

---

Proyecto Fin de Máster  
Máster en Neurociencias

---

**Efectos de la modulación del receptor nicotínico  $\alpha 7$  en la respuesta inflamatoria tras la isquemia cerebral: infiltración leucocitaria e integridad de la barrera hematoencefálica.**

AUTORA:

**Laura Aguado Santos**

DIRECTORES:

**Abraham Martín Muñoz**

**María Domercq García**

## Resumen

En las diferentes etapas del infarto cerebral, la inflamación es de vital importancia. Por ello, el control de la respuesta inflamatoria mediante la modulación del receptor nicotínico  $\alpha 7$  puede ser decisivo. La estimulación de los receptores nicotínicos  $\alpha 7$  tiene un efecto modulador de la inflamación en el cerebro y, por lo tanto, los agonistas específicos del receptor  $\alpha 7$  podrían significar una novedosa terapia para los pacientes con ictus. Por este motivo, el presente estudio pretende determinar el potencial terapéutico del receptor nicotínico  $\alpha 7$  en la respuesta inflamatoria en un modelo de isquemia cerebral en rata mediante (i) la caracterización de la respuesta inflamatoria y (ii) la valoración de la integridad de la barrera hematoencefálica mediante la expresión de metaloproteinasas de matriz extracelular. Los resultados de este estudio obtenidos mediante inmunohistoquímica y zimografía en gel han mostrado que la activación del receptor  $\alpha 7$  con el agonista PHA 568487 disminuye la respuesta inflamatoria. Asimismo, se observó un incremento de la expresión de la metaloproteinasa 2 (MMP-2), caracterizada por tener un papel protector, tras la primera semana de evolución de la isquemia cerebral. Por lo tanto, consideramos que la correcta caracterización del papel del sistema nicotínico sobre la respuesta inflamatoria, así como la expresión de metaloproteinasas de matriz es esencial para el desarrollo de nuevas vías terapéuticas que puedan modular la respuesta inmune en patologías neurológicas como el ictus.

# Índice

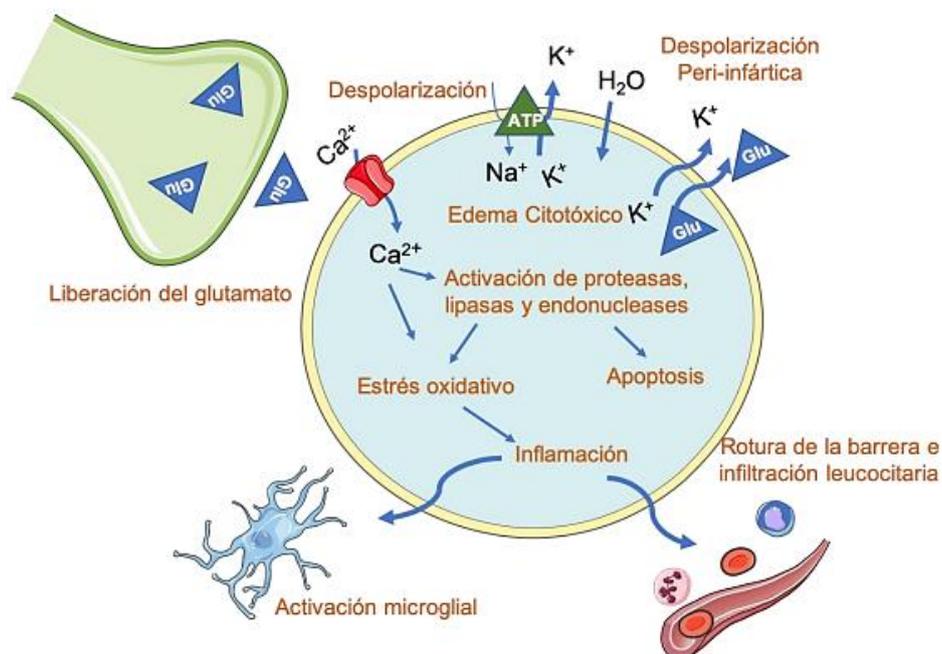
<b>1. Introducción.....</b>	<b>4</b>
<b>1.1 Ictus isquémico .....</b>	<b>4</b>
1.1.1 Tratamiento .....	5
1.1.2 Lesión isquémica post-reperfusión .....	5
<b>1.2 Neuroinflamación .....</b>	<b>5</b>
1.2.1 Microglía .....	6
1.2.2 Leucocitos .....	6
1.2.3 Metaloproteinasas de matriz (MMP).....	7
<b>1.3 Receptor nicotínico <math>\alpha 7</math> .....</b>	<b>8</b>
<b>1.4 Proyecto.....</b>	<b>9</b>
1.4.1 Hipótesis principal y objetivos .....	9
<b>2. Material y métodos .....</b>	<b>10</b>
<b>2.1 Modelo animal.....</b>	<b>10</b>
<b>2.2 Isquemia cerebral y tratamiento.....</b>	<b>10</b>
<b>2.3 Estudios <i>ex vivo</i>: IHQ y zimografía .....</b>	<b>11</b>
2.3.1 Inmunohistoquímica (IHQ) .....	11
2.3.2 Zimografía .....	12
<b>2.4 Análisis estadístico.....</b>	<b>13</b>
<b>3. Resultados .....</b>	<b>13</b>
<b>3.1 Respuesta inflamatoria .....</b>	<b>13</b>
<b>3.2 Infiltración leucocitaria .....</b>	<b>15</b>
<b>3.3 Actividad de MMP-9 y 2.....</b>	<b>16</b>
<b>4. Discusión .....</b>	<b>17</b>
<b>4.1 La activación del nAChR <math>\alpha 7</math> atenúa la neuroinflamación .....</b>	<b>17</b>
<b>4.2 Efecto de la modulación del nAChR <math>\alpha 7</math> en la infiltración leucocitaria .....</b>	<b>18</b>
<b>4.3 La activación del nAChR <math>\alpha 7</math> sobreactiva la MMP-2 .....</b>	<b>18</b>
<b>4.4 Conclusión.....</b>	<b>19</b>
<b>5. Bibliografía .....</b>	<b>19</b>

# 1. Introducción

## 1.1 Ictus isquémico

La isquemia cerebral es una de las principales causas de muerte y discapacidad en todo el mundo<sup>1-11</sup>, y el accidente cerebrovascular isquémico representa la forma más frecuente de accidente cerebrovascular<sup>1,11,12</sup>. El ictus isquémico es el resultado de la reducción permanente o transitoria del flujo sanguíneo cerebral<sup>8,10,13,14</sup>, que causa una privación de oxígeno y glucosa al tejido, y con ello la muerte celular<sup>3,8,14,15</sup>. En la mayoría de los casos, la oclusión es en una arteria cerebral, ya sea por un émbolo o por una trombosis local<sup>8,11,15</sup>. En la zona de tejido nervioso afectado cerca del vaso ocluido se pueden distinguir dos zonas: el núcleo del infarto (zona de severa isquemia)<sup>15</sup> y la penumbra (zona de isquemia moderada)<sup>15,16</sup>.

Los mecanismos moleculares que subyacen a la lesión del sistema nervioso central por el ictus isquémico son complejos<sup>3,4,7,17</sup>, principalmente debido a la activación de múltiples vías asociadas con la inflamación, el estrés oxidativo, el metabolismo energético y la excitotoxicidad, la formación de radicales libres<sup>3,9,14,17</sup>, la sobrecarga de calcio y la disfunción mitocondrial<sup>9,17</sup> (**Figura 1**). Además, se incrementa la producción de citocinas y quimiocinas, así como la adhesión y agregación de las células inflamatorias<sup>12</sup>. Otra de las complicaciones graves del ictus isquémico es el edema cerebral, que agrava el daño cerebral y promueve el deterioro clínico<sup>4,8</sup>. La mayor causa del edema es la pérdida de la integridad de la barrera hematoencefálica (BHE) que termina con la acumulación de agua en el cerebro<sup>4,15</sup> (**Figura 1**).



**Figura 1.** Descripción general simplificada de la cascada isquémica. El fallo energético conduce a la despolarización de las neuronas, y la activación de los receptores específicos de glutamato aumentan drásticamente el  $Ca^{2+}$ ,  $Na^+$  y  $Cl^-$  intracelular, mientras el  $K^+$  se libera al espacio extracelular. A través de los gradientes osmóticos que se crean el agua se desplaza al espacio intracelular provocando un edema citotóxico. Además, la entrada

de  $\text{Ca}^{+2}$  sobreactiva numerosos sistemas enzimáticos (proteasas, lipasas y endonucleasas), y genera radicales libres que dañan las membranas, las mitocondrias y el ADN provocando a su vez la muerte celular por apoptosis. Los radicales libres también inducen la formación de mediadores inflamatorios, que activan la microglía y provocan la rotura de la barrera hematoencefálica desencadenando la infiltración leucocitaria.

Los cambios hemodinámicos, metabólicos e iónicos, no afectan al territorio isquémico homogéneamente. En el núcleo del infarto, el flujo sanguíneo cerebral está muy por debajo de lo normal, y se desarrolla una despolarización permanente y anóxica. Las células mueren rápidamente por lipólisis, proteólisis, la desagregación de microtúbulos y la ruptura de la homeostasis iónica<sup>8</sup>. En la penumbra, sin embargo, el metabolismo energético está parcialmente preservado<sup>8,18</sup>, aunque sin tratamiento puede degenerar debido a la excitotoxicidad continua, inflamación post-isquémica y apoptosis. Es por eso que el objetivo de la neuroprotección es salvar la penumbra isquémica<sup>8,16</sup>.

