

DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA

ISQUEMIA CEREBRAL FOCAL TRANSITORIA EN RATA:
CARACTERIZACIÓN Y UTILIDAD DEL MODELO DE LA
SUTURA INTRALUMINAL EN EL ESTUDIO DE
ESTRATEGIAS NEUROPROTECTORAS

FERNANDO JESÚS PÉREZ ASENSIO

UNIVERSITAT DE VALENCIA
Servei de Publicacions
2005

Aquesta Tesi Doctoral va ser presentada a València el dia 21 de Setembre de 2005 davant un tribunal format per:

- D. José Vila Salinas
- D. Ignacio Lizasoain Hernández
- D^a. Anna Planas Obradors
- D^a. M^a Ángeles Moro Sánchez
- D. Francisco Javier Miranda Alonso

Va ser dirigida per:

D. Enrique Alborch Domínguez

D. Germán Torregrosa

©Copyright: Servei de Publicacions
Fernando Jesús Pérez Asensio

Depòsit legal:

I.S.B.N.:84-370-6362-0

Edita: Universitat de València
Servei de Publicacions
C/ Artes Gráficas, 13 bajo
46010 València
Spain
Telèfon: 963864115



UNIVERSITAT DE VALÈNCIA

ISQUEMIA CEREBRAL FOCAL TRANSITORIA EN
RATA: CARACTERIZACIÓN Y UTILIDAD DEL
MODELO DE LA SUTURA INTRALUMINAL EN EL
ESTUDIO DE ESTRATEGIAS NEUROPROTECTORAS

Memoria presentada por
D. Fernando Jesús Pérez Asensio
para optar al grado de Doctor en
Ciencias Biológicas
Valencia, 2005

Índice

1- INTRODUCCIÓN	7
1.1- ENFERMEDADES CEREBROVASCULARES: EPIDEMIOLOGÍA Y TIPOS ...	9
1.2- MODELOS ANIMALES DE ICTUS	10
1.3- FISIOPATOLOGÍA DE LA ISQUEMIA CEREBRAL	13
1.3.1- Flujo sanguíneo cerebral y penumbra isquémica	13
1.3.2- Respuesta microvascular cerebral a la isquemia focal	14
1.3.3- La cascada isquémica en el tejido cerebral	16
1.3.3.1- <u>Óxido nítrico (NO)</u>	19
1.3.3.2- <u>Estrés oxidativo: radicales libres (RLs) y especies reactivas de oxígeno</u>	23
1.3.3.3- <u>Inflamación</u>	27
1.4. TERAPÉUTICA DEL ICTUS: NEUROPROTECCIÓN	32
1.4.1- Estrategias relacionadas con el NO	33
1.4.2- Estrategias relacionadas con el estrés oxidativo	35
1.4.3- Estrategias relacionadas con la inflamación	38
2- OBJETIVOS	41
3- MATERIAL Y MÉTODOS	45
3.1- REGISTRO DE LA PERFUSIÓN CEREBROCORTICAL Y OTROS PARÁMETROS HEMODINÁMICOS Y METABÓLICOS EN LA RATA	47
3.1.1- Técnica quirúrgica	47
3.1.2- Técnicas de registro y medición de variables fisiológicas	50
3.2- INDUCCIÓN DE ISQUEMIA CEREBRAL FOCAL TRANSITORIA EN RATA	50
3.3- EVALUACIÓN DEL ESTADO NEUROLÓGICO	52
3.4- EVALUACIÓN DEL TAMAÑO DE INFARTO CEREBRAL	53
3.5- DETERMINACIONES INMUNOHISTOQUÍMICAS, ENZIMÁTICAS Y BIOQUÍMICAS	54
3.5.1- Determinación bioquímica de MPO: perfusión transcardíaca y ensayo de actividad enzimática	54
3.5.2- Determinación inmunohistoquímica de MPO	56
3.5.3- Determinación de Se en plasma sanguíneo	57
3.5.4- Determinación de la actividad GSH-Px en tejido cerebral	58

3.5.5- Determinación de GSH en tejido cerebral	58
3.5.6- Determinación de L-arginina y L-glutamato en microdializado cerebral y suero	59
3.5.7- Expresión de iNOS: (Western-blot)	60
3.5.8- Determinación de ATP en tejido cerebral	62
3.6- ADMINISTRACIÓN DE LOS FÁRMACOS	62
3.6.1- Vía oral	62
3.6.2- Bombas de infusión continua (I): infusión intracerebroventricular	62
3.6.3- Bombas de infusión continua (II): infusión intraperitoneal	63
3.7- PROTOCOLOS EXPERIMENTALES	64
3.7.1- Caracterización del modelo: grupos pseudo-isquémico (control) e isquémico (O/R- ACM 90 min/3 d)	64
3.7.2- Inhibidor de iNOS: 1.400W	65
3.7.2.1- <u>Administración intracerebroventricular</u>	65
3.7.2.2- <u>Administración intraperitoneal</u>	66
3.7.3- Antioxidante: Ebselén	68
3.7.4- Inhibidor de las fosfolipasas A₂ de secreción: 12-<i>epi</i>-scylaradial	70
3.8- ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS (ESTADÍSTICA)	70
4- RESULTADOS	73
4.1- CARACTERIZACIÓN DEL MODELO EXPERIMENTAL	75
4.1.1- Parámetros hemodinámicos y metabólicos	75
4.1.2- Valoración neurológica y volumen de infarto	81
4.1.3- Evolución ponderal	83
4.2- EVALUACIÓN DEL POTENCIAL NEUROPROTECTOR	84
4.2.1- Inhibidor de iNOS: 1400W	84
4.2.1.1- <u>Parámetros hemodinámicos y metabólicos</u>	84
4.2.1.2- <u>Mortalidad</u>	86
4.2.1.3- <u>Valoración neurológica y volumen de infarto</u>	87
4.2.1.4- <u>Evolución ponderal</u>	88
4.2.1.5- <u>Niveles séricos de L-arginina y L-glutamato</u>	88
4.2.1.6- <u>Expresión de iNOS</u>	91
4.2.1.7- <u>Niveles cerebrales de L-glutamato</u>	92
4.2.1.8- <u>Niveles cerebrales de ATP</u>	93

