

INVESTIGACIÓN INVESTIGACIÓN 2007



**EXPRESIÓN DE RCAN1-4
EN RESPUESTA A HIPOXIA**

FUNDACIÓN MAPFRE

www.fundacionmapfre.com

Sobre las autoras

Belén G. Ramirez

Departamento de Biología Vascul ar e Inflamación.
Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares (CNIC)
Madrid 28029, España

Eva Cano

Departamento de Biología Vascul ar e Inflamación.
Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares (CNIC),
Madrid 28029, España

Índice

1.	Resumen	4
1.1	Objetivo del trabajo	4
1.2	Material y métodos	4
1.3	Resultados	4
1.4	Conclusiones	4
1.5	Palabras clave	4
2.	Introducción	4
3.	Material y métodos	5
4.	Resultados	6
5.	Discusión	9
6.	Bibliografía	9

1. RESUMEN

1.1 Objetivo del trabajo

Analizar la expresión de Rcan1-4 como “sensor” de la ruta Ca/CN/NFAT en respuesta a daño cerebral.

1.2 Material y Métodos

Se ha llevado a cabo en un modelo animal murino de daño cerebral más hipoxia del tejido mediante ligación de la Arteria Cerebral Media. Hipoxia de cultivos primarios de astrocitos “ex vivo”, mediante el uso de cámaras de hipoxia. El efecto de la expresión de Rcan1-4 se ha estudiado mediante la expresión exógena de esta proteína en cultivos primarios de astrocitos infectados con vectores adenovirales, en ensayos de cierre de herida.

1.3 Resultados

La proteína Rcan1-4 se regula en los procesos de hipoxia del cerebro pero no en respuesta al daño cerebral producida por la craneotomía experimental. Hemos detectado la expresión endógena del Rcan1-4 en respuesta al daño cerebral más hipoxia de cerebro en tejido total, y en respuesta a hipoxia en cultivos primarios de astrocitos. Nuestros datos preliminares indican, que la expresión exógena de Rcan1-4 en astrocitos tiene un efecto en la movilidad de los astrocitos y en su capacidad para cerrar heridas producidas en una monolapa.

1.4 Conclusiones

Nuestros datos muestran que la hipoxia del tejido del cerebro induce la expresión de Rcan1-4. Rcan1-4 es un regulador de la calcineurina, y el papel de esta expresión está actualmente evaluándose.

1.5 Palabras clave

Hipoxia cerebral, astrocitos, Rcan1-4, calcineurina.

2. INTRODUCCIÓN

El daño cerebral es una lesión física o deterioro funcional del cerebro debido a un intercambio brusco de energía mecánica. La lesión cerebral más frecuente es el traumatismo craneoencefálico (TCE). Esta definición incluye causas externas que pudiesen resultar en conmoción, contusión, hemorragia o laceración del cerebro o del tronco del encéfalo hasta el nivel de la primera vértebra cervical.

Existen una serie de cascadas de señalización comunes a los procesos post-traumáticos: disfunción de receptores neuronales, efectos de los radicales libres, daño mediado por calcio y eventos inflamatorios. Una de las áreas de investigación más activas es el estudio de las señales de transducción mediadas por calcio. Desde el

punto de vista bioquímico, en los procesos de daño cerebral se produce cambios iónicos importantes que desembocan en una intensa despolarización de la membrana celular. De esta manera, se pone en marcha una cascada Ca^{2+} - dependiente que originará la muerte celular. El aumento de calcio intracelular ($[Ca^{2+}]_i$) es un factor clave en los procesos que conducen al daño neuronal irreversible pero también en los procesos de rescate del tejido dañado. La elevación del $[Ca^{2+}]_i$ activa una serie de enzimas: quinasas, proteasas, endonucleasas, fosfatasa y sintasa del óxido nítrico (NOS) que regulan la expresión de cascadas génicas que son responsables de la respuesta celular al daño cerebral (revisado (1) y referencias). Las principales citoquinas que intervienen en la inflamación inducida por el daño cerebral son la interleuquina 1 (IL-1), el factor de necrosis tumoral ($TNF\alpha$), y la interleuquina-6 (IL-6). Así mismo, el gen de la ciclooxigenasa 2 (Cox-2) aumenta tras la lesión (2,3). Nuestros trabajos han mostrado que la producción de $TNF\alpha$ en células neurales y en cultivos primarios de neuronas está mediada por calcio (4). Además, resultados del laboratorio han mostrado que la producción de enzimas como la Cox-2, en cultivos primarios de astrocitos de rata, es regulada por el calcio e inhibida por Ciclosporina A (CsA) (inhibidor de la Calcineurina (CN)) (1). Dilucidar las vías de señalización calcio-dependiente en las células cerebrales implicadas y el conocimiento de alteraciones del metabolismo celular es de sumo interés, con el fin de caracterizar nuevos fármacos que inhiban de forma más específica esta cadena de reacciones tempranas y permita una mejor recuperación funcional del tejido.