### **1.1.1 Tratamiento**

Las opciones de tratamiento actualmente disponibles después de un accidente cerebrovascular se limitan al activador del plasminógeno tisular (tPA)<sup>1,11,12,19</sup> y al tratamiento endovascular con el único objetivo de recanalizar un vaso ocluido<sup>1,12</sup>. Sin embargo, estos tratamientos de recanalización solo son efectivos durante las primeras horas después del accidente<sup>1,11</sup>. Por eso, es de vital importancia la investigación sobre el desarrollo de nuevos compuestos para tratar el accidente cerebrovascular<sup>11</sup>.

### **1.1.2 Lesión isquémica post-reperfusión**

La lesión isquémica post-reperfusión es una distintiva manifestación clínica que afecta a muchos órganos, entre ellos el cerebro<sup>20</sup>. Iniciada por la lesión isquémica, aumenta la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS)<sup>14,20</sup>, empeora tanto la neuroinflamación<sup>5,13,14</sup> como la excitotoxicidad<sup>14</sup> provocando una sobrecarga de calcio intracelular y daño en las células endoteliales. Las etapas de reperfusión consecutivas, sin embargo, se caracterizan por el agravamiento de la lesión tisular, inflamación sistémica incontrolada e insuficiencia multiorgánica. En consecuencia, la eliminación de ROS, la reducción de la respuesta inflamatoria y la inhibición de la apoptosis celular son intervenciones importantes<sup>20</sup>.

## **1.2 Neuroinflamación**

La respuesta inflamatoria es un proceso crucial de la lesión del tejido cerebral durante las fases agudas del ictus isquémico<sup>4,5,21</sup>. La neuroinflamación ocurre rápidamente después del inicio de la isquemia y se extiende en las etapas agudas y subagudas de la enfermedad<sup>12,22</sup>. Además, se sabe que la inflamación tiene efectos tanto positivos como negativos<sup>10,22</sup>. Asimismo, si se prolonga mucho en el tiempo exacerba la lesión cerebral y pospone la recuperación<sup>4,12</sup>.

La neuroinflamación empieza como respuesta a las células necróticas y a la producción de ROS<sup>10</sup>, y una vez iniciada, se activa la microglía<sup>2,8,10,23</sup>. La microglía genera más citocinas proinflamatorias<sup>1,2,5,10,17,23</sup> que a su vez, conducen a la inducción de moléculas

de adhesión en la vasculatura cerebral<sup>1,10,12,17</sup>. Esto ocurre durante las primeras 24 horas después de la isquemia. Por otro lado, la regulación positiva de quimiocinas crea la quimiotaxis de las células inmunes circulantes, que se dirigen hacia el área isquémica (especialmente a la penumbra)<sup>2,10,13</sup>. Las moléculas de adhesión median la adhesión de los leucocitos al endotelio vascular<sup>1,10,17</sup>, que provoca la oclusión microvascular y la entrada de leucocitos al parénquima cerebral<sup>8,10,23</sup>. Las células inflamatorias liberan varios agentes citotóxicos como las metaloproteinasas de matriz (MMP), óxido nítrico<sup>10</sup>, y también son una fuente independiente de ROS<sup>5,10</sup>. Estas moléculas exacerban el daño de las células cerebrales y provocan la alteración de la matriz extracelular y la BHE<sup>10</sup>. Por todo esto, la neuroinflamación tras el ictus se considera un objetivo claro para el tratamiento de la isquemia cerebral<sup>8,10,12</sup>.

### **1.2.1 Microglía**

La microglía constituye aproximadamente el 5-10% de todas las células cerebrales<sup>10</sup> y son consideradas las células inmunitarias residentes en el cerebro, ya que modulan la actividad fagocítica y la respuesta inmunitaria del cerebro<sup>2,9,10</sup>. Estas células participan en la defensa del sistema nervioso contra las infecciones, y se activan en condiciones de trauma, isquemia y neurodegeneración<sup>10</sup>. La microglía activada experimenta una transformación morfológica desde un estado de reposo “ramificado” a un estado “ameboide” activo<sup>8,10,15,23</sup>, donde se vuelven virtualmente indistinguibles de macrófagos circulantes<sup>10</sup>. Gracias a sus propiedades fagocíticas, la microglía activa elimina los organismos extraños y las neuronas dañadas<sup>10,23</sup>.

Poco después del inicio del ictus isquémico, la microglía se activa y empieza el reclutamiento de monocitos y macrófagos circulantes mediante la liberación de mediadores proinflamatorios, como el factor de necrosis tumoral (TNF), el óxido nítrico, y el superóxido<sup>13</sup>. La activación de la microglía ejerce efectos tanto beneficiosos como perjudiciales en el accidente cerebrovascular, ya que se pueden polarizar en microglía proinflamatoria tipo 1 (M1) o en microglía antiinflamatoria tipo 2 (M2)<sup>1,9,12,13</sup>. Al inicio del ictus se encuentra como M2, y rápidamente durante la neuroinflamación cambia a M1<sup>9,12</sup>. Un marcador importante para ver la activación de la microglía es la proteína translocadora (TSPO), que está ubicada en la membrana mitocondrial externa, y es parte del poro de transición de la permeabilidad mitocondrial<sup>1</sup>. Los niveles de expresión basal son relativamente bajos en condiciones fisiológicas<sup>1,23</sup>, mientras que en presencia de estímulos inflamatorios se sobreexpresa en células gliales y macrófagos<sup>1</sup>.

### **1.2.2 Leucocitos**

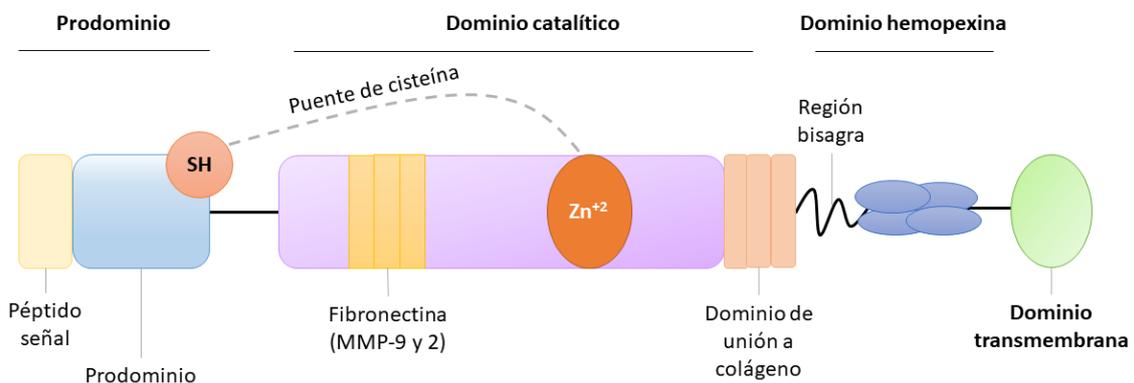
Los leucocitos promueven la lesión isquémica cerebral a través de varios mecanismos. Pueden adherirse al endotelio y obstruir la vasculatura, y así afectar al flujo sanguíneo local empeorando la situación<sup>1,8,10,24</sup>. Además, los leucocitos activados cerca de la superficie del endotelio también producen ROS tóxicos, proteasas, así como daños en los vasos sanguíneos y en el parénquima cerebral. Por otro lado, la activación de las fosfolipasas de los leucocitos provoca vasoconstricción y aumento de la agregación

plaquetaria. Por último, los leucocitos infiltrados secretan citocinas proinflamatorias y otras moléculas inmunes alrededor de la penumbra causando más daño neuronal<sup>10</sup>.

Después de la isquemia, los neutrófilos son el primer tipo leucocitario que se infiltra en el cerebro isquémico. Se han observado neutrófilos a las 4-6 horas tras el ictus, y se ha demostrado que agravan la lesión al producir mediadores inflamatorios<sup>10,13,20,25</sup>. Los linfocitos, por otra parte, se infiltran a los 3-6 días después del accidente cerebrovascular<sup>10</sup>, y parecen jugar un papel activo en la patogénesis de la enfermedad. Como los neutrófilos, los linfocitos también son capaces de producir citocinas proinflamatorias y sustancias citotóxicas perjudiciales<sup>10,13</sup>.