4.2.2- Antioxidante exógeno: Ebselén	95
4.2.2.1- <u>Parámetros hemodinámicos y metabólicos</u>	95
4.2.2.2- <u>Mortalidad</u>	97
4.2.2.3- <u>Valoración neurológica y volumen de infarto</u>	97
4.2.2.4- <u>Evolución ponderal</u>	99
4.2.2.5- <u>Niveles plasmáticos de selenio</u>	99
4.2.2.6- <u>Actividad GSH-Px</u>	100
4.2.2.7- <u>Niveles de GSH</u>	101
4.2.3- Inhibidor de sPLA₂s: 12-<i>epi</i>-scleradiol	104
4.2.3.1- <u>Parámetros hemodinámicos y metabólicos</u>	104
4.2.3.2- <u>Mortalidad</u>	106
4.2.3.3- <u>Valoración neurológica y volumen de infarto</u>	106
4.2.3.4- <u>Evolución ponderal</u>	107
4.2.3.5- <u>Determinación de MPO</u>	108
5- DISCUSIÓN	111
5.1- MODELOS ANIMALES DE ICTUS: VENTAJAS Y LIMITACIONES	113
5.2- OCLUSIÓN DE LA ACM MEDIANTE LA TÉCNICA DEL FILAMENTO INTRALUMINAL	115
5.3- EVALUACIÓN DEL POTENCIAL NEUROPROTECTOR	119
5.3.1- Inhibidor de iNOS: 1400W	119
5.3.2- Antioxidante exógeno: Ebselén	126
5.3.3- Inhibidor de sPLA₂s: 12-<i>epi</i>-scleradiol	132
6- CONCLUSIONES	139
7- BIBLIOGRAFÍA	143

Introducción

1.1- ENFERMEDADES CEREBROVASCULARES: EPIDEMIOLOGÍA Y TIPOS.

Los accidentes cerebrovasculares agudos (“ictus” cerebrales) son trastornos neurológicos originados por la disminución brusca del aporte sanguíneo cerebral. Pese al mejor control de los factores de riesgo vascular, el aumento de la edad de la población explica el incremento en la incidencia y prevalencia del ictus cerebral en los últimos años, aunque cada vez se detectan más casos en la población joven. La incidencia del ictus es de 200 casos por cada 100.000 habitantes, lo que origina que en España cada año unos 84.000 españoles sufran algún tipo de accidente cerebrovascular. Aquellos que sobreviven a un primer ictus presentan un riesgo muy alto de sufrir otro durante los 6 meses posteriores al primero; y el riesgo de recidiva durante los 5 años siguientes es muy elevado. La mortalidad, en el caso de los infartos cerebrales, es de 10 al 12% antes de los 30 días. En España, el ictus es, por tanto, la segunda causa de muerte (la primera en mujeres), además de la primera causa de invalidez permanente y la segunda de demencia. De los supervivientes, dos tercios viven en condiciones razonablemente buenas o con déficits moderados, y un tercio queda incapacitado completamente tras el accidente cerebrovascular. En la actualidad hay unos 150.000 incapacitados a consecuencia de un ictus en España. Según la Sociedad Española de Neurología, la asistencia precoz al ictus puede disminuir la mortalidad en un 20% y también el porcentaje de pacientes que quedarán incapacitados. El ictus es la primera causa de ingreso hospitalario por enfermedad neurológica y la causa más frecuente de demanda asistencial en los servicios de urgencias por enfermedad neurológica grave, lo que conlleva grandes cargas socio-económicas en términos de atención sanitaria y servicios sociales.

La mayoría de los accidentes cerebrovasculares (85%) son de tipo “isquémico”, y tienen su origen en la oclusión aguda por un trombo o un émbolo de una de las principales arterias cerebrales, lo que origina un descenso en la perfusión de la región cerebral irrigada por dicha arteria. El resto de accidentes cerebrovasculares (15%) lo constituyen los de tipo “hemorrágico”, originados por la rotura de un vaso sanguíneo, bien sea en el parénquima (“hemorragia intracerebral”) o en la superficie cerebral (“hemorragia subaracnoidea”).

El fenómeno que caracteriza a todas las enfermedades cerebrovasculares es la “isquemia cerebral”, la cual se define como “la reducción del aporte sanguíneo hasta unos niveles insuficientes para mantener el metabolismo y funcionamiento normales de las células cerebrales”. Las causas más frecuentes de isquemia son: estrechamiento gradual (ateroesclerosis) y, como ya se ha comentado en el párrafo anterior, oclusión súbita (trombosis o embolia) de alguna de las grandes arterias cerebrales, así como microembolia en vasos de pequeño calibre, espasmo vascular asociado a una hemorragia subaracnoidea, hipertensión intracraneal, etc. (Hossmann, 1982). Otras causas de isquemia cerebral son la parada cardíaca, así como shock e hipotensión sistémica, que originan el descenso del aporte sanguíneo al cerebro en su totalidad (isquemia global). La “isquemia cerebral focal” corresponde a situaciones en las que la reducción del flujo sanguíneo se circunscribe al territorio irrigado por una determinada arteria del cerebro. Cuando, como consecuencia de la severidad de la isquemia cerebral, se produce una pérdida celular irreversible con lesión destructiva localizada, se habla de “infarto cerebral” (García, 1984). En este tipo de isquemia se establece la denominada “lesión de ictus”, consistente en un núcleo central densamente isquémico que evolucionará a infarto, rodeado por áreas de isquemia de menor intensidad en las que las células se encuentran estructuralmente intactas pero funcionalmente inactivas (Symon y cols., 1974). Esta zona perifocal (“penumbra”), mantenida por la circulación colateral, tiende a evolucionar a infarto si el deterioro del flujo sanguíneo cerebral (FSC) persiste.

1.2- MODELOS ANIMALES DE ICTUS.

En los últimos 20 años se han llevado a cabo numerosos estudios para tratar de comprender los mecanismos implicados en el daño cerebral postisquémico, así como para desarrollar estrategias que minimicen sus repercusiones. Un elemento crucial en el estudio de la fisiopatología y farmacología del ictus es el uso de modelos animales adecuados. Los principales modelos de accidente cerebrovascular se han desarrollado en roedores. Su menor coste económico, la facilidad de su manejo y de su monitorización fisiológica, así como su mayor aceptación ética, justifican, en parte, la elección de estos animales frente a otros modelos llevados a

cabo en especies animales mayores (Ginsberg, 1996). Además, el elevado grado de homología genética (Rabin y cols., 1986), así como las similitudes (en lo básico) en la anatomía, fisiología y reactividad de la vasculatura cerebral entre roedores y humanos (Purves, 1972), apoyan también la elección de estos modelos.

En el área del accidente cerebrovascular, los distintos modelos animales se pueden agrupar en tres subgrupos: modelos de isquemia global, de isquemia focal y hemorrágicos. Los modelos hemorrágicos se basan en la producción de un sangrado en el cerebro, siendo la infusión de colagenasa la principal forma de lograrlo. Los modelos de isquemia global, basados en la oclusión de las grandes arterias que irrigan el encéfalo, se usan cada vez menos debido a la opinión generalizada de que reproducen mejor las consecuencias cerebrales del fallo cardíaco que las de un accidente cerebrovascular (Green y Cross, 1997). Por último, los modelos de isquemia focal están basados en la oclusión permanente o transitoria de una arteria cerebral específica. Generalmente se llevan a cabo con la ACM, debido a que en humanos la mayor incidencia de infartos focales se localiza en las áreas irrigadas por ese vaso; al menos el 25% de los infartos en pacientes que sufren el primer accidente cerebrovascular, y hasta el 80% se asocian con daño isquémico en ese territorio (McAuley, 1995).