La glía y en especial los astrocitos, desempeñan un papel fundamental en el proceso de daño cerebral, tanto en el establecimiento de la lesión definitiva como en la reparación tisular (revisado en (5,6)). En situaciones fisiológicas los astrocitos regulan la acción neurotransmisora del glutamato. Sin embargo, en situaciones de daño neuronal, los astrocitos y la microglía, se han implicado en el desencadenamiento de la cascada pro-inflamatoria (revisado en (7)). Cuando existe un daño del cerebro, las células gliales, fundamentalmente astrocitos, sufren un proceso de hipertrofia y proliferación conocido con el nombre de gliosis reactiva, que se ha relacionado con mecanismos de neuroprotección y reparación de la lesión. Es sabido también, que una astrogliosis excesiva puede ser devastador para la recuperación de tejido nervioso, debido a la formación de la cicatriz glial y a la producción de la temida inflamación cerebral.

La Calcineurina (CN) es una fosfatasa dependiente de Ca^{2+} y Calmodulina que fue descubierta en tejido nervioso, es en este tejido en el que se encuentra en mayor abundancia (8). Posteriormente, se ha descrito su presencia en la mayoría de los tejidos estudiados revisado en (9,10). En el cerebro, la CN se expresa primordialmente en neuronas y solamente de forma débil o inexistente en astrocitos (11). Sin embargo, se ha demostrado que tras el daño isquémico, hay una regulación positiva de la subunidad A que es expresada en astrocitos activados (12). En el laboratorio

rio, hemos descrito que tanto la subunidad A como la B está presente en cultivos primarios de astrocitos (13). El papel de la CN ha sido extensivamente estudiado en células del sistema inmune, ya que es la diana de dos de las drogas inmunosupresoras más utilizadas en clínica: la Ciclosporina A (CsA) y el FK506 (14). La CN en células T tiene un papel muy importante en la regulación de la familia de factores de transcripción NFAT (Nuclear Factor Activated T cell) (revisado en (15,16)). Un trabajo reciente ha mostrado que la expresión de una Calcineurina constitutivamente activa en los astrocitos, tiene un papel regulador de la apoptosis neuronal en respuesta a estímulos pro-inflamatorios (17). Así mismo, se ha descrito que la CN controla procesos fisiológicos como son: la regulación de la plasticidad sináptica en el hipocampo, el desarrollo del corazón y la diferenciación del músculo esquelético y cardíaco entre otros (revisado en (9,18)).

Se ha comprobado que la ruta de señalización Ca^{2+} /CN/NFAT puede ser activada en el sistema nervioso central (19-21). Además, la vía CN/NFAT es necesaria para el crecimiento axonal durante el desarrollo del ratón (22). La proteína Rcan1-4 es un regulador endógeno de la cascada de señalización CN/NFAT (23). Nuestros resultados previos y de otros laboratorios, han mostrado que la proteína Rcan1-4 es un "sensor" de la actividad de la ruta Ca /CN/NFAT en distintos tipos celulares (13,24). En este estudio hemos analizado la existencia de la expresión de la proteína Rcan1-4 en los procesos de daño cerebral, y hemos investigado el papel de la sobre-expresión de esta proteína en células astrogliales.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

Cultivos celulares y reactivos. Los cultivos primarios de astrocitos se obtuvieron a partir de las cortezas cerebrales de ratas neonatas Wistar siguiendo protocolos ya descritos y tal como se detalla en (13). A los 17-20 días, los cultivos fueron testados para analizar su pureza mediante análisis inmunohistoquímicos con el marcador celular para astrocitos: *Glial Fibrillary Acidic Protein* (GFAP). Todos los cultivos utilizados en este trabajo tienen una pureza de más del 98% de tinción positiva para el marcador GFAP. El ionóforo de Ca^{2+} A23187 (Calbiochem), Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) de Sigma y CsA de LC Laboratories (Woburn, MA).

Modelo de daño cerebral en rata. Todos los procedimientos animales fueron realizados siguiendo las leyes de la Comunidad Europea en esta materia (86/609/ECC) y los procedimientos han sido aprobados por el comité ético del Instituto de Salud Carlos III. Ratas macho Fischer de (275-300g) fueron anestesiadas con isoflurano 1.5% en una mezcla de 70% nitrógeno/30% oxígeno. El procedimiento quirúrgico consiste en la realización de una pequeña craneotomía con la utilización de un taladro de dentista, sobre la región del tronco de la arteria cerebral media (MCA en inglés), por encima de la fisura rinal. En aquellos animales en los que se provocó una isquemia del tejido

adicional la MCA fue expuesta y ocluida mediante ligación con sutura 7-0 durante los tiempos indicados en cada caso. La oclusión fue realizada justo antes de la bifurcación entre las ramas parietal y frontal de la MCA. La arteria femoral fue canulada para la monitorización continuada de la presión arterial y se obtuvieron muestras de sangre para el análisis del pH, gases y glucosa. La temperatura de los animales se mantuvo a $36,5 \pm 0.5^\circ C$ durante todo el procedimiento. La interrupción del flujo sanguíneo fue confirmada en la lupa. Para la obtención de ARN y proteínas, el tejido procedente de la corteza cerebral de las zonas dañada después de 4 horas de la craneotomía, sometidas a isquemia (I) y sus respectivos contralaterales (C), fueron disecadas y congeladas rápidamente hasta su uso.