### 1.2.3 Metaloproteinasas de matriz (MMP)

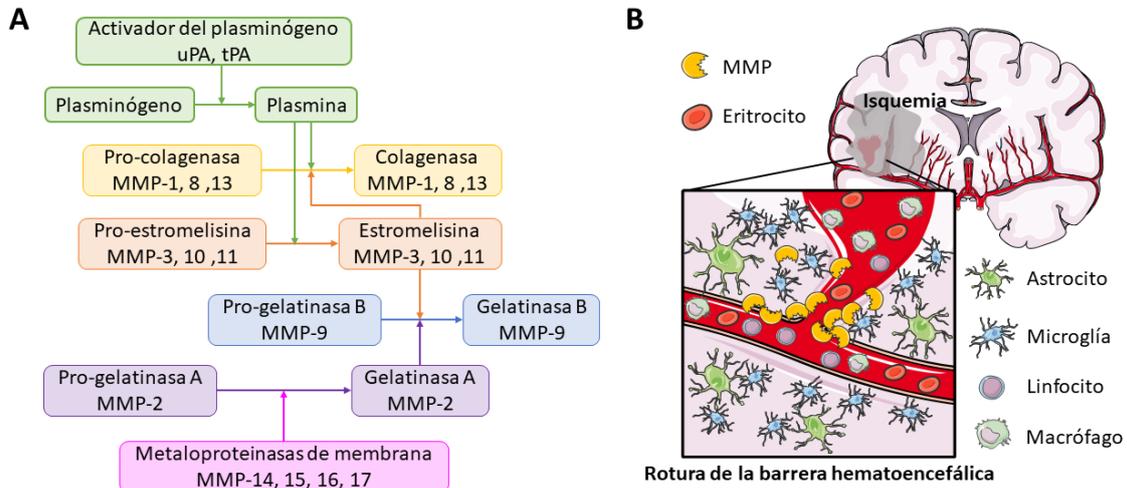
Las metaloproteinasas de matriz (MMP) son una gran familia de enzimas proteolíticas que degradan los componentes de la matriz extracelular<sup>1,7,21,26-31</sup>. Tienen una configuración estándar que consiste en una porción de propéptido con un interruptor de cisteína, una zona catalítica de zinc, un dominio hemopexina y la zona transmembrana<sup>21</sup> (**Figura 2**). Las MMP están secretadas en una forma latente que protege a la célula del daño<sup>1,21,31</sup>, y las citocinas son las responsables de activar los sitios de transcripción que conducen a la formación de esas formas latentes. Una vez activadas, generalmente, se desactivan rápidamente por los cuatro inhibidores tisulares para metaloproteinasas (TIMP)<sup>21</sup>.



**Figura 2.** Estructura representativa de la metaloproteinasas de matriz. Cuatro dominios principales: prodominio, dominio catalítico, dominio tipo hemopexina y dominio transmembrana.

Las enzimas constitutivas, como la MMP-2, se activan de una manera muy específica y actúan cerca del sitio de activación. Además, mantienen la integridad de las membranas basales evitando el crecimiento de la matriz extracelular<sup>21</sup>. La activación de MMP-2 implica un complejo trimolecular compuesto por la MMP-2, TIMP-2 y una metaloproteinasas de membrana como la MMP-14. Cuando las tres moléculas se unen, la MMP-14 activa la MMP-2 utilizando TIMP-2 como molécula puente<sup>21,31</sup> (**Figura 3A**). Debido a que la MMP-14 está unida a la membrana, la actividad de la MMP-2 está restringida a la región cercana al sitio de activación. Por otro lado, las enzimas inducibles, como la MMP-9, se mantienen en un estado inactivo hasta que comienza el proceso neuroinflamatorio, y se activan a través de la acción de radicales libres y otras enzimas.

Una vez se activan, no actúan cerca de la zona de activación, y conducen a un daño tisular más extenso<sup>21</sup>. La MMP-9 es activada por la MMP-2 activa y una estromelina como la MMP-3 activa, que se activa por nitrosilación y otras acciones de los radicales libres<sup>21,31</sup> (**Figura 3A**).



**Figura 3.** Las metaloproteinasas de matriz en el accidente cerebrovascular. **(A)** Cascada de proteasas que incluye las MMP. **(B)** Rotura de la barrera hematoencefálica después del ictus isquémico y liberación de las MMP.

El momento de la cascada de activación es fundamental para determinar el papel que las enzimas juegan durante el mantenimiento normal del tejido, de las lesiones y de la recuperación<sup>21</sup>. Debido a la naturaleza compleja de las interacciones, las MMP tienen múltiples roles participando en el proceso de lesión en las primeras etapas (**Figura 3B**) y contribuyendo a la recuperación durante las últimas<sup>7,21,26,30,32</sup>.

En las primeras fases después del ictus isquémico, la disregulación de las MMP se ha relacionado con un aumento de la alteración neurovascular y del daño cerebral<sup>21,26,30,32</sup>. En particular, las alteraciones mediadas por las MMP conducen a la disrupción de la barrera hematoencefálica<sup>1,7,21,26,27,30,32</sup>, edema cerebral, hemorragia<sup>1,21,26,27,32</sup>, infiltración leucocitaria<sup>21,27</sup> y a reacciones inflamatorias progresivas subyacentes a la pérdida de tejido cerebral<sup>21</sup> (**Figura 3B**). La MMP-9 domina la respuesta de esta fase<sup>1,7,26-29,31,32</sup>. A pesar de ello, tienen efectos beneficiosos durante la fase de recuperación, especialmente en la angiogénesis y en el restablecimiento del flujo sanguíneo. También en la neurogénesis<sup>7,21,26</sup> y la sinaptogénesis<sup>21</sup>. La MMP-2 es la principal metaloproteína en esta fase<sup>7,27,29</sup>, demostrando tener un papel neuroprotector en las fases tardías del ictus<sup>30</sup>. Por último, se ha visto que la inhibición de las MMP a largo plazo reduce la plasticidad neuronal, altera la formación de nuevos vasos y promueve la hemorragia y el daño tisular en la corteza peri-infarto<sup>21,26,27</sup>.

### 1.3 Receptor nicotínico $\alpha 7$

Los receptores nicotínicos (nAChRs) son canales catiónicos<sup>33,34</sup> que están compuestos por cinco subunidades estructurales ( $\alpha 2$ - $\alpha 10$  y  $\beta 2$ - $\beta 4$ ). Los más abundantes en el cerebro

de los mamíferos son los receptores heterómeros de  $\alpha 4$  y  $\beta 2$  y los receptores homómeros de  $\alpha 7$ <sup>33-37</sup>. Los nAChRs  $\alpha 7$  son receptores permeables al calcio<sup>20,37</sup>, y en el cerebro se expresan en una gran variedad de tipos celulares como las neuronas corticales, los astrocitos, la microglía, los precursores de los oligodendrocitos y las células endoteliales<sup>35</sup>.

Los nAChRs  $\alpha 7$  están relacionados con una gran cantidad de eventos fisiológicos como la locomoción, la atención<sup>35</sup>, el aprendizaje, la memoria<sup>33,35,36</sup>, y el procesamiento sensorial<sup>33</sup>. Sin embargo, también se ha visto una relación de estos receptores en distintas enfermedades mentales como la depresión, la ansiedad, la esquizofrenia<sup>33</sup>, el Parkinson, el Alzheimer<sup>4,36</sup>, el trastorno bipolar y en lesiones cerebrales traumáticas<sup>35</sup>. La estimulación de los nAChRs  $\alpha 7$  tiene un efecto neuroprotector en las enfermedades neurodegenerativas mencionadas<sup>20,35,36,38</sup>, así como en la isquemia cerebral<sup>2,5,14,35,36,39-41</sup> y en las hemorragias intracerebrales<sup>35,36</sup>. Por ello, los agonistas específicos del nAChR  $\alpha 7$  podrían significar una novedosa terapia para los pacientes con ictus isquémico<sup>4,40</sup>, mejorando así su recuperación<sup>4</sup>. Este efecto neuroprotector se ha relacionado con la supresión de la neuroinflamación gracias a la modulación de las células inmunitarias por la vía antiinflamatoria colinérgica<sup>2,5,17,20,35,36,42,43</sup>, viéndose una mejora en el edema cerebral, en el estrés oxidativo y en la integridad de la BHE<sup>4</sup>. A pesar de ello, los mecanismos involucrados son todavía desconocidos a día de hoy.

Por este motivo, el presente trabajo pretende evaluar el efecto modulador de los nAChRs  $\alpha 7$  en la respuesta inflamatoria, rotura de la BHE e infiltración leucocitaria en un modelo experimental de isquemia cerebral.

## **1.4 Proyecto**

En las diferentes etapas del infarto cerebral la inflamación es de vital importancia, y la estimulación de los nAChRs  $\alpha 7$  tiene un efecto modulador de la inflamación en el cerebro. Eso es gracias a que con la activación del nAChR  $\alpha 7$  se consigue una mejora en la evolución del proceso patológico en la isquemia. A pesar de la evidencia de mejora con la modulación del nAChR  $\alpha 7$  en el infarto cerebrovascular, aún quedan muchas incógnitas acerca del papel que desempeña, su expresión en las diferentes poblaciones leucocitarias y la influencia que tiene en los diferentes mecanismos patológicos tras sufrir isquemia cerebral. En el presente proyecto se intentan esclarecer estas mismas preguntas, que son clave a la hora de implementar nuevos biomarcadores y dianas terapéuticas para así mejorar el diagnóstico y tratamiento de la isquemia, gracias al uso de nuevas estrategias antiinflamatorias.

### **1.4.1 Hipótesis principal y objetivos**

La hipótesis principal del estudio es que la activación del nAChR  $\alpha 7$  reduce el daño cerebral asociado a la isquemia a través de la modulación de los procesos inflamatorios, de la infiltración celular y de la reparación tisular. Asimismo, pretende determinar el potencial terapéutico del nAChR  $\alpha 7$  en la respuesta inflamatoria post-isquemia cerebral en rata mediante técnicas *ex vivo*. Para ello, el estudio se ha centrado en dos aspectos

fundamentales: (i) la caracterización de la neuroinflamación y (ii) la valoración de la integridad de la barrera hematoencefálica tras la activación del nAChR  $\alpha 7$ .

**Objetivo 1.** Caracterización de la respuesta inflamatoria e infiltración leucocitaria tras la activación de los nAChRs  $\alpha 7$  post-isquemia cerebral.