Los principales métodos de oclusión arterial en roedores son: trombosis inducida fotoquímicamente, embolismo con un coágulo o con microesferas, coagulación o ligadura, oclusión intraluminal y, finalmente, empleo de cepas de ratas espontáneamente hipertensas que desarrollan infartos de forma espontánea (revisado por de Leciñana y cols., 2001). Uno de los modelos más utilizados de oclusión arterial es la aproximación subtemporal de Tamura (Tamura y cols., 1981): mediante una craniotomía subtemporal se accede a una zona distal del origen de la ACM, que es coagulada a ese nivel. El mayor inconveniente de esta técnica es que es irreversible, resultando en una isquemia permanente.

En determinados casos de accidente cerebrovascular el FSC puede restablecerse, bien por disgregación espontánea del trombo, o bien por intervención clínica (McAuley, 1995), por lo que resultan de gran interés los modelos que permiten la inducción de isquemia focal reversible; es decir, con reperusión. Entre

estos modelos de isquemia focal transitoria, los más utilizados son la compresión arterial mediante pinzamiento o ligadura (Shigeno y cols., 1985), la aplicación abluminal de endotelina sobre la arteria (Macrae y cols., 1993) y, sobre todo, la oclusión intraluminal de la ACM. Este último presenta la ventaja sobre los anteriores de que permite llevar a cabo la oclusión proximal de la ACM de forma reversible y sin craniotomía, introduciendo una sutura en la arteria carótida interna y haciéndola avanzar hasta que sobrepase el origen de la ACM (Zea Longa y cols., 1989). En el caso de la oclusión proximal, la ACM se ocluye cerca de su ramificación desde la arteria carótida interna, inmediatamente antes del origen de las arterias lenticuloestriadas. Tras la oclusión, el FSC no se reduce uniformemente en toda la zona afectada. El centro de esta zona (núcleo) se define como la región en la que el FSC se reduce hasta un 15% o menos, y abarca la porción lateral del estriado (caudado-putamen) y al cortex parietal. La penumbra es la región en la que el FSC se reduce hasta un 40% o menos, y comprende al resto del neocortex, el cortex entorhinal y el estriado medial. En cuanto a la oclusión distal de la ACM (aproximación subtemporal), el FSC a los ganglios basales no se interrumpe y por lo tanto la lesión se restringe al neocortex. La reducción del FSC en el núcleo y en la penumbra de este modelo es similar a la que se obtiene con el modelo de la oclusión proximal (Lipton, 1999; Zukin y cols., 2004).

El volumen del infarto dependerá fundamentalmente de la duración de la isquemia y de la severidad de la misma, así como de otros factores como son: temperatura corporal, presión arterial, glucemia, pH y presiones parciales de oxígeno y dióxido de carbono en sangre (revisado por de Leciñana y cols., 2001). Pese a que hace ya bastante tiempo que se conoce la influencia de estos parámetros hemodinámicos y metabólicos sobre el resultado de la isquemia, en la actualidad la mayoría de estudios publicados sobre neuroprotección son llevados a cabo sin tenerlos en cuenta.

1.3- FISIOPATOLOGÍA DE LA ISQUEMIA CEREBRAL.

1.3.1- Flujo sanguíneo cerebral y penumbra isquémica.

Estudios previos sobre la perfusión cerebral llevados a cabo en distintas especies animales, han puesto de manifiesto la existencia de al menos dos umbrales de reducción del FSC en la patogénesis del daño cerebral isquémico: el umbral superior, situado aproximadamente a un 35% del FSC normal, que conduce a la supresión funcional (fallo en la transmisión sináptica) con aplanamiento del electroencefalograma (EEG); y el umbral inferior, situado aproximadamente al 15-20% del FSC normal, que provoca una alteración severa de la homeostasis iónica. Al concepto de “umbral de FSC” se añade la noción de “dependencia temporal”, encontrándose una relación curvilínea entre la intensidad y la duración de la isquemia para provocar el daño neuronal (Hossmann, 1994a). Así, reducciones próximas al 100% del FSC normal provocan daños neuronales en unos pocos minutos, mientras que descensos del FSC menos severos requieren un mayor tiempo para provocar un daño permanente.

La **penumbra** se define electrofisiológicamente como aquella región que mantiene niveles de FSC por debajo del umbral de silencio electrocortical, pero por encima del necesario para la alteración masiva de la homeostasis iónica (Ginsberg, 1997). Esta penumbra isquémica es, por lo tanto, la región susceptible de ser “rescatada” de la agresión isquémica mediante terapias farmacológicas, ya que el daño en el núcleo es irreversible a los pocos minutos tras la oclusión. La penumbra isquémica presenta las siguientes características (Ginsberg, 1997):

- 1- Desacoplamiento entre el metabolismo y el flujo sanguíneo, debido a que no mantiene la capacidad autorreguladora del flujo sanguíneo (Back y cols., 1995).
- 2- El tamaño de la penumbra isquémica temprana supone el 50% o más de la lesión isquémica final (Back y cols., 1995).
- 3- Pese a la reducción de flujo, el consumo de glucosa se mantiene e incluso se incrementa ligeramente (fundamentalmente por vía anaerobia) para tratar de mantener los niveles energéticos de la célula (Ginsberg y cols., 1996).

- 4- La penumbra presenta despolarizaciones isquémicas recurrentes, con elevaciones transitorias de la concentración de K^+ extracelular que son deletéreas para el tejido debido al desacoplamiento entre la perfusión y el metabolismo (Takeda y cols., 1993; Back y cols., 1994).
- 5- La vida media de la penumbra (y por lo tanto la ventana terapéutica) es corta, evolucionando rápidamente hacia la lesión isquémica irreversible. Tras 2 horas de la oclusión de la arteria cerebral media (ACM) en el núcleo, y de 3-4 horas en la penumbra, se observa proteólisis avanzada del citoesqueleto (Yao y cols., 1995).

1.3.2- Respuesta microvascular cerebral a la isquemia focal.