Modelo celular de hipoxia in vitro. Cultivos confluentes de astrocitos primarios se incubaron en una cámara de hipoxia (COY Laborarty products) con un nivel de oxígeno del 3% durante distintos tiempos (desde 30min a 4 horas). La lisis celular se realizó dentro de la cámara.

Lisis celular y análisis por Western. La obtención de extractos celulares totales procedentes de cultivos primarios fue realizada como se describe en (13). Cuando se utilizó tejido, las zonas cerebrales disecadas se homogenizaron en un buffer hipertónico como en el caso anterior. Las proteínas de los lisados (50-100 μ g) se separaron en SDS-PAGE y posteriormente fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa como se describe en (25). Se utilizaron los siguiente anticuerpos: anti- α tubulina (Sigma), monoclonal Rcan1-4 descrito en (24), policlonal anti-NFATc3 (Sta Cruz). Todos los anticuerpos fueron utilizados a una dilución 1:1000, con excepción del anti- α tubulina, que se diluyó 1:40 000.

Aislamiento de ARN, transcripción reversa y análisis de PCR en tiempo real. El ARN total procedente de los cultivos primarios se obtuvo como en (13), siguiendo los mismos pasos en el caso de tejidos del cerebro. El procedimiento para determinar la expresión diferencial de los genes por RT-PCR como en (13). Los transcritos específicos para los distintos genes fueron analizados mediante la tecnología TaqMan, siguiendo los protocolos recomendados por Applied Biosystems. El transcrito del ARNr 18S fue utilizado como control endógeno para normalizar la cantidad de ARN entre todas las muestras. La cantidad de ARNm diana fue estimada siguiendo el método de cuantificación relativa $2^{-\Delta\Delta CT}$ descrito por (26). Se calcularon las relaciones entre los ARNm de las células estimuladas frente a las células controles no estimuladas. Los valores se representan como la media \pm D.S. de triplicados de un experimento representativo a partir de un mínimo de tres experimentos independientes.

Infecciones Adenovirales de astrocitos. Los vectores adenovirales utilizados en este trabajo han sido descritos anteriormente (24). Estos vectores fueron producidos y utilizados siguiendo protocolos estándares, la expresión de proteínas exógenas fue monitorizada mediante *Western blot*.

Citometría de flujo y análisis de ciclo celular. Tras los tratamientos las células se tripsinizaron y recogieron in-

cluidos los sobrenadantes. Un millón de células se resuspendieron en 0.25% de paraformaldehído (PFA) en PBS durante 20 minutos, tras lavarlas se fijaron en etanol al 70% a -20°C. Posteriormente se incubaron 30 minutos en oscuridad con PBS al que se le añadió yoduro de propicio al 0.003% (Sigma Aldrich) y RNAsa 100 µg/ml (Sigma Aldrich) para degradar el RNA de las células. A continuación se analizaron en el citómetro (Cyan MLE Dako Cytomation).

Análisis de ensayo de cierre de herida "in vitro" (Wound Healing).

Los astrocitos primarios se crecieron hasta confluencia en placas de 6 pocillos. Las incisiones se realizaron con una punta de micropipeta de menos de 1 mm de grosor. El cierre de herida se monitorizó por videomicroscopía, tomando imágenes en campo claro a intervalos de 6 horas durante 72 horas, en un microscopio Nikon (*Wide-field*) al que se le ha acoplado una cámara para mantener la temperatura y la concentración de CO₂ adecuada para las células. El área migrada fue calculada restando el área de los bordes de la incisión a los distintos tiempos del área inicial medida a tiempo 0. Estos análisis estadísticos se están llevando a cabo actualmente.

4. RESULTADOS

El objetivo de nuestro trabajo ha sido estudiar si la vía de activación calcio/ Calcineurina/NFAT (Ca/CN/NFAT) es activada en los procesos de daño cerebral. Para ello, hemos analizado la expresión de la proteína Rcan1-4 (Regulador de Calcineurina), que nuestro grupo y otros habían demostrado previamente es un buen "sensor" de la actividad de la ruta en diferentes tipos celulares. Utilizando el modelo de daño cerebral en rata (ver métodos), se recogieron muestras de tejido de la corteza cerebral tanto las zonas en donde se había llevado a cabo la craniectomía (ipsilateral, I, carril 1), como en la zona contraria del cerebro donde no se había producido el daño, que fue utilizada como control (contralateral, C). En las muestras en las que

después de la craniectomía se llevo a cabo la isquemia del tejido a distintos tiempos, se observó un aumento en la expresión endógena de Rcan1-4 en la zona ipsilateral (I) al daño, comparada con la zona contralateral (C) del mismo animal. Las proteínas totales de los tejidos cerebrales de ambas zonas, C e I, fueron obtenidos a distintos tiempos y analizados mediante la técnica de *Western blot* utilizando anticuerpos específicos para Rcan1-4. Como control de carga se utilizó la α -tubulina. Hemos podido comprobar que Rcan1-4, el sensor de la vía Ca/CN/NFAT, se expresa a nivel de proteína en el tejido cerebral sometido a hipoxia (Fig. 1, carriles 3, 5 y 7) pero no en el contralateral (Fig. 1, carriles 2, 4 y 6). En aquellos cerebros en donde se ha producido sólo la craniectomía no se observó ningún aumento significativo de la expresión de la proteína Rcan1-4, tanto en la zona contralateral (datos no mostrados) como en la zona ipsilateral después de 4 horas tras el daño cerebral (Fig. 1, carril1).

