iadecola, C., 2010. The science of stroke: mechanisms in search of treatments. *Neuron*, 67(2), p.181-198.
- Murry, C.E., Jennings, R.B. & Reimer, K.A., 1986. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation*, 74(5), p.1124-1136.

- Nagel, S. et al., 2008. Therapeutic hypothermia in experimental models of focal and global cerebral ischemia and intracerebral hemorrhage. *Expert review of neurotherapeutics*, 8(8), p.1255-1268.
- Nicotera, P., Leist, M. & Ferrando-May, E., 1998. Intracellular ATP, a switch in the decision between apoptosis and necrosis. *Toxicology letters*, 102-103, p.139-142.
- Pacher, P., Beckman, J.S. & Liaudet, L., 2007. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiological reviews*, 87(1), p.315-424.
- Paci, M. et al., 2011. Outcomes from ischemic stroke subtypes classified by the Oxfordshire Community Stroke Project: a systematic review. *European journal of physical and rehabilitation medicine*, 47(1), p.19-23.
- Pantoni, L. & Gorelick, P., 2011. Advances in vascular cognitive impairment 2010. *Stroke; a journal of cerebral circulation*, 42(2), p.291-293.
- Pellegrini-Giampietro, D.E. et al., 1999. Protection with metabotropic glutamate 1 receptor antagonists in models of ischemic neuronal death: time-course and mechanisms. *Neuropharmacology*, 38(10), p.1607-1619.
- Pignataro, G. et al., 2009. Post-ischemic brain damage: effect of ischemic preconditioning and postconditioning and identification of potential candidates for stroke therapy. *The FEBS journal*, 276(1), p.46-57.
- Pizzi, M. et al., 2009. Post-ischemic brain damage: NF-kappaB dimer heterogeneity as a molecular determinant of neuron vulnerability. *The FEBS journal*, 276(1), p.27-35.
- Román, G.C. et al., 2002. Subcortical ischaemic vascular dementia. *The Lancet Neurology*, 1(7), p.426-436.
- Segura, T., Calleja, S. & Jordan, J., 2008. Recommendations and treatment strategies for the management of acute ischemic stroke. *Expert opinion on pharmacotherapy*, 9(7), p.1071-1085.
- Selnes, O.A. & Vinters, H.V., 2006. Vascular cognitive impairment. *Nature clinical practice. Neurology*, 2(10), p.538-547.
- Shankaran, S. et al., 2005. Whole-body hypothermia for neonates with hypoxic-ischemic encephalopathy. *The New England journal of medicine*, 353(15), p.1574-1584.
- Shin, H.K. et al., 2007. Normobaric hyperoxia improves cerebral blood flow and oxygenation, and inhibits peri-infarct depolarizations in experimental focal ischaemia. *Brain : a journal of neurology*, 130(Pt 6), p.1631-1642.

- Sozmen, E.G. et al., 2009. A white matter stroke model in the mouse: axonal damage, progenitor responses and MRI correlates. *Journal of neuroscience methods*, 180(2), p.261-272.
- Sugimoto, K. & Iadecola, C., 2003. Delayed effect of administration of COX-2 inhibitor in mice with acute cerebral ischemia. *Brain research*, 960(1-2), p.273-276.
- Swanson, R.A., Farrell, K. & Simon, R.P., 1995. Acidosis causes failure of astrocyte glutamate uptake during hypoxia. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 15(3), p.417-424.
- Swoap, S.J., Rathvon, M. & Gutilla, M., 2007. AMP does not induce torpor. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology*, 293(1), p.R468-73.
- Taheri, S. et al., 2011. Blood-Brain Barrier Permeability Abnormalities in Vascular Cognitive Impairment. *Stroke; a journal of cerebral circulation*, 42(8), p.2158-2163.
- Tennant, K.A. & Jones, T.A., 2009. Sensorimotor behavioral effects of endothelin-1 induced small cortical infarcts in C57BL/6 mice. *Journal of neuroscience methods*, 181(1), p.18-26.
- The National Institute of Neurological Disorders and Stroke rt-PA Stroke Study Group, 1995. Tissue plasminogen activator for acute ischemic stroke. *The New England journal of medicine*, 333(24), p.1581-1587.
- van der Worp, H.B. & van Gijn, J., 2007. Clinical practice. Acute ischemic stroke. *The New England journal of medicine*, 357(6), p.572-579.
- van der Worp, H.B. et al., 2010. Therapeutic hypothermia for acute ischemic stroke: ready to start large randomized trials? *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 30(6), p.1079-1093.
- Vermeer, S.E., Longstreth, W.T., Jr & Koudstaal, P.J., 2007. Silent brain infarcts: a systematic review. *The Lancet Neurology*, 6(7), p.611-619.
- Wang, Q., Tang, X.N. & Yenari, M.A., 2007. The inflammatory response in stroke. *Journal of neuroimmunology*, 184(1-2), p.53-68.
- Wang, Y., Dawson, V.L. & Dawson, T.M., 2009. Poly(ADP-ribose) signals to mitochondrial AIF: a key event in parthanatos. *Experimental neurology*, 218(2), p.193-202.
- Wardlaw, J.M., 2003. Is Breakdown of the Blood-Brain Barrier Responsible for Lacunar Stroke, Leukoaraiosis, and Dementia? *Stroke; a journal of cerebral circulation*, 34(3), p.806-812.

- Yang, Y. & Rosenberg, G.A., 2011. Blood-brain barrier breakdown in acute and chronic cerebrovascular disease. *Stroke; a journal of cerebral circulation*, 42(11), p.3323-3328.
- Yenari, M. et al., 2008. Metabolic downregulation: a key to successful neuroprotection? *Stroke; a journal of cerebral circulation*, 39(10), p.2910-2917.
- Yenari, M.A., Kauppinen, T.M. & Swanson, R.A., 2010. Microglial activation in stroke: therapeutic targets. *Neurotherapeutics : the journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics*, 7(4), p.378-391.
- Yoshizaki, K. et al., 2008. Chronic cerebral hypoperfusion induced by right unilateral common carotid artery occlusion causes delayed white matter lesions and cognitive impairment in adult mice. *Experimental neurology*, 210(2), p.585-591.
- Yu, S. et al., 2002. Mediation of poly(ADP-ribose) polymerase-1-dependent cell death by apoptosis-inducing factor. *Science (New York, N.Y.)*, 297(5579), p.259-263.
- Yu, S. et al., 2003. Poly(ADP-ribose) polymerase-1 and apoptosis inducing factor in neurotoxicity. *Neurobiology of disease*, 14(3), p.303-317.
- Yuan, J. & Yankner, B.A., 2000. Apoptosis in the nervous system. *Nature*, 407(6805), p.802-809.
- Zhang, C. et al., 2002. Ischemic preconditioning attenuates apoptotic cell death in the rat retina. *Investigative ophthalmology & visual science*, 43(9), p.3059-3066.
- Zhang, J. et al., 2006. Constant darkness is a circadian metabolic signal in mammals. *Nature*, 439(7074), p.340-343.
- Zhao, H., Steinberg, G.K. & Sapolsky, R.M., 2007. General versus specific actions of mild-moderate hypothermia in attenuating cerebral ischemic damage. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 27(12), p.1879-1894.