La microvasculatura cerebral, definida como aquellos elementos vasculares de menos de 100 μm de diámetro, posee unas características ultraestructurales únicas que permiten una estrecha relación entre el endotelio y las células sanguíneas, y las neuronas a las que sirven a través de los astrocitos. Múltiples procesos fisiopatológicos que tienen como diana la microvasculatura cerebral, entre los que se encuentra la isquemia/reperfusión, ponen de manifiesto su importancia en la patogénesis de muchas enfermedades (Zhang y cols, 1994b; Buée y cols., 1997). Clásicamente se pensaba que los microvasos eran menos sensibles a la isquemia que las neuronas, debido en parte a la mayor resistencia de las células endoteliales a la hipoxia. Sin embargo, revisiones recientes (del Zoppo y Mabuchi, 2003) muestran el gran número de respuestas a la isquemia cerebral focal que presenta la microvasculatura cerebral: expresión en las células endoteliales de receptores de adhesión leucocitaria como las selectinas (P, E y L) y las “moléculas de adhesión intercelular” (“intercelular adhesión molecules”; ICAMs), elementos pro-angiogénicos como el “factor de crecimiento vascular endotelial” (“vascular endotelial growth factor”, VEGF) y la integrina $\alpha_v\beta_3$, transportadores de nutrientes como la “proteína transportadora de glucosa” (“glucose transporter protein”, GLUT-1), proteasas que degradan las proteínas de la matriz extracelular y, también, pérdida de integrinas estructurales de las células endoteliales y astrocitos y de los principales constituyentes de la matriz vascular (laminina 1 y 5, colágeno tipo IV, fibronectina,

etc.). Estas respuestas de la microvasculatura a la isquemia conducen a la pérdida de la barrera hematoencefálica (BHE), formación de edema y a fenómenos de coagulación y adhesión e infiltración leucocitaria (inflamación), así como de angiogénesis.

Tanto en estudios clínicos como experimentales se ha observado que la formación del edema se origina rápidamente tras el inicio de la oclusión por la pérdida de la barrera de permeabilidad vascular (Okada y cols., 1994; Risau y cols., 1998). Existen evidencias de que esta pérdida de la integridad de la BHE y de la matriz extracelular (lámina basal) es el resultado de la acción de sustancias como bradikina, trombina (Aschner y cols., 1997), VEGF (Zhang y cols., 2000), metaloproteasas activas de la matriz (Heo y cols., 1999), así como de proteasas liberadas por leucocitos activados (Opdenakker y cols., 2001) y otras actividades proteasa (Hosomi y cols., 2001). Se ha asociado la pérdida de la matriz microvascular con la transformación hemorrágica del infarto y la consecuente acumulación de hemoglobina en el parénquima cerebral (Hamann y cols., 1996).

La inflamación ha sido implicada como fuente de daño secundario tras la isquemia. Tras el episodio de isquemia/reperfusión, el endotelio vascular promueve la inflamación a través de la liberación de citoquinas y la aparición de moléculas de adhesión que permiten la adhesión y migración de los leucocitos circulantes dentro del sistema nervioso central (SNC). Tan sólo una hora después del inicio de la oclusión ya se puede observar la diapédesis de leucocitos polimorfonucleares en el núcleo isquémico (Abumiya y cols., 1999).

La activación y agregación plaquetaria, adhesión de leucocitos al endotelio, así como el depósito de fibrina en la luz vascular debido a la generación intravascular de trombina (Okada y cols., 1994), contribuyen a la obstrucción microvascular. Conjuntamente con la compresión por el edema, hinchazón del endotelio y formación de microvellosidades en las células endoteliales (del Zopo y cols., 1991; del Zopo, 1994), contribuyen al fenómeno de “no reflujo” (Ames y cols., 1968), por el cual los microvasos permanecen obstruidos tras liberarse la oclusión que inicialmente causaba la isquemia, aunque también existen evidencias que apuntan a

la peroxidación lipídica como participe en la génesis de este fenómeno (Cerchiari y cols., 1987; Hall y Yonkers, 1988)

La generación de nuevos capilares (angiogénesis) tras la agresión isquémica fue demostrada por Tsutsumi y colaboradores (1986) en un modelo canino. Una teoría sobre esta neovascularización se basa en que la hipoxia induce la expresión del “factor inducible por hipoxia 1” (“hypoxia inducible factor 1”, HIF-1), que a su vez estimula la expresión de VEGF e integrina $\alpha_v\beta_3$ (Namiki y cols., 1995). VEGF estimula la proliferación microvascular, mientras que la integrina $\alpha_v\beta_3$ es necesaria para la angiogénesis, neovascularización y remodelación del tejido (Varner y cols., 1995). Marti y colaboradores (2000) han demostrado que, precediendo a la neovascularización, se produce la expresión inducida por hipoxia de VEGF en el borde del neocortex isquémico en roedores.

1.3.3- La cascada isquémica en el tejido cerebral.

Los principales efectos a nivel celular que produce la isquemia son conocidos desde hace algunos años, y se resumen en la **figura 1.1**.

La principal consecuencia metabólica inmediata que se produce tras la isquemia es el descenso del contenido energético de las células, ATP y fosfocreatina (Siesjö y Ljunggren, 1973), y la acumulación de sus productos de degradación, como la adenosina (Kleihues y cols., 1974). Debido a ello, todas las reacciones dependientes de ATP quedan inhibidas por el descenso de la carga energética celular. Esto afecta especialmente al metabolismo de las proteínas, cuya degradación y síntesis parecen estar suspendidas durante y después del episodio isquémico (Kleihues y Hossmann, 1971; Mies y cols., 1991).

La degradación anaeróbica de las reservas de glucosa genera ácido láctico, que se acumula y hace bajar el pH hasta valores de 6.5 (Ljunggren y cols., 1974). Esta acidosis desplaza al Ca^{2+} de su unión a proteínas (Folbergrova y cols., 1990), y hace aumentar su concentración intracelular.

La pérdida de ATP provoca que la célula pierda progresivamente la capacidad de recaptar el K^+ que sale al exterior, y también la entrada de Ca^{2+} como consecuencia de las despolarizaciones de la membrana celular que se producen

(“despolarizaciones isquémicas”). Estas despolarizaciones terminan en la “despolarización anóxica” por la incapacidad para mantener la homeostasis iónica, con la entrada masiva de Ca^{2+} al interior de la célula (Harris y cols., 1981; Siesjö, 1990; Katsura y cols., 1993). Este flujo de Ca^{2+} hacia el interior de las neuronas activa multitud de procesos:

- 1- Liberación de noradrenalina y adenosina por exocitosis, que activan a la adenilato ciclasa unida a la membrana con lo que aumentan los niveles de AMPc y la permeabilidad de la membrana de las células gliales (Kobayashi, 1977). Estas células captan Na^+ , Cl^- y agua, produciéndose el edema astrocítico perivascular y perineuronal (Katzman y cols., 1977; Siesjö, 1981).
- 2- Liberación de otros neurotransmisores como consecuencia de esta alteración de la actividad iónica, de los cuales el glutamato es el principal compuesto neurotóxico (Hossmann, 1994b), debido al funcionamiento inverso de los transportadores de glutamato en condiciones de una disminución severa de ATP (Madl y Burgesser, 1993; Jaubaudon y cols., 2000; Rossi y cols., 2000). Esta liberación de neurotransmisores provoca la formación de edema por apertura de canales iónicos que permiten la entrada de Na^+ y Cl^- y, consecuentemente, la entrada de agua; y por su unión a los receptores N-metil-D-aspartato (NMDA) y α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propionato (AMPA)/kainato, que permiten la entrada masiva de Ca^{2+} al interior celular (Benveniste y cols., 1984).
- 3- Activación de diversas reacciones enzimáticas, nocivas cuando se producen sin control: proteasas, que degradan las proteínas constitutivas del citoesqueleto; endonucleasas, que atacan a los ácidos nucleicos; proteinquinasas, que catalizan fosforilaciones que modifican la función de receptores y canales iónicos; y fosfolipasas, que degradan fosfolípidos y alteran la permeabilidad de la membrana celular permitiendo la salida al compartimento extracelular de los constituyentes intracelulares, entre los que se encuentran el glutamato y aspartato. La degradación de fosfolípidos conduce a la formación de ácido araquidónico, que a su vez es degradado por

los enzimas lipoxigenasa y ciclooxigenasa, terminando en la producción de prostaglandinas y peróxidos (Shohami y cols., 1982).