En el laboratorio hemos mimetizando experimentalmente *in vitro* la hipoxia que se produce en el tejido tras un daño. Para ello, los astrocitos primarios de rata fueron sometidos a distintos tiempos de hipoxia que variaron entre 30 minutos y 4 horas. La expresión endógena de la proteína Rcan1-4 fue analizada mediante la técnica de *Western blot*. Los aumentos en la expresión de los niveles de Rcan1-4 fue muy temprana, observándose en los primeros 30 minutos después de la hipoxia. Como control positivo de la estimulación de la vía Ca/CN/NFAT se utilizó la estimulación farmacológica con esteres de forbol como el PMA combinado con ionóforo de calcio (Plo), esta combinación ha sido descrita (13) como un activador muy potente de la ruta tal y como se observa en la Fig. 2, carril 6. La respuesta a hipoxia es transitoria, ya que después de 6 horas de hipoxia los niveles de Rcan1-4 decaen después de las dos horas de hipoxia (Fig. 2, carril 4 y 5). Esta disminución en la expresión de la proteína Rcan1-4 es paralela a la re-fosforilación del factor de transcripción NFATc3 (datos no mostrados). El aumento de la expresión de Rcan1-4 por hipoxia en astrocitos es observada a nivel de transcripcional, ya que se observa una acumulación

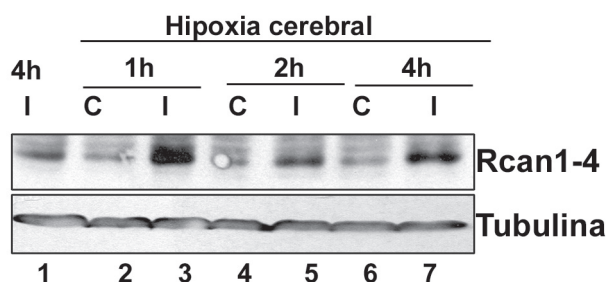


Fig. 1. Expresión de la proteína Rcan1-4 en el modelo de daño cerebral "in vivo". La expresión de la proteína endógena Rcan1-4 mediante la técnica de inmunoblot con anticuerpos específicos para Rcan1-4 y utilizando α -tubulina como control de carga. Las proteínas fueron obtenidas de la zona dañada por la craniectomía, ipsilateral (I) y de la zona correspondiente en el otro hemisferio cerebral, contralateral (C). Las muestras fueron recogidas 4 horas después de la craniectomía (carril 1), o muestras en las que además de la craniectomía se le había practicado la ligación de la arteria cerebral media (MCA). En los casos en los que la oclusión fue llevada a cabo, se recogieron a las 1, 2 y 4 horas después de la ligación. (n=3, cada grupo). La misma cantidad de proteína (100 µg) fue analizada mediante inmunoblot. Las membranas son representativas de tres experimentos independientes.