En este primer objetivo se ha llevado a cabo la evaluación de las distintas poblaciones inflamatorias: microglía y células infiltrantes (macrófagos y linfocitos).

**Objetivo 2.** Valoración de la integridad de la barrera hematoencefálica mediante la expresión de metaloproteinasas de matriz tras la activación de los nAChRs  $\alpha 7$  después de la isquemia cerebral.

En este segundo objetivo se ha estudiado la activación de las metaloproteinasas de matriz tipo gelatinasas MMP-9 y 2 en geles de acrilamida.

## 2. Material y métodos

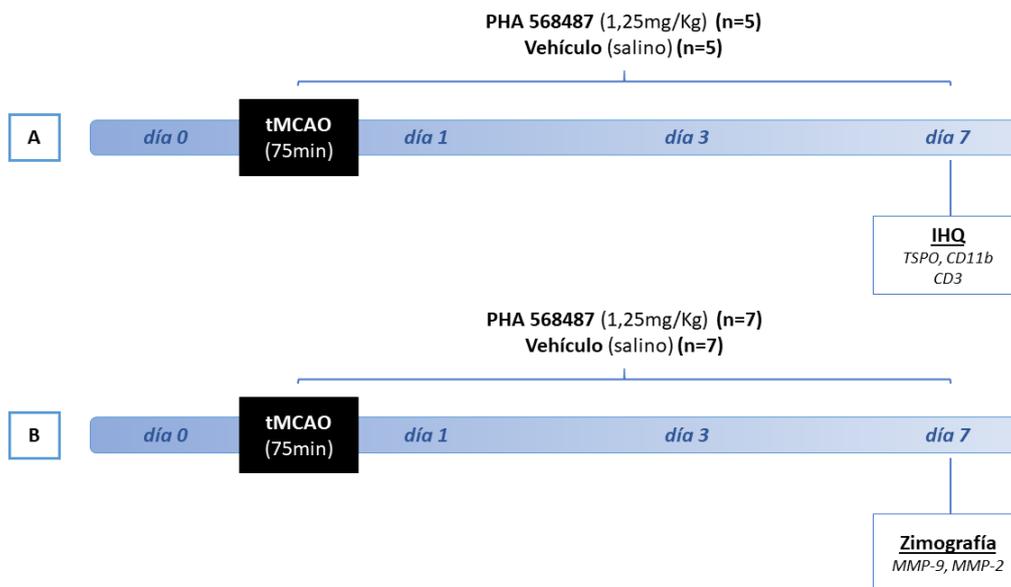
### 2.1 Modelo animal

Se han utilizado ratas macho adultas Sprague-Dawley ( $n=24$ ,  $297 \pm 8,3$  gr) para todos los estudios *ex vivo*. Los protocolos de experimentación animal fueron aprobados por los comités de ética de bienestar animal tanto de la Universidad del País Vasco (UPV/EHU) como de CIC biomaGUNE. Los procedimientos fueron llevados a cabo de acuerdo con las guías de buenas prácticas ARRIVE y las directivas de ética y bienestar animal de la Unión Europea.

### 2.2 Isquemia cerebral y tratamiento

Las ratas fueron anestesiadas con isoflurano al 2,5% en 100% de  $O_2$ , y sometidas a 75 minutos de isquemia focal transitoria mediante la oclusión intraluminal de la arteria cerebral media (MCAO) seguidos de reperusión tal y como ha sido descrito anteriormente<sup>44</sup>. Para la oclusión se usó un monofilamento de nailon 4-0 de 2,6 cm de largo con punta redondeada mediante la aplicación de calor. Este filamento se introdujo en la arteria carótida externa y se hizo avanzar hasta la arteria carótida interna y polígono de Willis hasta el origen de la arteria cerebral media. Tras los 75 minutos de oclusión se extrajo el microfilamento con suavidad y las ratas se recuperaron en la jaula con agua y comida *ad libitum*.

Durante los 7 días consecutivos, empezando por el momento de la reperusión, un grupo de 12 ratas fueron tratadas a diario por vía intraperitoneal con 0,1 ml de PHA 568487 (1.25 mg/Kg, i.p.) (**Figura 4**), un agonista de los nAChRs  $\alpha 7$ . El grupo de ratas isquémicas control recibió el mismo volumen diario de vehículo (suero salino) (**Figura 4**).



**Figura 4.** Diseño experimental del estudio. **(A)** Caracterización de la respuesta inflamatoria e infiltración leucocitaria mediante inmunohistoquímica (IHQ) de fluorescencia. **(B)** Valoración de la integridad de la barrera hematoencefálica mediante zimografía.

## 2.3 Estudios *ex vivo*: IHQ y zimografía

### 2.3.1 Inmunohistoquímica (IHQ)

Los estudios de IHQ de fluorescencia se realizaron a día 7 tras la reperusión (**Figura 4A**) para la caracterización de la respuesta inflamatoria e infiltración leucocitaria (objetivo 1). Los animales fueron anestesiados y sacrificados por decapitación. Posteriormente, se extrajo el cerebro, se fijó en paraformaldehído (PFA) y se congeló. Las muestras de tejido cerebral utilizadas se cortaron en criostato a 6µm de grosor a la altura de la corteza y del estriado tanto en animales tratados (n=5) como en controles (n=5).

Los cortes obtenidos se procesaron utilizando un protocolo de IHQ para tejido congelado. Primero, se fijaron con PFA durante 15 minutos, se lavaron en PBS, se bloquearon con NH<sub>4</sub>Cl en PBS (2,65g/l PBS) por 5 minutos y se volvieron a lavar en PBS. Después, se realizó una permeabilización de las muestras mediante 5 minutos de metanol-acetona (1:1; -20°C), 5 minutos de tritón (0,1%) en PBS y un lavado en PBS. Seguido, se saturaron con una solución de BSA (5%) y Tween (0,5%) en PBS durante 15 minutos, y se incubaron durante 1 hora con los anticuerpos primarios en BSA (5%)/Tween (0,5%) en PBS. Los anticuerpos primarios utilizados para analizar la respuesta inflamatoria fueron: *rabbit anti-rat* TSPO (NP155, 1:1000) (inflamación) y *mouse anti-rat* CD11b (1:300; Serotec, Raleigh, NC, USA) (microglía/macrófagos); y para la infiltración leucocitaria: *rabbit anti-rat* CD3 (1:300; Abcam, Cambridge, UK) (linfocitos). Tras la incubación, se hicieron 3 lavados en PBS de 5 minutos cada uno, y se volvieron a incubar durante 30 minutos con los anticuerpos secundarios Alexa Fluor 594 *goat anti-mouse* IgG y Alexa Fluor 488 *goat anti-rabbit* IgG (Molecular Probes, Life Technologies, Madrid, Spain, 1:1.000) en BSA (5%)/Tween (0,5%) en PBS. Después, se volvieron a hacer 3 lavados en PBS de 5 minutos cada uno. Por último, las muestras se

montaron con *prolong antifade kit* con DAPI (Molecular Probes, Life technologies, Madrid).

La adquisición de las imágenes representativas para la respuesta inflamatoria se hizo con Axio Observer Z6 (Zeiss) a 63x y para la infiltración leucocitaria con Leica TCS SP8 STED 3X (Leica microsystems) a 63x. Posteriormente, el conteo celular se llevó a cabo manualmente con el software *Image J*.

### 2.3.2 Zimografía

Las zimografías se realizaron a día 7 tras la reperusión (**Figura 4B**) para la valoración de la integridad de la barrera hematoencefálica (objetivo 2). Los animales fueron anestesiados y sacrificados por decapitación. Posteriormente, se extrajo el cerebro, se separaron el lado ipsilateral a la lesión (IP) y el contralateral (CT), y se congelaron ambas partes. El mismo procedimiento se llevó a cabo tanto en cerebros de animales isquémicos tratados (n=7) como en controles (n=7) bajo las mismas condiciones.

Ambos hemisferios del cerebro (IP y CT) se procesaron por separado mediante un protocolo de extracción de metaloproteinasas de matriz tal y como ha sido descrito anteriormente<sup>28</sup>. Primero, se homogeneizó el tejido con *buffer* de lisis (0,25g/700µl *buffer* de lisis) y se centrifugó. Se guardó el sobrenadante y se desechó el *pellet*. Después, se determinó la concentración de proteína mediante BCA, y se ajustaron todas las muestras a la misma concentración de proteína en un volumen final de 500µl en *buffer* de lisis. Para conseguir el aislamiento de las metaloproteinasas con actividad gelatinasa del resto de proteínas, se incubaron con gelatina-sefarosa 4B. Seguido, se centrifugaron las muestras y se guardó el *pellet*. Ese mismo *pellet* se lavó con 500µl de *buffer* de lavado y se centrifugó a 2.500rpm durante 2 minutos a 4°C, guardando de nuevo el *pellet*. Este proceso se repitió 3 veces. Por último, las muestras se incubaron con tampón de elución, y se centrifugaron a 2.500rpm durante 2 minutos a 4°C. Se guardó el sobrenadante, y se alícuotó en alícuotas de 10µl. Las alícuotas se guardaron en el congelador (-20°C) para su posterior uso.