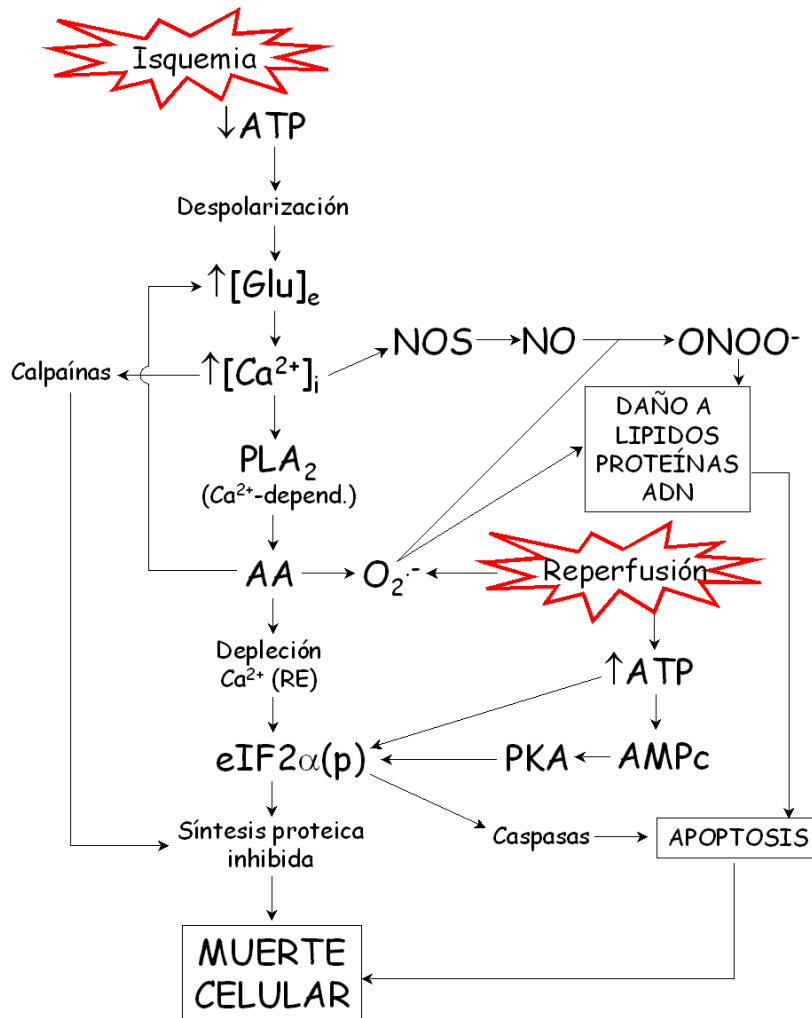


Figura 1.1: Rutas de la cascada isquémica (simplificadas) que conducen a la muerte celular.

Entre las posibles dianas que pueden ser clave para la intervención terapéutica se encuentran tres especialmente interesantes por haber sido ampliamente asociadas a la isquemia cerebral y a patologías neurodegenerativas: óxido nítrico (NO), radicales libres (RLs) y especies reactivas de oxígeno (EROs) e inflamación.

1.3.3.1- Oxido Nítrico (NO).

- *Fisiología del NO.*

El NO es el producto de secreción celular de menor peso molecular que se conoce en Mamíferos. En condiciones fisiológicas es un gas que se disuelve en los fluidos celulares y puede atravesar las membranas por simple difusión. Es sintetizado en muchos tipos celulares por una familia de tres isoenzimas denominados “óxido nítrico sintasas” (NOS): neuronal, endotelial e inducible. También se ha descrito la existencia de una forma mitocondrial (Giulivi y cols., 1998; Elfering y cols., 2002) y la producción de NO de forma no enzimática en condiciones reductoras y de pH bajo (estómago, superficie de la piel, tejido isquémico), pero su relevancia es incierta (Weitzberg y Lundberg, 1998). La NOS neuronal (nNOS) se expresa constitutivamente en las neuronas, y su actividad está regulada principalmente por Ca^{2+} , así como también lo está la NOS endotelial (eNOS), expresada constitutivamente en las células del endotelio vascular, en las fibras nerviosas perivasculares (Iadecola y cols., 1993) y en algunas neuronas del hipocampo y otras regiones cerebrales (Dinerman y cols., 1994). Finalmente, la isoforma inducible de la NOS (iNOS) aparece en varias poblaciones de células cerebrales: células gliales implicadas en la respuesta inmune inespecífica asociada a condiciones patológicas (Murphy, 2000), células vasculares y neutrófilos infiltrados en el tejido cerebral (Iadecola y cols., 1996). La inducción de esta isoforma supera con mucho a la de las isoformas constitutivas.

Producido localmente por algunos tipos celulares, el NO es un radical inestable con una vida media biológica de tan sólo unos pocos segundos. El NO actúa como un transmisor, difundándose rápidamente a la vecindad inmediata de las células, y como una hormona, uniéndose a transportadores e incorporándose al torrente sanguíneo. El NO no es un neurotransmisor convencional, puesto que no sólo no se almacena ni su liberación es dependiente de vesículas, sino que su acción depende de la difusión de la molécula desde su lugar de síntesis hacia las células vecinas. Tampoco actúa como los mensajeros clásicos, por unión no covalente al receptor específico, sino por unión covalente a su diana debido a su potencial redox. El NO es un mensajero multifuncional que afecta a numerosos procesos como

apoptosis (Kolb y cols., 2001), regulación del tono vascular (Moncada y cols., 1991; Lowenstein y Snyder, 1992), resistencia a la infección mediada por macrófagos (Linares y cols., 2001), adhesión plaquetaria y leucocitaria (Radomsky y cols., 1987; Kubes y cols., 1991), sinaptogénesis durante el desarrollo (Contestabile, 2000) y plasticidad neuronal en el adulto (Schuman y Madison, 1991; Bohme y cols., 1993), regulación del balance entre proliferación celular y diferenciación, y con ello del tamaño y forma de los órganos adultos (Kuzin y cols., 2000), etc. En una revisión de Gewaltig y Kojda (2002) sobre la actividad vasoprotectora del NO, se recopilan los distintos efectos que tiene el NO a nivel de los vasos sanguíneos en condiciones fisiológicas normales. El NO tiene efectos vasorrelajantes y antiplaquetarios, antiadhesión de leucocitos, antiproliferativos y antioxidantes. En el tejido cerebral, el NO también desempeña otras funciones:

- 1- En condiciones fisiológicas el NO juega un importante papel en la modulación de diferentes funciones del SNC, actuando como mensajero intercelular en el cerebro; sus células diana son las células adyacentes (glía y neuronas). El flujo de Ca^{2+} hacia el interior celular, fundamentalmente a través de los canales dependientes del receptor de tipo NMDA, activa la nNOS estimulando la producción de NO (Luo y cols., 1993) y mediando así la vasodilatación cerebral como respuesta a la activación de receptores NMDA (Meng y cols., 1995), acoplado el metabolismo celular y el FSC. El NO, a través del GMPC, también está implicado en la modulación de la liberación de neurotransmisores excitadores como acetilcolina, noradrenalina y glutamato (Szabó, 1996; Prast y cols., 1998), e inhibidores como GABA (Ohkuma y cols., 1995, 2001). También se ha demostrado la liberación de neurotransmisores independiente del GMPC mediada por NO (Stewart y cols., 1996).
- 2- También se ha sugerido que el NO modula la transcripción génica en neuronas y glía (Peunova y Enikolopov, 1993, 1995), aunque existen pocas evidencias de promotores eucarióticos que respondan directamente al NO (Morris, 1995; Pilz y cols., 1995; Garbán y Bonavida, 2001).

- *El NO en la fisiopatología de la isquemia cerebral.*

En la **figura 1.2** se presentan las principales vías del NO tanto en la fisiología cerebral como en la fisiopatología de la isquemia. En la isquemia cerebral el NO parece tener dos efectos opuestos: mientras que su participación directa en la regulación hemodinámica local protege al tejido cerebral, una excesiva producción de NO resulta neurotóxica (Choi, 1993; Dalkara y cols., 1994b). Se ha descrito un incremento rápido y transitorio de la producción de NO en el cerebro de rata durante y tras la isquemia cerebral hasta niveles suficientes para provocar neurotoxicidad (Kader y cols., 1993; Malinski y cols., 1993; Tominaga y cols., 1993). La activación excesiva de los receptores NMDA debida a la liberación masiva de glutamato que se produce durante la isquemia produce un incremento masivo de Ca^{2+} intracelular en la neurona postsináptica, lo que conduce a una activación de la nNOS y una sobreproducción de NO (Kader y cols., 1993). En condiciones fisiológicas, la concentración de NO in vivo es de 10-100 nM y, en condiciones de isquemia aumenta hasta 2-4 μM (Malinski y cols., 1993). La inducción de la actividad NOS durante la fase aguda de la isquemia parece tener un importante efecto deletéreo sobre el tejido. Las posibles causas de ello son:

- 1- En las neuronas, concentraciones nanomolares de NO inhiben el enzima citocromo oxidasa de la cadena de transporte electrónico mitocondrial por reacción con el grupo hemo, compitiendo con el oxígeno. Esta inhibición es reversible, y sugiere que el NO regula la generación de energía y puede mediar la muerte celular actuando en la mitocondria (Beltrán y cols., 2000).
- 2- En condiciones de escasez de L-arginina y del cofactor de la NOS tetrahidrobiopterina (BH_4), la NOS genera O_2^- (Heinzel y cols., 1992) por un proceso conocido como “desacoplamiento”.
- 3- El NO modula la fusión de vesículas a la membrana (Meffert y cols., 1996), y con ello la liberación de neurotransmisores, contribuyendo al daño por excitotoxicidad.
- 4- El mediador principal del daño inducido por glutamato es el peroxinitrito (ONOO^-) (Tanaka y cols., 1997; Fukuyama y cols., 1998), generado principalmente en la región periinfártica. El NO reacciona muy rápidamente

con el O_2^- para formar $ONOO^-$, que es un oxidante más fuerte que el propio O_2^- . El $ONOO^-$ y sus derivados inducen el daño a proteínas por nitración de tirosinas, formación de ditirosinas y oxidación de tioles, incluidos los que contribuyen a la capacidad antioxidativa de las células (Radi y cols., 1991). Uno de los principales mecanismos de daño por NO y $ONOO^-$ parece ser debido al daño causado al ADN. Si éste es lo suficientemente severo, la activación del enzima de reparación nuclear poli-ADP ribosa polimerasa (PARP) provoca una disminución masiva de las reservas energéticas de la célula (Zhang y cols., 1994a; Pieper y cols., 1999), además de estimular la síntesis de factores proinflamatorios (Chiarugi y Moskowitz, 2003) a través del factor de transcripción NF- κ B. El $ONOO^-$, al igual que el NO, también es capaz de inducir la liberación de neurotransmisores (Ohkuma y Katsura, 2001).

- 5- Derivados oxidantes del NO inhiben la actividad de enzimas antioxidantes como la glutathion peroxidasa (Asahi y cols., 1995).
- 6- Otros mecanismos de la acción deletérea del NO pueden darse a través de la nitrosilación de enzimas, como la fosfoquinasa C (Hammer y cols., 1993) y la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (Zhang y Snyder, 1992); o interactuando con el hierro asociado con enzimas presente en grupos hemo o no hemo, como el citocromo p450 (Drapier y Bouton, 1996). También son nitrosiladas enzimas localizadas en la vía apoptótica, como p21^{RAS} en las células T humanas (Lander y cols., 1995), y algunos miembros de la familia de las caspasas, nitrosiladas en el sitio activo del enzima (Li y cols., 1997).