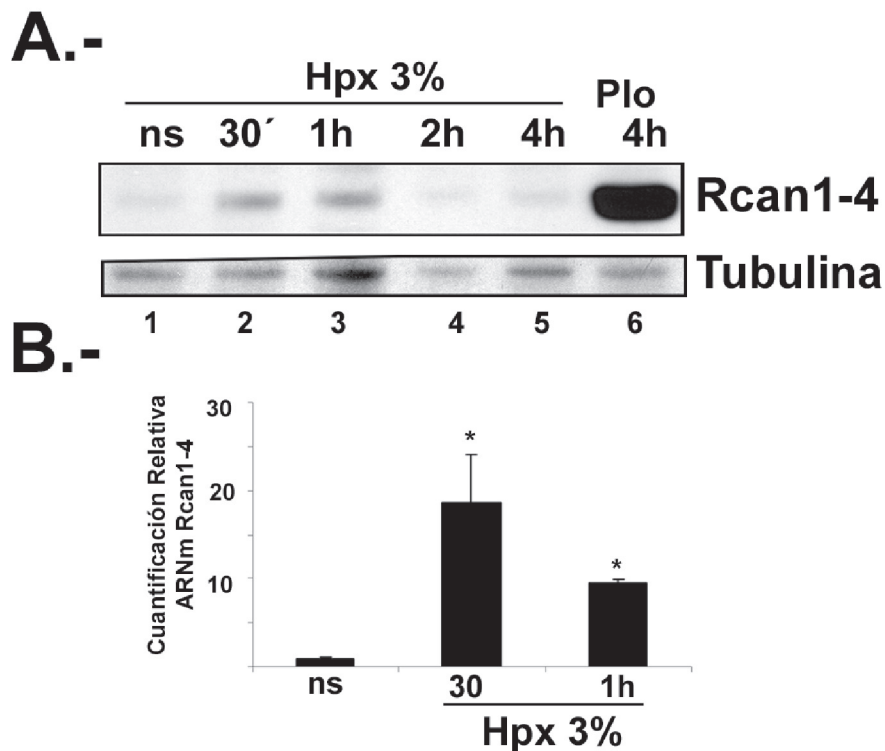


Fig. 2. La retirada de oxígeno induce la expresión de la proteína y el ARNm de Rcan1-4 en cultivos primarios de astrocitos. (A), Inmunoblots mostrando los niveles de Rcan1-4 endógeno, con expresión de α -tubulina como control de carga. Astrocitos primarios corticales de rata se dejaron sin estimular (ns, carril 1) o se sometieron a retirada de oxígeno (3% Hpx) durante distintos tiempos: 30' a 4 h (carril 2 al 5). Células tratadas con PMA más ionóforo de calcio (Plo), fueron utilizadas como control positivo. (B), Cultivos primarios de astrocitos de ratón fueron tratados de manera paralela a como se ha descrito en (A). La cuantificación relativa del ARNm específico para Rcan1-4 se realizó mediante TaqMan RT-PCR como se describe en Métodos. El ARNm específico de Rcan1-4 se cuantificó en unidades arbitrarias normalizadas a la expresión del gen 18 S rRNA. Los datos son expresados como cuantificación relativa comparada con las células control no tratadas (ns), a las cuales se le asignó un valor de 1. Los resultados mostrados son representativos de un mínimo de 3 realizados, y los valores son la media \pm DS de triplicados de determinaciones RT-PCR para cada condición. * $P < 0.05$ (ANOVA) versus ns.

del ARN mensajero específico de Rcan1-4 temprana, 30 minutos después de la hipoxia (Fig. 2B).

Una vez que hemos comprobado que en el tejido cerebral en hipoxia tiene lugar una acumulación de la proteína Rcan1-4 (Fig. 1) y que esta acumulación parece ser producida en parte por las células gliales en respuesta a hipoxia (Fig. 2), nos preguntamos cual es el papel de la acumulación de Rcan1-4 en estas células. Para estudiar este fenómeno, hemos puesto a punto la infección de cultivos celulares primarios de astrocitos de rata con vectores adenovirales. Estos vectores codifican bi-cistronicamente las proteínas Rcan1-4 humana y la proteína fluorescente GFP (Ad GFP + Rcan1-4) (24). Como control se utilizó un vector adenoviral que expresa la proteína GFP sólo (Ad GFP). La eficiencia de transducción fue analizada por análisis de FACS (Flow Activated Cell Sorting) (datos no mostrados) y por microscopia de fluorescencia de las células GFP positivas (Fig. 3A). Mediante ambas técnicas el número de células que expresan el gen exógeno fue mayor del 80% en todos los casos analizados. Así mismo, se analizaron los niveles de sobre-expresión de Rcan1-4 transducido en estas células mediante *Western blot* (Fig. 3B). La expresión de la proteína Rcan1-4 exógena es semejante a la obtenida mediante el tratamiento farmacológico de los astrocitos con ésteres de forbol (PMA), más el ionóforo de calcio (Io),

(Plo). Como era de esperar, la expresión exógena de Rcan1-4 no fue inhibida por el inhibidor de Calcineurina, Ciclosporina A (CsA), pero sí la expresión endógena producida por el tratamiento con Plo.

El siguiente paso ha sido el estudio del efecto sobre el ciclo celular de la sobreexpresión de esta proteína en células gliales, analizado por FACS. Las células gliales que expresan la proteína Rcan1-4 de forma constitutiva no presentaron mayor susceptibilidad a morir. Analizamos células no infectadas y células infectadas con el adeno control que sólo expresa GFP, en comparación con células que expresan las proteínas GFP más Rcan1-4. No existen diferencias entre ambas poblaciones ni en el recuento de células ni en las medidas sucesivas de ciclo celular (Fig. 4B).

Una de las causas de lesión más frecuentes que producen daño cerebral es el ocasionado por trauma mecánico. Para mimetizar este modelo de daño mecánico en el laboratorio, hemos puesto a punto un modelos de cierre de herida ó "*Wound healing*". Cultivos celulares de astrocitos primarios fueron mantenidos en placas de cultivo hasta que llegan a confluencia. En estas condiciones, se realiza una herida en la monocapa con la ayuda de una punta de cultivo estéril (Fig. 4A). El cierre de la herida fue monitorizado por video microscopia. Las imágenes mues-