Tras la extracción de metaloproteinasas de matriz se corrieron las proteínas en un gel de acrilamida con gelatina, método conocido como zimografía en gel. En este caso, la gelatina se añadió para poder estudiar la actividad gelatinasa de las proteasas a analizar. Primero, se preparó el gel separador al 10% de acrilamida que contiene 1,192ml de H<sub>2</sub>Odd; 0,6ml de gelatina (10mg/ml); 2,73ml de Tris pH 8,8 (1M); 70µl de SDS (10%); 2,338ml de acrilamida (30%); 2,8µl de TEMED; y 70µl de APS (10%). Se dejó polimerizar en los soportes durante 30 minutos. Seguido, se preparó el gel concentrador al 5% de acrilamida que contiene 1,54ml de H<sub>2</sub>Odd; 0,49ml de Tris pH 6,8 (1M); 25µl de SDS (10%); 0,42ml de acrilamida (30%); 2,5µl de TEMED; y 25µl de APS (10%). Se dejó polimerizar 30 minutos en los soportes con el peine. Después, se quitó el peine y se cargaron el patrón de pesos moleculares (BioRad, USA), el control positivo de MMP-9 humano (1µl de muestra más 9µl de tampón de carga) (Calbiochem), y nuestras muestras obtenidas de la extracción (10µl de muestra más 10µl de tampón de carga). Se dejaron correr durante 3 horas a 120V con el *buffer* TGS para obtener una buena

separación entre las bandas. Con ayuda de una espátula, se sacó el gel y se separó el gel concentrador del gel separador para desecharlo. El gel separador se lavó con H<sub>2</sub>Odd durante 5 minutos, y se hicieron 3 lavados de 15 minutos cada uno en solución de lavado (tritón 2,5x). Como ha sido descrito anteriormente<sup>29</sup>, se incubó el gel durante 48 horas a 37°C en tampón de incubación, y después, se tiñó el gel en negro de amido al 0,1% (Sigma) en ácido acético: metanol: agua (1:3:6) por 1 hora para poder visualizar las bandas. Para terminar, se destiñó durante 2 horas con 4 cambios en ácido acético: metanol: agua (1:3:6), y seguido se hizo un lavado de 5 minutos en H<sub>2</sub>Odd.

La adquisición de las imágenes representativas de los geles se hizo con el *ChemiDoc* (BioRad), y la cuantificación se llevó a cabo manualmente con el software *Image Lab*.

## 2.4 Análisis estadístico

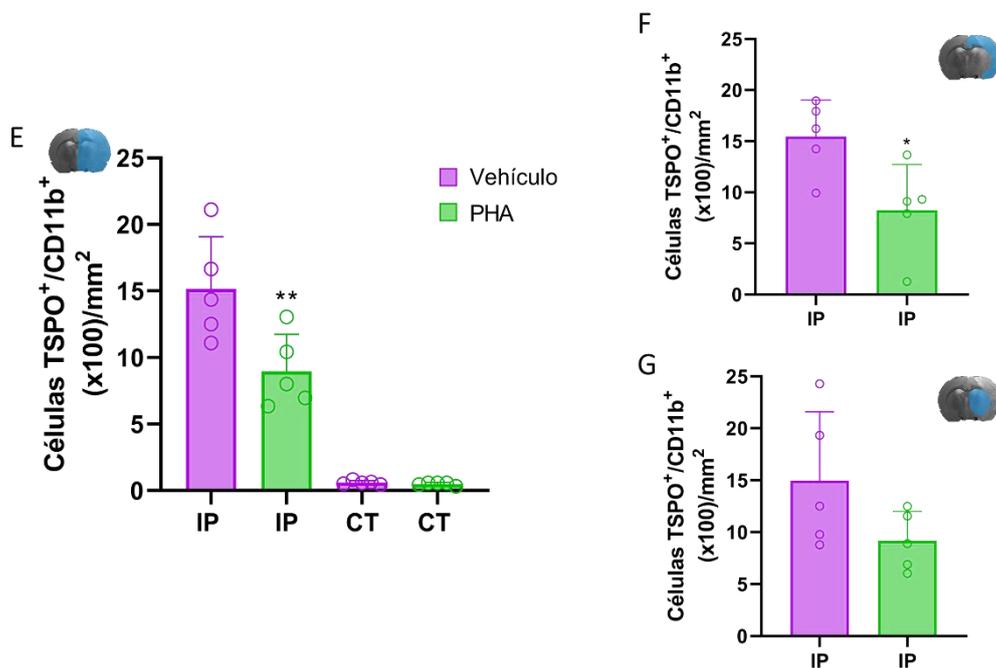
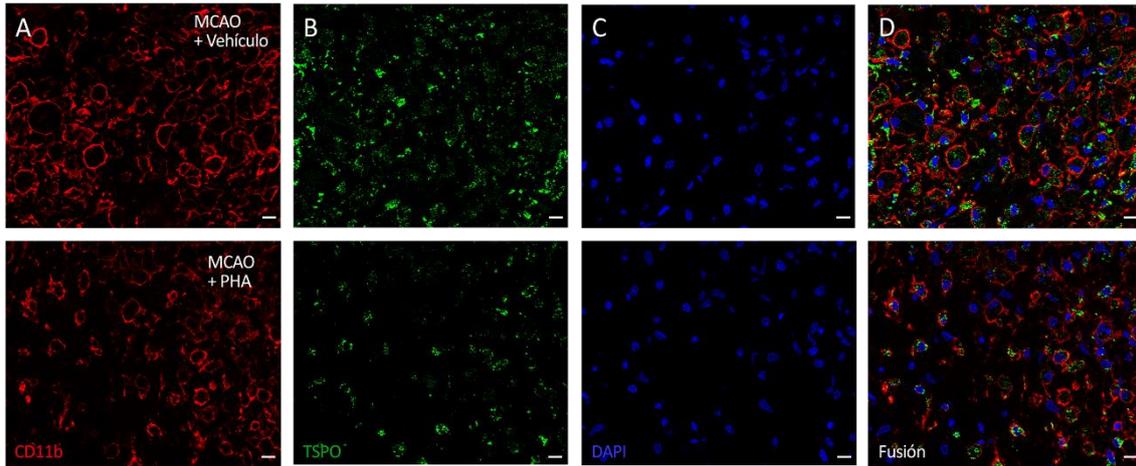
El efecto del PHA en las ratas isquémicas se comparó con las ratas isquémicas controles. Para los resultados de microglía/TSP0 totales y CD3 se utilizó *one-way* ANOVA seguidos por el test para comparaciones múltiples de Tukey. Para los resultados de microglía/TSP0 en la corteza y el estriado se usó t de Student. *One-way* ANOVA seguidos por el test para comparaciones múltiples de Tukey se usó también para los resultados de las metaloproteinasas de matriz con actividad gelatinasa, y t de Student para comparar los lados ipsilaterales. El nivel de significancia se fijó en  $P < 0,05$ . Todos los análisis se llevaron a cabo con el software GraphPad Prism versión 8.

## 3. Resultados

### 3.1 Respuesta inflamatoria

La tinción de inmunofluorescencia muestra la expresión de TSP0 en la población de células inflamatorias de microglía y macrófagos a día 7 después del inicio de la reperusión (**Figura 5**). A este día, se vio una mayor expresión de TSP0 en microglía/macrófagos reactivos en los animales isquémicos control en relación con los tratados con el agonista (PHA 568487) del receptor nicotínico  $\alpha 7$  en el núcleo del infarto (**Figura 5A-D**).