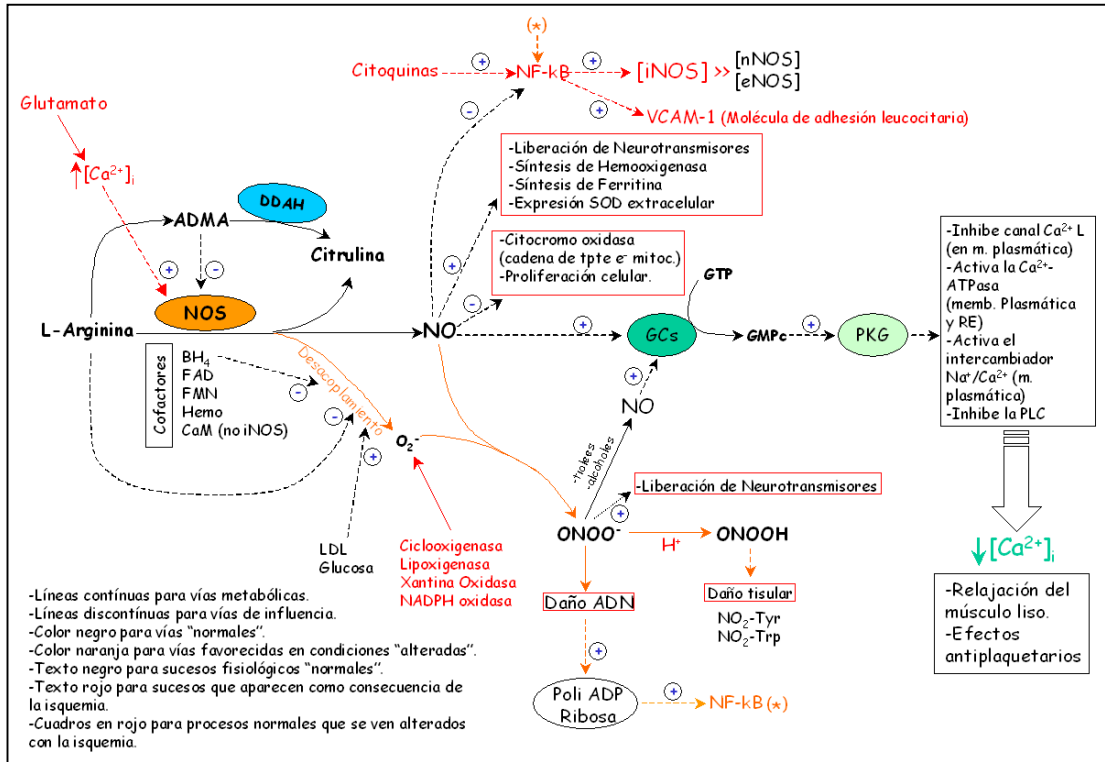


Figura 1.2: Principales vías del NO. Efectos fisiológicos y efectos fisiopatológicos relacionados con la isquemia cerebral.

1.3.3.2- Estrés oxidativo: radicales libres y especies reactivas de oxígeno.

Un RL es un átomo o molécula con un electrón desapareado en su orbital más externo. Esta conformación le hace extremadamente reactivo con otras especies químicas. Las EROs son moléculas con átomos de oxígeno y con capacidad oxidante. Muchos RLs, originados en el metabolismo oxidativo de las células, están basados en el oxígeno. Sin embargo, no todas las EROs son RLs (ej. H₂O₂), ni todos los RLs están basados en el oxígeno (ej. RS[•], radical tiólo), ni todos los RLs basados en el oxígeno son oxidantes fuertes (ej. O₂).

Los RLs y EROs están implicados en el funcionamiento normal de las células interviniendo en el mecanismo de acción de las citoquinas, factores de crecimiento y hormonas, alterando el transporte iónico a través de membrana, afectando a la transcripción de RNA, a la formación de energía metabólica, a la neuromodulación e interviniendo también en los mecanismos de muerte celular programada (Lander,

1997). Incluso, en determinadas circunstancias, el incremento local de RLs puede ser necesario, como en el caso de la liberación de EROs tóxicas por los neutrófilos activados, donde juegan un papel en la defensa frente a la infección, y liberación de RLs por células inmunocompetentes en la vigilancia frente al cáncer (Racek y cols., 2001).

El *estrés oxidativo* es la consecuencia de la exposición de las células a un exceso de RLs y EROs. Las células eucariotas están sometidas continuamente a un estrés oxidativo debido al oxígeno, necesario para la supervivencia pero también fuente de daño potencial. Este fenómeno se conoce como “paradoja del oxígeno”. Por ello, no es extraño que el estrés oxidativo participe en la etiología de numerosos desórdenes crónicos y enfermedades degenerativas como la enfermedad de Parkinson (Adams y Odunze, 1991), síndrome de Down (Kedziora y Bartosz, 1988), enfermedad de Alzheimer (Markesbery, 1997), esclerosis lateral amiotrófica (Brown Jr, 1996), daño traumático del sistema nervioso (Shohami y cols., 1997), así como en la isquemia cerebral (Peters y cols., 1998) y en el envejecimiento (Samson y Nelson, 2000).

Los RLs reaccionan con importantes macromoléculas, dañando a la célula y rompiendo el equilibrio oxidativo de la misma. Pueden reaccionar con los lípidos de las membranas, produciendo peroxidación lipídica (Polidori y cols., 1998; Fedorova y cols., 1999), alterando la fluidez característica y liberando subproductos tóxicos. Pueden reaccionar también con proteínas, alterando su estructura y/o función (Dimon-Gadal y cols., 1998; Salvi y cols., 2001), y con los ácidos nucleicos (Du y Gebicki, 2002), alterando su transcripción y traducción e incluso produciendo mutaciones somáticas. Median en la toxicidad inducida por glutamato (Chan y cols., 1990), en la muerte celular programada (Greenlund y cols., 1995; Stoian y cols., 1996) y en la transducción de señales y expresión génica (Palmer y Paulson, 1997). Existe una amplia evidencia de que las EROs juegan un papel importante en todas las etapas del origen y desarrollo de los tumores (Kovacic y Jacintho, 2001; Deshpande e Irani, 2002).

Una de las principales fuentes de radicales y EROs en las células eucarióticas es la mitocondria, debido a que el oxígeno es el aceptor terminal de los electrones en la cadena respiratoria mitocondrial durante la producción de ATP. Se ha demostrado que, en condiciones normales, entre un 2% y un 5% del flujo electrónico produce $O_2^{\cdot-}$ y H_2O_2 (Boveris y Chance, 1973). Las células eucarióticas han desarrollado sistemas de defensa específicos frente a estos subproductos de la respiración. La principal vía de detoxificación del radical $O_2^{\cdot-}$ es la formación extremadamente rápida de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) catalizada por el enzima SOD. En la célula existen 3 isoformas de la SOD: citosólica, mitocondrial y de la matriz extracelular. Este H_2O_2 formado es rápidamente detoxificado por la catalasa, enzima poco abundante en el cerebro de mamíferos, o principalmente por el enzima glutatión peroxidasa (GSH-Px), oxidando para ello al glutatión reducido (GSH), que puede ser reciclado de nuevo a GSH por el enzima glutatión reductasa (GR) empleando NADPH. La **figura 1.3** muestra la secuencia de reacciones.

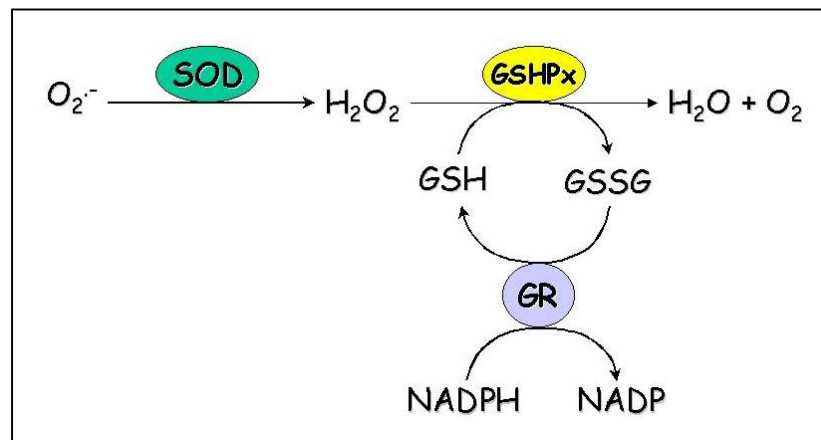


Figura 1.3: Ruta principal de detoxificación del anión superóxido en el cerebro.