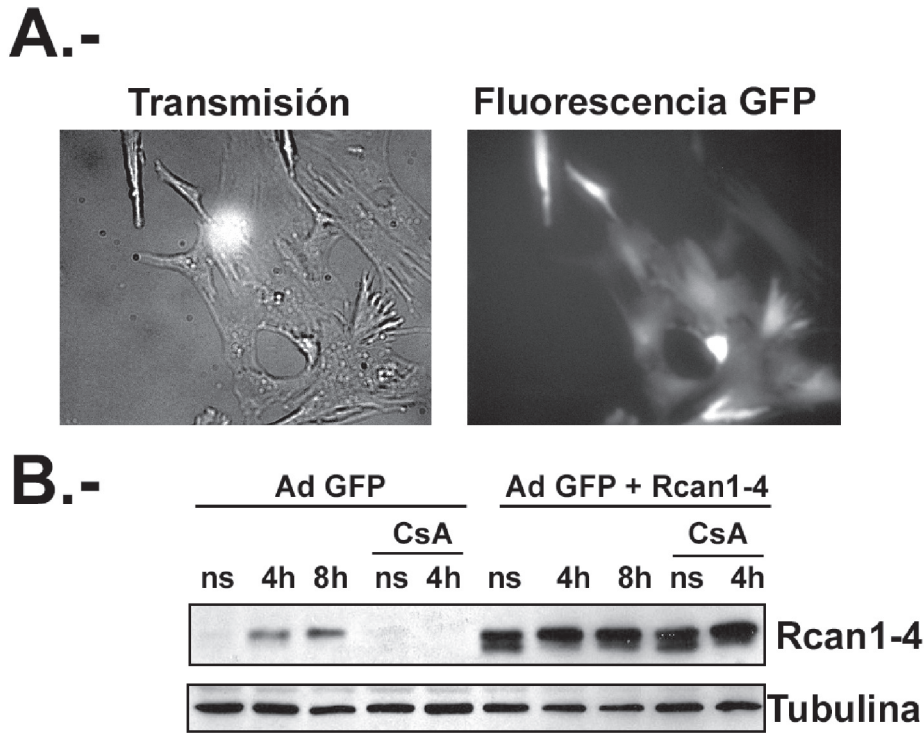


Fig. 3. Expresión exógena de la proteína Rcan1-4 en astrocitos primarios de rata. Los astrocitos fueron infectados con vectores adenovirales que codifican para la proteína verde fluorescente GFP (Ad GFP), como control y virus que codifican para la expresión de GFP y Rcan1-4. Después de 48 horas, ambos tipos celulares fueron dejados hasta quiescencia y no estimulados (ns), ó estimulados con PMA más lo (Plo) durante 4 ó 8 h. (A), Análisis de fluorescencia de la proteína GFP. (B) Los Inmunoblots muestran la expresión de Rcan1-4 endógena frente a la exógena en cada tipo celular. Como control de carga se utilizó el α -tubulina.

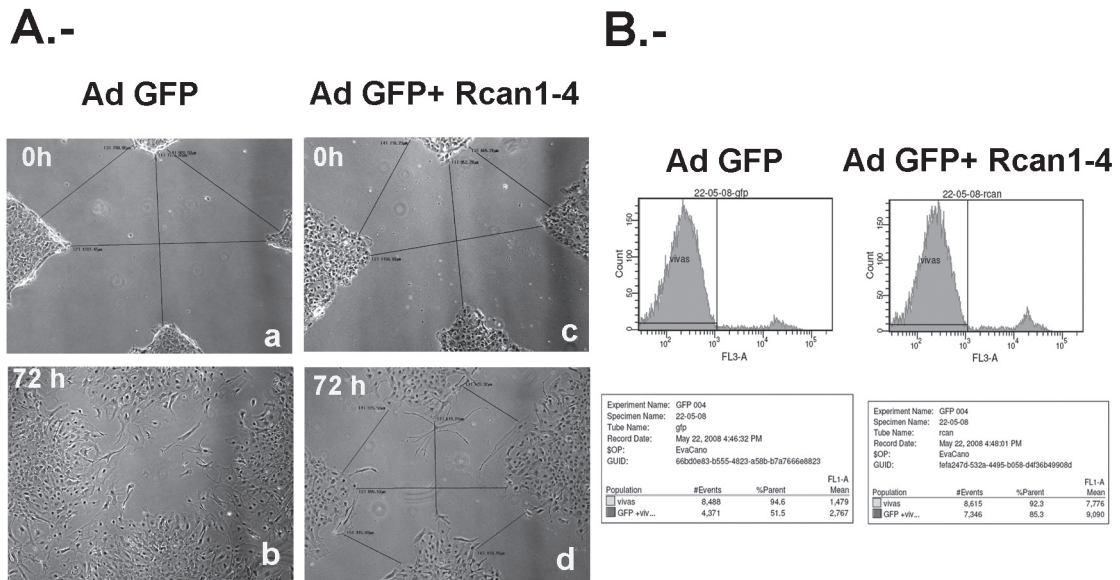


Fig. 4. La migración direccional parece estar inhibida por la sobre-expresión de la proteína Rcan1-4 en astrocitos primarios. (A) Imágenes por video-microscopía del cierre de la herida en una monocapa de astrocitos primarios. Las imágenes muestran una herida representativa de astrocitos que expresan la proteína GFP (Ad GFP) sola o junto con la proteína exógena Rcan1-4 (Ad GFP+Rcan1-4). Se muestra los fotogramas de los cultivos a tiempo 0 (0h), y una vez transcurridos 72 horas. (B) Análisis por citometría de astrocitos transducidos con GFP (Ad GFP) ó con GFP más Rcan1-4 (Ad GFP+Rcan1-4). Las células fueron incubadas en presencia de ioduro de propidio, y el análisis del ciclo celular fue llevado a cabo mediante citometría de flujo.