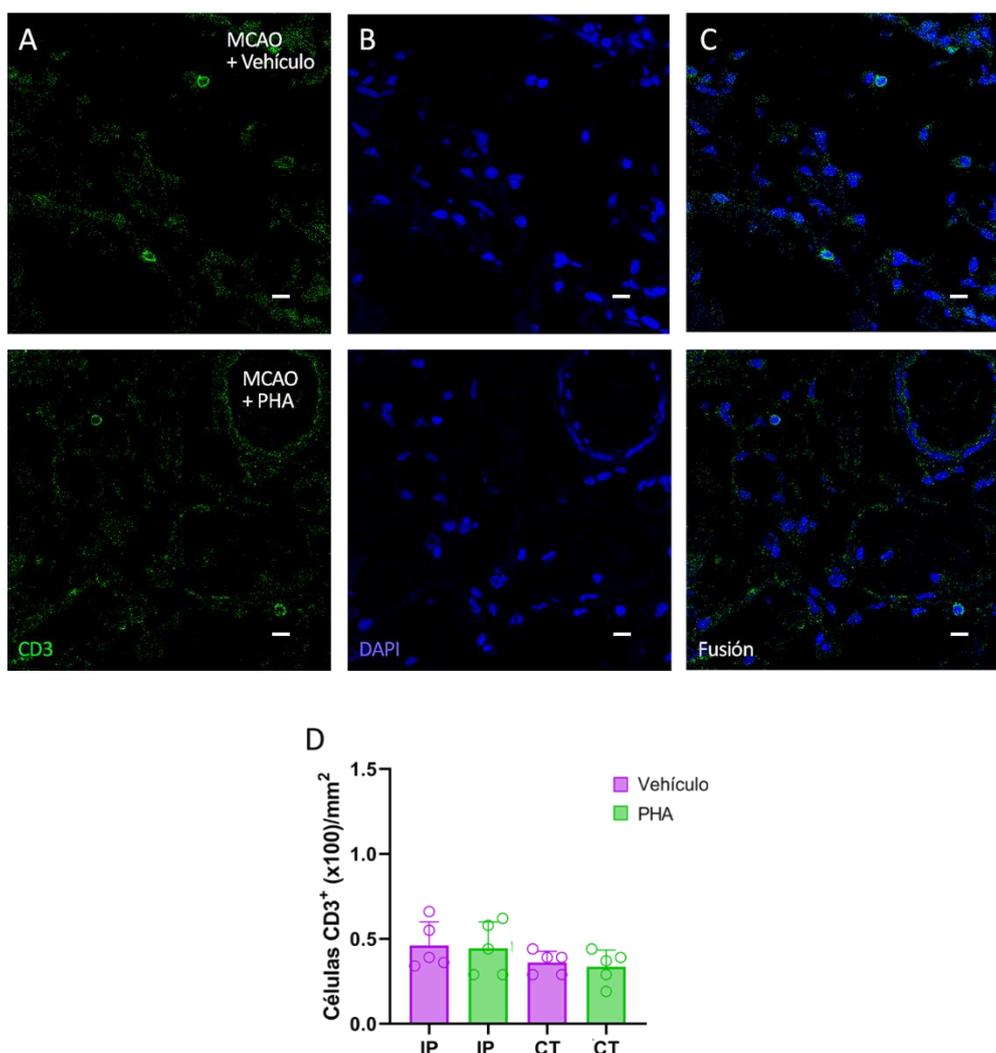
El conteo de microglía/macrófagos positivos para CD11b y TSP0 mostró una disminución significativa en la región isquémica de animales infartados tratados con PHA en relación con los tratados con vehículo ( $p < 0,01$ , **Figura 5E**). Por el contrario, los hemisferios contralaterales no mostraron cambios tras el tratamiento diario con el PHA (**Figura 5E**). Asimismo, se vio que en el área cortical del infarto disminuyó significativamente el número de microglía/macrófagos reactivos en animales tratados con PHA respecto a los animales controles isquémicos ( $p < 0,05$ , **Figura 5F**), mientras que en el área estriatal la diferencia no fue estadísticamente significativa (**Figura 5G**). A pesar de ello, si se observó cierta tendencia a la disminución de microglía/macrófagos positivos para TSP0 en el estriado de los animales isquémicos tratados con el agonista en relación con los animales isquémicos controles.



**Figura 5.** Respuesta inflamatoria a día 7 post-isquemia cerebral en ratas control isquémicas y ratas tratadas con PHA 568487. Inmunofluorescencia de la región isquémica en tres canales: CD11b (microglía/macrófagos) en rojo (A), TSPO (inflamación) en verde (B) y DAPI (núcleos) en azul (C). (D) Cantidad de microglía/macrófagos CD11b<sup>+</sup> que muestran TSPO. (E) Cantidad de células que están marcadas con TSPO y CD11b en cada una de las diferentes condiciones. Se muestra el lado ipsilateral (IP) y el contralateral (CT) a la lesión por separado. \*\*p<0,01 vs IP Vehículo. (F) Cantidad de células que están marcadas con TSPO y CD11b en la corteza del lado IP de cada una de las condiciones. \*p<0,05 vs IP Vehículo. (G) Cantidad de células que están marcadas con TSPO y CD11b en el estriado del lado IP de cada una de las condiciones. Barra de calibración 10  $\mu$ m.

### 3.2 Infiltración leucocitaria

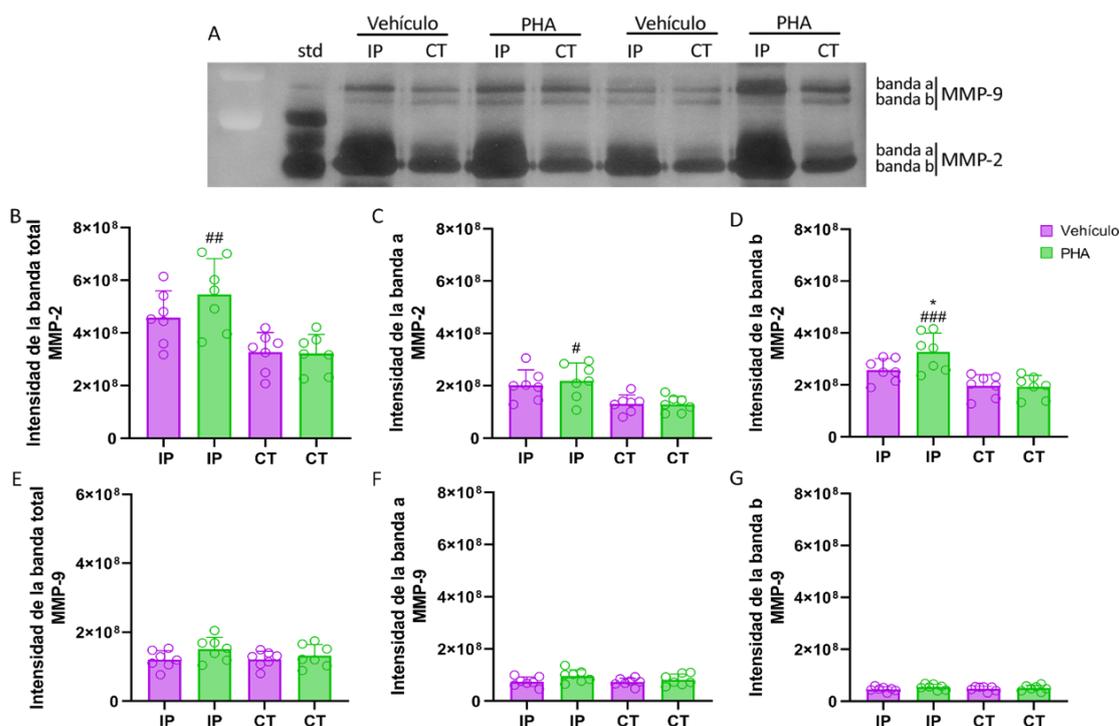
La infiltración leucocitaria se ha evaluado mediante el marcador CD3 (linfocitos) a día 7 tras la isquemia cerebral (**Figura 6A-C**). En este caso, no se observó ningún cambio entre los animales isquémicos tratados con PHA en relación con los tratados con vehículo, ni en el lado ipsilateral ni en el contralateral a día 7 post-isquemia (**Figura 6D**). Por lo tanto, el tratamiento no indujo ningún cambio en la infiltración de los linfocitos a los 7 días tras el proceso de isquemia cerebral en rata.



**Figura 6.** Infiltración leucocitaria a día 7 post-isquemia cerebral en ratas control isquémicas y ratas tratadas con PHA 568487. Se muestra el lado ipsilateral (IP) y el contralateral (CT) a la lesión por separado. Inmunofluorescencia de la región isquémica en dos canales: CD3 (linfocitos) en verde (**A**) y DAPI (núcleos) en azul (**B**). (**C**) Linfocitos CD3<sup>+</sup> con su núcleo. (**D**) Cantidad de células que están marcadas con CD3 en cada una de las diferentes condiciones. Barra de calibración 10 µm.

### 3.3 Actividad de MMP-9 y 2

La zimografía en gel muestra que la MMP-9 presenta dos bandas en el cerebro (banda a (proenzima)= 92KDa; banda b (enzima o forma activa)= 88KDa), al igual que la MMP-2 (banda a (proenzima)= 72KDa; banda b (enzima o forma activa)= 62KDa). Asimismo, a día 7 tras la isquemia cerebral se observa un incremento en la actividad de la MMP-2 en el hemisferio ipsilateral con respecto al contralateral, y dicho incremento fue significativamente mayor en animales tratado con PHA (**Figura 7A**).



**Figura 7.** Cuantificación de las metaloproteinasas de matriz 9 (MMP-9) y 2 (MMP-2) a día 7 post-isquemia cerebral en ratas control isquémicas y ratas tratadas con PHA 568487. Se muestra el lado ipsilateral (IP) y el contralateral (CT) a la lesión por separado. (A) Cantidad de las diferentes metaloproteinasas de matriz en cada uno de los hemisferios cerebrales. En el gel se puede observar la banda a, correspondiente a la proenzima, y la banda b, correspondiente a la enzima, de cada una de las MMPs. Std indica el estándar de gelatinasa MMP-9 humano. (B) Cantidad de MMP-2 total (a+b) en cada uno de los hemisferios cerebrales en las diferentes condiciones. ##p<0,01 vs CT PHA. (C) Cantidad de proenzima de la MMP-2 en cada uno de los hemisferios cerebrales en las diferentes condiciones. #p<0,1 vs CT PHA. (D) Cantidad de enzima de la MMP-2 en cada uno de los hemisferios cerebrales en las diferentes condiciones. \*p<0,05 vs IP Vehículo; ###p<0,001 vs CT PHA. (E) Cantidad de MMP-9 total (a+b) en cada uno de los hemisferios cerebrales y en las diferentes condiciones. (F) Cantidad de proenzima de la MMP-9 en cada uno de los hemisferios cerebrales en las diferentes condiciones. (G) Cantidad de enzima de la MMP-9 en cada uno de los hemisferios cerebrales en las diferentes condiciones.

La MMP-2 mostró un incremento significativo de la actividad en la lesión isquémica de animales tratados con PHA en relación con los contralaterales a la lesión (p<0,01, **Figura 7B**), al igual que la banda a de la MMP-2 (p<0,05, **Figura 7C**). Sin embargo, en la banda b de la MMP-2 o forma activa, se vio un incremento significativo entre los hemisferios

isquémicos tras el tratamiento con PHA con relación a los animales controles isquémicos ( $p < 0,05$ , **Figura 7D**). También aumentó significativamente entre el lado ipsilateral y el lado contralateral a la lesión de los animales tratados ( $p < 0,001$ , **Figura 7D**).

Por otro lado, en los niveles de activación de la MMP-9 no se apreció ninguna diferencia entre las diferentes condiciones ni en los diferentes hemisferios (**Figura 7E-G**).

## 4. Discusión

El presente estudio evaluó el impacto de la activación de los nAChRs  $\alpha 7$  en la neuroinflamación subyacente al ictus isquémico mediante estudios de inmunohistoquímica de fluorescencia y zimografía. Nuestros resultados demuestran que la modulación de los nAChRs  $\alpha 7$  inhibe la respuesta inflamatoria tras el accidente cerebrovascular mediante la disminución de la respuesta de microglía/macrófagos reactivos y la sobreactivación de la MMP-2.

### 4.1 La activación del nAChR $\alpha 7$ atenúa la neuroinflamación

La activación farmacológica de los nAChRs  $\alpha 7$  con el agonista PHA 568487 ha demostrado previamente la reducción (i) del edema cerebral, (ii) de la lesión por accidente cerebrovascular isquémico, (iii) de la neuroinflamación y (iv) del estrés oxidativo tras el ictus experimental<sup>4,35,43,45</sup>. En nuestro estudio, exploramos el efecto del PHA en la neuroinflamación mediante los marcadores de microglía/macrófagos reactivos (CD11b) e inflamación (TSPO). El tratamiento con PHA después del MCAO en ratas indujo una disminución significativa de microglía/macrófagos reactivos expresando TSPO en la región isquémica (**Figura 5E**), lo que se relaciona directamente con una disminución de la inflamación cerebral corroborando el efecto antiinflamatorio de los nAChRs  $\alpha 7$  en la isquemia. Estos hallazgos apoyan los mostrados por Guan y colaboradores, quienes observaron que los agonistas del nAChR  $\alpha 7$  inhiben la inflamación y el daño cerebral mediada por la microglía en ratas isquémicas<sup>2</sup>. Asimismo, se ha visto que reduce la activación de NF- $\kappa$ B<sup>4,5,12,17,20</sup>, que disminuye la producción de citocinas proinflamatorias en la microglía<sup>2,12,17,20,35,39,42</sup>, como la IL- $1\beta$ <sup>2</sup> o la TNF- $\alpha$ <sup>2,36</sup>, y que aumenta la producción de citocinas antiinflamatorias<sup>35,39</sup>. Por lo tanto, parece que el PHA inhibe los procesos relacionados con la inflamación mediante la activación de los nAChRs  $\alpha 7$  de la microglía/macrófagos. Por otro lado, también se ha visto que los nAChRs  $\alpha 7$  proporcionan neuroprotección gracias a la inhibición de la excitotoxicidad, impidiendo así gran parte de la muerte neuronal<sup>34,37-39</sup>.

Esta mejora significativa de la inflamación isquémica se observó en el área cortical (**Figura 5F**), y no en el área estriatal (**Figura 5G**). Estas dos regiones concuerdan con el núcleo del infarto (ganglios de la base)<sup>18</sup>, donde se desarrolla una despolarización permanente y anóxica<sup>8</sup> que impide la recuperación del tejido<sup>8,16</sup>, y la penumbra (corteza)<sup>18</sup> que se recupera con una rápida reperusión del flujo sanguíneo<sup>8,16</sup>, ya que el metabolismo energético está parcialmente preservado<sup>8,18</sup>. Por lo tanto, la activación de los nAChRs  $\alpha 7$  mejoran significativamente la inflamación de la penumbra isquémica, proporcionando neuroprotección.

## 4.2 Efecto de la modulación del nAChR $\alpha 7$ en la infiltración leucocitaria

Está descrito que la activación de los nAChRs  $\alpha 7$  usando agonistas reduce las quimiocinas<sup>20,35</sup>, inhibe la expresión de moléculas de adhesión<sup>20,46</sup> y la proliferación de células T<sup>35,46,47</sup>. Sin embargo, en nuestro estudio el PHA no produjo ninguna diferencia significativa en la infiltración de los linfocitos CD3<sup>+</sup> a día 7 tras el MCAO (**Figura 6D**). Esto podría explicarse debido a las técnicas utilizadas, ya que la qPCR es una técnica con mayor sensibilidad<sup>35,47</sup>, y aunque en los cultivos celulares se puede ver el efecto que tiene el receptor en los linfocitos<sup>46</sup>, en el tejido existen otras interacciones a tener en cuenta que pueden modificar esos resultados.

De todas formas, hay que añadir que diferentes células T son CD3<sup>+</sup>, tanto las células T citotóxicas (CTL) como las células T ayudantes (Th)<sup>19,48</sup>. Además, existen dos subtipos de Th, las células Th1 que secretan citocinas proinflamatorias<sup>3,19,48</sup>, y las células Th2 que secretan citocinas antiinflamatorias<sup>3,48</sup>. Se ha visto que el nAChR  $\alpha 7$  inhibe la diferenciación de las células Th1 y que aumenta la de las Th2<sup>20,47</sup>, lo que podría explicar que la infiltración leucocitaria se mantuviese igual (**Figura 6D**), pero que la inflamación mejorase con el tratamiento de PHA 568487 (**Figura 5E**).

## 4.3 La activación del nAChR $\alpha 7$ sobreactiva la MMP-2

La isquemia induce un aumento de la MMP-9 en los primeros días tras la reperfusión, produciendo el deterioro cerebral que se conoce en la patología<sup>1,7,26-28,32</sup>. A día 7 después del ictus isquémico, sin embargo, la actividad de la MMP-9 bajó a niveles control (**Figura 7A**), debido a que a este día nos encontramos en la fase de recuperación, donde la MMP predominante es la MMP-2<sup>7,27</sup>. Además, la activación del nAChR  $\alpha 7$  no produjo ningún cambio en los niveles de actividad de la MMP-9, no viéndose ninguna diferencia en la actividad gelatinasa de la MMP-9 entre los animales controles isquémicos y los animales tratados con PHA (**Figura 7E-G**).

En nuestro estudio, por primera vez se vio que los nAChRs  $\alpha 7$  aumentaban significativamente la MMP-2 activa gracias al tratamiento con PHA (**Figura 7D**) a día 7 tras el accidente cerebrovascular. Este hallazgo novedoso apunta a que uno de los mecanismos por los que los nAChRs  $\alpha 7$  mejoran la neuroinflamación y la recuperación de la enfermedad es la sobreactivación de la MMP-2 activa, caracterizada por tener un papel protector tras la primera semana de evolución de la isquemia cerebral<sup>30</sup>, ya que ayuda en la angiogénesis, neurogénesis<sup>7,21,26</sup> y sinaptogénesis<sup>21</sup>. No se vio este efecto del PHA en la MMP-2 inactiva, que se mantuvo igual en todos los casos (**Figura 7C**). Por tanto, los nAChRs  $\alpha 7$  no afectan a la actividad de la forma latente de la MMP-2 (**Figura 7C**), pero sí a la forma activa (**Figura 7D**). Por todo ello, este hallazgo plantea nuevas dianas terapéuticas para el ictus isquémico, además de esclarecer otro aspecto en el que influye la activación del nAChR  $\alpha 7$ .

## 4.4 Conclusión

En el proyecto llevado a cabo, se ha demostrado que los nAChRs  $\alpha 7$  juegan un papel muy importante en la patología del ictus isquémico, ya que son capaces de modular la respuesta inflamatoria y la recuperación de la enfermedad. La activación de los nAChRs  $\alpha 7$  logra disminuir la inflamación mediada por la microglía de manera exitosa a nivel cortical. Además, la sobreactivación de la MMP-2 activa es un hallazgo novedoso que apoya el efecto neuroprotector atribuido a los nAChRs  $\alpha 7$ , mejorando así también la recuperación del accidente isquémico. Todo esto aporta información relevante sobre el papel terapéutico de los nAChRs  $\alpha 7$  en el infarto cerebral, y plantea nuevos biomarcadores y dianas terapéuticas para mejorar el diagnóstico y tratamiento de la isquemia.