tran una herida representativa de astrocitos que expresan la proteína GFP (Ad GFP) versus aquellos que expresan la proteína GFP más la proteína exógena Rcan1-4 (Ad GFP+Rcan1-4). Se muestra los fotogramas de los cultivos

a tiempo 0 (0h), y una vez transcurridos 72 horas. Se analizaron 5 campos aleatorios y se observó una diferencia significativa en la velocidad de cierre de las heridas que estamos actualmente analizando.

5. DISCUSIÓN

En este trabajo hemos descrito que las células astrogliales expresan la proteína Rcan1-4, un regulador endógeno de la fosfatasa CN, en respuesta a la hipoxia que puede darse tras un daño cerebral, aunque no parece que esté activada por la respuesta inflamatoria que acontece después del daño mecánico (Fig. 1). Los astrocitos son capaces de producir factores como el VEGF, expresan distintas citoquinas y linfoquinas reguladoras del proceso inflamatorio del tejido, así como enzimas como la ciclooxigenasa 2 (Cox-2). Las principales citoquinas que intervienen en la inflamación producida por el daño cerebral son la interleuquina 1 (IL-1), el factor de necrosis tumoral (TNF α), y la interleuquina-6 (IL-6). Así mismo, el gen de la ciclooxigenasa 2 (Cox-2) aumenta tras la lesión (2,3). Nuestros trabajos han mostrado que la producción de TNF α en células neurales y en cultivos primarios de neuronas está mediada por calcio (4). Además, resultados del laboratorio han mostrado que en cultivos primarios de astrocitos de rata, la producción de enzimas como la Cox-2, es regulada por calcio e inhibidos por Ciclosporina A (CsA) (inhibidor de la CN) (17).

En estos momentos estamos llevando a cabo los experimentos para dilucidar si la sobre-expresión de la pro-

teína Rcan1-4 tiene algún papel en la migración de las células gliales, y por lo tanto pueden cerrar la herida de una manera más ó menos eficiente. Aunque los resultados que tenemos son preliminares, parece ser que la sobre-expresión de Rcan1-4 en cultivos primarios de astrocitos impide la migración de estos, y retrasa el cierre de las heridas. Estudios más detallados a este respecto son necesarios para entender cual es el significado de este fenotipo en el modelo de daño mecánico cerebral. Estos estudios nos ayudarán a conocer si el papel de Rcan1-4 es capaz de mejorar o empeorar el resultado final después del daño traumático, y por lo tanto, si sería conveniente suprimir ó por el contrario potenciar, la expresión de esta vía, y por extensión la vía CN/NFAT.

Es por ello, que dilucidar las vías de señalización en las células nerviosas implicadas y el conocimiento de alteraciones del metabolismo celular es de sumo interés, puesto que permite desarrollar fármacos que inhiban de forma más específica esta cadena de reacciones tempranas y permita una mejor recuperación funcional del tejido. En estos momentos estamos investigando cual es el papel en el establecimiento de la lesión en animales *knock out* para Rcan1, así como el posible papel de la eliminación y sobreexpresión de esta proteína en el proceso de daño cerebral.

6. BIBLIOGRAFÍA

1. Yi, J.H., Park, S.W., Kapadia, R. and Vemuganti, R. (2007) Role of transcription factors in mediating post-ischemic cerebral inflammation and brain damage. *Neurochem Int*, **50**, 1014-1027.
2. Nogawa, S., Zhang, F., Ross, M.E. and Iadecola, C. (1997) Cyclo-oxygenase-2 gene expression in neurons contributes to ischemic brain damage. *J Neurosci*, **17**, 2746-2755.
3. Sairanen, T., Ristimäki, A., Karjalainen-Lindsberg, M.L., Paetau, A., Kaste, M. and Lindsberg, P.J. (1998) Cyclooxygenase-2 is induced globally in infarcted human brain. *Ann Neurol*, **43**, 738-747.
4. Canellada, A., Cano, E., Sanchez-Ruiloba, L., Zafra, F. and Redondo, J.M. (2006) Calcium-dependent expression of TNF-alpha in neural cells is mediated by the calcineurin/NFAT pathway. *Mol Cell Neurosci*, **31**, 692-701.
5. Panickar, K.S. and Norenberg, M.D. (2005) Astrocytes in cerebral ischemic injury: morphological and general considerations. *Glia*, **50**, 287-298.
6. Trendelenburg, G. and Dirnagl, U. (2005) Neuroprotective role of astrocytes in cerebral ischemia: focus on ischemic preconditioning. *Glia*, **50**, 307-320.
7. Dong, Y. and Benveniste, E.N. (2001) Immune function of astrocytes. *Glia*, **36**, 180-190.
8. Klee, C.B., Crouch, T.H. and Krinks, M.H. (1979) Calcineurin: a calcium- and calmodulin-binding protein of the nervous system. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **76**, 6270-6273.
9. Mansuy, I.M. (2003) Calcineurin in memory and bidirectional plasticity. *Biochem Biophys Res Commun*, **311**, 1195-1208.
10. Martínez-Martínez, S. and Redondo, J.M. (2004) Inhibitors of the calcineurin/NFAT pathway. *Curr Med Chem*, **11**, 997-1007.
11. Goto, S., Yamada, K., Yoshikawa, M. and Ushio, Y. (1995) Mosaic organization of calcineurin immunoreactivity in the adult cat striatum. *Neurosci Lett*, **198**, 25-28.
12. Hashimoto, T., Kawamata, T., Saito, N., Sasaki, M., Nakai, M., Niu, S., Taniguchi, T., Terashima, A., Yasuda, M., Maeda, K. *et al.* (1998) Isoform-specific redistribution of calcineurin A alpha and A beta in the hippocampal CA1 region of gerbils after transient ischemia. *J Neurochem*, **70**, 1289-1298.
13. Canellada, A., Ramirez, B.G., Minami, T., Redondo, J.M. and Cano, E. (2008) Calcium/calcineurin signaling in primary cortical astrocyte cultures: Rcan1-4 and cyclooxygenase-2 as NFAT target genes. *Glia*, **56**, 709-722.
14. Liu, J., Farmer, J.D., Jr., Lane, W.S., Friedman, J., Weissman, I. and Schreiber, S.L. (1991) Calcineurin is a common target of cyclophilin-cyclosporin A and FKBP-FK506 complexes. *Cell*, **66**, 807-815.
15. Crabtree, G.R. (2001) Calcium, calcineurin, and the control of transcription. *J Biol Chem*, **276**, 2313-2316.
16. Rao, A. (1991) Signaling mechanisms in T cells. *Crit Rev Immunol*, **10**, 495-519.
17. Fernandez, A.M., Fernandez, S., Carrero, P., Garcia-Garcia, M. and Torres-Aleman, I. (2007) Calcineurin in reactive astrocytes plays a key role in the interplay between proinflammatory and anti-inflammatory signals. *J Neurosci*, **27**, 8745-8756.
18. Shibasaki, F., Hallin, U. and Uchino, H. (2002) Calcineurin as a multifunctional regulator. *J Biochem*, **131**, 1-15.
19. Genazzani, A.A., Carafoli, E. and Guerini, D. (1999) Calcineurin controls inositol 1,4,5-trisphosphate type 1 receptor expression in neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 5797-5801.

20. Graef, I.A., Mermelstein, P.G., Stankunas, K., Neilson, J.R., Deisseroth, K., Tsien, R.W. and Crabtree, G.R. (1999) L-type calcium channels and GSK-3 regulate the activity of NF-ATc4 in hippocampal neurons. *Nature*, **401**, 703-708.
21. Groth, R.D. and Mermelstein, P.G. (2003) Brain-derived neurotrophic factor activation of NFAT (nuclear factor of activated T-cells)-dependent transcription: a role for the transcription factor NFATc4 in neurotrophin-mediated gene expression. *J Neurosci*, **23**, 8125-8134.
22. Graef, I.A., Wang, F., Charron, F., Chen, L., Neilson, J., Tessier-Lavigne, M. and Crabtree, G.R. (2003) Neurotrophins and netrins require calcineurin/NFAT signaling to stimulate outgrowth of embryonic axons. *Cell*, **113**, 657-670.
23. Davies, K.J., Ermak, G., Rothermel, B.A., Pritchard, M., Heitman, J., Ahn, J., Henrique-Silva, F., Crawford, D., Canaider, S., Strippoli, P. *et al.* (2007) Renaming the DSCR1/Adapt78 gene family as RCAN: regulators of calcineurin. *FASEB J*, **21**, 3023-3028.
24. Minami, T., Horiuchi, K., Miura, M., Abid, M.R., Takabe, W., Noguchi, N., Kohro, T., Ge, X., Aburatani, H., Hamakubo, T. *et al.* (2004) Vascular endothelial growth factor- and thrombin-induced termination factor, Down syndrome critical region-1, attenuates endothelial cell proliferation and angiogenesis. *J Biol Chem*, **279**, 50537-50554.
25. Cano, E., Canellada, A., Minami, T., Iglesias, T. and Redondo, J.M. (2005) Depolarization of neural cells induces transcription of the Down syndrome critical region 1 isoform 4 via a calcineurin/nuclear factor of activated T cells-dependent pathway. *J Biol Chem*, **280**, 29435-29443.
26. Livak, K.J. and Schmittgen, T.D. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, **25**, 402-408.

Agradecimientos

Este trabajo ha sido realizado en el Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares (CNIC), en el Instituto de Salud Carlos III. CNIC es financiado por el ministerio de Ciencia e Innovación y la Fundación pro-CNIC. Este trabajo ha sido posible gracias a la financiación recibida del Ministerio de Sanidad y Consumo, (PI060491) y una ayuda de la Fundación MAPFRE 2007.