## 5. Bibliografía

1. Zinnhardt, B. *et al.* In vivo imaging biomarkers of neuroinflammation in the development and assessment of stroke therapies - towards clinical translation. *Theranostics* vol. 8 2603–2620 (2018).
2. Guan, Y. Z. *et al.* Nicotine Inhibits Microglial Proliferation and Is Neuroprotective in Global Ischemia Rats. *Mol. Neurobiol.* **51**, 1480–1488 (2015).
3. Arumugam, T. V., Granger, D. N. & Mattson, M. P. Stroke and T-cells. *NeuroMolecular Medicine* vol. 7 229–242 (2005).
4. Zou, D. *et al.* Activation of Alpha-7 Nicotinic Acetylcholine Receptor Reduces Brain Edema in Mice with Ischemic Stroke and Bone Fracture. *Mol. Neurobiol.* **54**, 8278–8286 (2017).
5. Lu, X. X. *et al.* Nicotinic acetylcholine receptor alpha7 subunit mediates vagus nerve stimulation-induced neuroprotection in acute permanent cerebral ischemia by  $\alpha 7$ nAChR/JAK2 pathway. *Med. Sci. Monit.* **23**, 6072–6081 (2017).
6. Parada, E. *et al.* Neuroprotective effect of melatonin against ischemia is partially mediated by alpha-7 nicotinic receptor modulation and HO-1 overexpression. *J. Pineal Res.* **56**, 204–212 (2014).
7. Rosell, A. & Lo, E. H. Multiphasic roles for matrix metalloproteinases after stroke. *Curr. Opin. Pharmacol.* **8**, 82–89 (2008).
8. Dirnagl, U., Iadecola, C. & Moskowitz, M. A. Pathobiology of ischaemic stroke: An integrated view. *Trends Neurosci.* **22**, 391–397 (1999).
9. Zhao, S. C. *et al.* Regulation of microglial activation in stroke. *Acta Pharmacol. Sin.* **38**, 445–458 (2017).
10. Kawabori, M. & Yenari, M. Inflammatory Responses in Brain Ischemia. *Curr. Med. Chem.* **22**, 1258–1277 (2015).
11. Green, A. R. & Shuaib, A. Therapeutic strategies for the treatment of stroke. *Drug Discovery Today* vol. 11 681–693 (2006).
12. Liu, C. *et al.* Genistein-3'-sodium sulfonate Attenuates Neuroinflammation in Stroke Rats by Down-Regulating Microglial M1 Polarization through  $\alpha 7$ nAChR-NF- $\kappa$ B Signaling Pathway. *Int. J. Biol. Sci.* **17**, 1088–1100 (2021).

13. Bonaventura, A. *et al.* Update on inflammatory biomarkers and treatments in ischemic stroke. *Int. J. Mol. Sci.* **17**, 1–53 (2016).
14. Kwon, H., Jung, J. W., Lee, Y. C., Ryu, J. H. & Kim, D. H. Neuroprotective effect of the ethanol extract of *Artemisia capillaris* on transient forebrain ischemia in mice via nicotinic cholinergic receptor. *Chin. J. Nat. Med.* **16**, 428–435 (2018).
15. Belov Kirdajova, D., Kriska, J., Tureckova, J. & Anderova, M. Ischemia-Triggered Glutamate Excitotoxicity From the Perspective of Glial Cells. *Front. Cell. Neurosci.* **14**, 1–27 (2020).
16. Kaufmann, A. M. *et al.* Ischemic core and penumbra in human stroke. *Stroke* **30**, 93–99 (1999).
17. Li, X. *et al.* 3'-Daidzein sulfonate sodium provides neuroprotection by promoting the expression of the  $\alpha 7$  nicotinic acetylcholine receptor and suppressing inflammatory responses in a rat model of focal cerebral ischemia. *Am. J. Transl. Res.* **10**, 3455–3464 (2018).
18. Hossmann, K. -A. Viability thresholds and the penumbra of focal ischemia. *Ann. Neurol.* **36**, 557–565 (1994).
19. Urra, X., Cervera, Á., Villamor, N., Planas, A. M. & Chamorro, Á. Harms and benefits of lymphocyte subpopulations in patients with acute stroke. *Neuroscience* **158**, 1174–1183 (2009).
20. Ren, C., Tong, Y. L., Li, J. C., Lu, Z. Q. & Yao, Y. M. The protective effect of alpha 7 nicotinic acetylcholine receptor activation on critical illness and its mechanism. *Int. J. Biol. Sci.* **13**, 46–56 (2017).
21. Yang, Y. & Rosenberg, G. A. Matrix metalloproteinases as therapeutic targets for stroke. *Brain Res.* **1623**, 30–38 (2015).
22. Daidone, M., Cataldi, M., Pinto, A. & Tuttolomondo, A. Non-coding RNAs and other determinants of neuroinflammation and endothelial dysfunction: Regulation of gene expression in the acute phase of ischemic stroke and possible therapeutic applications. *Neural Regen. Res.* **16**, 2154–2158 (2021).
23. Martín, A. *et al.* Evaluation of the PBR/TSPO radioligand 18 FDPA-714 in a rat model of focal cerebral ischemia. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **30**, 230–241 (2010).
24. Hallenbeck, J. M. Significance of the Inflammatory Response in Brain Ischemia. *Acta Neurochir. Suppl.* **1996**, 27–31 (1996).
25. Otxoa-de-Amezaga, A. *et al.* Microglial cell loss after ischemic stroke favors brain neutrophil accumulation. *Acta Neuropathol.* **137**, 321–341 (2019).
26. Zhao, B. Q. *et al.* Role of matrix metalloproteinases in delayed cortical responses after stroke. *Nat. Med.* **12**, 441–445 (2006).
27. Lakhan, S. E., Kirchgessner, A., Tepper, D. & Leonard, A. Matrix metalloproteinases and blood-brain barrier disruption in acute ischemic stroke. *Front. Neurol.* **4 APR**, 1–15 (2013).
28. Justicia, C. *et al.* Neutrophil Infiltration Increases Matrix Metalloproteinase-9 in the Ischemic Brain after Occlusion/Reperfusion of the Middle Cerebral Artery in Rats. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **23**, 1430–1440 (2003).

29. Planas, A. M., Solé, S. & Justicia, C. Expression and activation of matrix metalloproteinase-2 and -9 in rat brain after transient focal cerebral ischemia. *Neurobiol. Dis.* **8**, 834–846 (2001).
30. Lucivero, V. *et al.* Different roles of matrix metalloproteinases-2 and -9 after human ischaemic stroke. *Neurol. Sci.* **28**, 165–170 (2007).
31. Lo, E. H., Dalkara, T. & Moskowitz, M. A. Neurological diseases: Mechanisms, challenges and opportunities in stroke. *Nat. Rev. Neurosci.* **4**, 399–414 (2003).
32. Chen, S. *et al.* Examination of gelatinase isoforms in rodent models of acute neurodegenerative diseases using two-dimensional zymography. *Methods Mol. Biol.* **1626**, 147–155 (2017).
33. Martin, L. F., Kem, W. R. & Freedman, R. Alpha-7 nicotinic receptor agonists: Potential new candidates for the treatment of schizophrenia. *Psychopharmacology (Berl)*. **174**, 54–64 (2004).
34. Takada-Takatori, Y. *et al.* Roles of nicotinic receptors in acetylcholinesterase inhibitor-induced neuroprotection and nicotinic receptor up-regulation. *Biol. Pharm. Bull.* **32**, 318–324 (2009).
35. Colás, L. *et al.* In vivo imaging of A7 nicotinic receptors as a novel method to monitor neuroinflammation after cerebral ischemia. *Glia* **66**, 1611–1624 (2018).
36. Martín, A. *et al.* In vivo PET imaging of the  $\alpha 4\beta 2$  nicotinic acetylcholine receptor as a marker for brain inflammation after cerebral ischemia. *J. Neurosci.* **35**, 5998–6009 (2015).
37. Belluardo, N., Mudò, G., Blum, M. & Fuxe, K. Central nicotinic receptors, neurotrophic factors and neuroprotection. *Behav. Brain Res.* **113**, 21–34 (2000).
38. Picciotto, M. R. & Zoli, M. Nicotinic receptors in aging and dementia. *J. Neurobiol.* **53**, 641–655 (2002).
39. Yabuki, Y., Jing, X. & Fukunaga, K. The T-type calcium channel enhancer SAK3 inhibits neuronal death following transient brain ischemia via nicotinic acetylcholine receptor stimulation. *Neurochem. Int.* **108**, 272–281 (2017).
40. Egea, J. *et al.* Neuroprotection afforded by nicotine against oxygen and glucose deprivation in hippocampal slices is lost in  $\alpha 7$  nicotinic receptor knockout mice. *Neuroscience* **145**, 866–872 (2007).
41. Sun, F., Jin, K. & Uteshev, V. V. A Type-II Positive Allosteric Modulator of  $\alpha 7$  nAChRs Reduces Brain Injury and Improves Neurological Function after Focal Cerebral Ischemia in Rats. *PLoS One* **8**, e73581 (2013).
42. Furukawa, S., Sameshima, H., Yang, L. & Ikenoue, T. Activation of acetylcholine receptors and microglia in hypoxic-ischemic brain damage in newborn rats. *Brain Dev.* **35**, 607–613 (2013).
43. Wang, H. *et al.* Nicotinic acetylcholine receptor  $\alpha 7$  subunit is an essential regulator of inflammation. *Nature* **421**, 384–388 (2003).
44. Justicia, C., Pérez-Asensio, F. J., Burguete, M. C., Salom, J. B. & Planas, A. M. Administration of transforming growth factor- $\alpha$  reduces infarct volume after transient focal cerebral ischemia in the rat. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **21**, 1097–1104 (2001).
45. Borovikova, L. V *et al.* Vagus nerve stimulation attenuates the systemic inflammatory

*response to endotoxin*. [www.nature.com](http://www.nature.com) (2000).

46. De Rosa, M. J., Dionisio, L., Agriello, E., Bouzat, C. & Esandi, M. del C. Alpha 7 nicotinic acetylcholine receptor modulates lymphocyte activation. *Life Sci.* **85**, 444–449 (2009).
47. Nizri, E. *et al.* Activation of the Cholinergic Anti-Inflammatory System by Nicotine Attenuates Neuroinflammation via Suppression of Th1 and Th17 Responses. *J. Immunol.* **183**, 6681–6688 (2009).
48. Jiang, C. *et al.* Changes in the cellular immune system and circulating inflammatory markers of stroke patients. *Oncotarget* **8**, 3553–3567 (2017).