El SNC es especialmente sensible a los RLs y EROs por diversas razones (Evans, 1993): 1) posee un elevado metabolismo oxidativo y una gran concentración de sustratos fácilmente oxidables (ácidos grasos poliinsaturados de la membrana); 2) posee un bajo nivel de enzimas antioxidantes (catalasa y GSH-Px); 3) en él se dan reacciones neuroespecíficas que generan EROs endógenamente (oxidación de dopamina, etc.); 4) sus células poseen una elevada relación membrana/volumen

citoplasmático; y 5) las neuronas no se replican y, por lo tanto, no pueden regenerarse. Los efectos deletéreos de los RLs sobre el tejido cerebral son numerosos: incrementan la permeabilidad de la BHE, provocan alteraciones en la formación de la tubulina, inhiben la respiración mitocondrial y perturban la transmisión sináptica y la homeostásis iónica de la membrana celular.

- Estrés oxidativo en la isquemia cerebral.

En condiciones de isquemia, la producción de EROs ocurre especialmente en aquellas regiones cerebrales isquémicas donde la pO_2 está parcialmente preservada por el FSC colateral: la penumbra isquémica. La formación de EROs se produce durante la fase de oclusión, pero es con la reperfusión cuando se dispara su producción (Peters y cols., 1998). La reoxigenación durante la fase de reperfusión proporciona oxígeno tanto para la supervivencia neuronal como para numerosas reacciones de oxidación enzimáticas y no enzimáticas, que originan oxidantes altamente reactivos (Chan, 2001). La condición de isquemia focal, caracterizada por un descenso en la perfusión cortical local pero no su completa desaparición debido a la circulación colateral en la zona de penumbra, proporciona unas mejores condiciones para la formación de estas especies reactivas en comparación con la isquemia global, donde no hay transporte alguno de O_2 .

Los radicales hidroxilo ($\cdot OH$) son extremadamente reactivos (oxidantes) e inician rápidamente la peroxidación lipídica y el daño al ADN. Se pueden originar rápidamente a partir de $O_2^{\cdot -}$ a través de la reacción de Fenton. Otra fuente de $\cdot OH$ es a través de la reacción del $O_2^{\cdot -}$ con el $NO\cdot$. El producto de esta reacción es el $ONOO^{\cdot -}$. A pH fisiológico, el $ONOO^{\cdot -}$ se degrada rápidamente a $\cdot OH$ y dióxido de nitrógeno ($NO_2\cdot$). El $ONOO^{\cdot -}$ es un poderoso prooxidante y puede reaccionar con SOD para formar un poderoso agente nitrante, capaz de nitrar tirosinas de proteínas celulares e iniciar la disfunción y muerte celular (Beckman y cols., 1993).

La activación de las fosfolipasas A_2 y C, debida a la entrada masiva de Ca^{2+} al interior celular, provoca a su vez la liberación de ácido araquidónico de los fosfolípidos de membrana. Además de poder volver a incorporarse a la membrana, es

el sustrato de lipooxigenasas y ciclooxigenasas, que lo metabolizan a prostaglandinas, leukotrienos y EROs, entre ellas O_2^- .

Los efectos de los RLs en estas condiciones son muchos y muy variados. Durante la fase de isquemia/reperfusión, el enzima xantina deshidrogenasa es convertido a xantina oxidasa, capaz de generar O_2^- y H_2O_2 durante el metabolismo de la xantina e hipoxantina a ácido úrico (Till y cols., 1991). Además, los RLs y EROs son capaces de activar o inactivar a numerosos enzimas: activan la guanilato ciclasa (GC), por oxidación con H_2O_2 de grupos sulfhidrilo (White y cols., 1976) e inactivan a la glutamato sintetasa, CuZn SOD (Oliver, 1987; Sharonov y Churilova, 1992), e incluso xantina oxidasa, por H_2O_2 , resultando en un mecanismo de retroalimentación negativa, para la prevención del daño celular oxidativo (Terada y cols., 1991). También inactivan a la GSH-Px (Fujii y Taniguchi, 1999), una de las principales defensas frente al daño oxidativo en el cerebro.

En las células existen factores de transcripción específicos del daño oxidativo, como el NF- κ B, persistentemente activado en las neuronas destinadas a morir y sólo transitoriamente activado en aquellas que sobreviven. Su activación puede ser bloqueada por antioxidantes (Clemens, 2000).

Aunque la síntesis proteica postisquémica está profundamente suprimida, durante los primeros momentos de la isquemia se produce la transcripción y síntesis de numerosas proteínas en la célula (Akins y cols., 1996) como respuesta a la activación génica producida por EROs (Cimino y cols., 1997).

1.3.3.3- Inflamación.

La inflamación juega un papel vital en la recuperación tisular, formando parte del sistema de defensa inmunitaria. El daño tisular estimula la perfusión local y el flujo de leucocitos para iniciar la reparación de la zona dañada. Esta respuesta incluye a los receptores de adhesión leucocitaria, la liberación de sustancias biológicamente activas y cambios microvasculares que permiten la invasión del tejido dañado por leucocitos. Sin embargo, en pacientes que han sufrido un accidente cerebrovascular isquémico, los procesos inflamatorios tempranos aparentemente resultan deletéreos y la inflamación ha sido implicada como fuente de daño

secundario tras la isquemia y posterior infarto. Tras la isquemia/reperfusión, el endotelio vascular promueve la inflamación a través de la aparición de moléculas de adhesión que permiten la adhesión y migración de los leucocitos circulantes desde el torrente sanguíneo al SNC. Una vez allí, la producción de moléculas citotóxicas promueven la muerte celular. Los efectos celulares de la inflamación se inician con la síntesis y liberación de citoquinas como respuesta a la reducción del flujo sanguíneo. Los astrocitos y microglía son las células de vigilancia inmune del sistema nervioso y son activadas en la penumbra como consecuencia de la agresión isquémica. Sin embargo, tras la isquemia los astrocitos y microglía, leucocitos polimorfonucleares (PMNLs) y células endoteliales, producen citoquinas como las interleukinas (IL) 1 y 6 y el “factor de necrosis tumoral” (“tumor necrosis factor”, TNF), aparte de responder a ellas a través de receptores específicos (feedback positivo) y exacerbando así el daño endotelial en el tejido. La microglía, además, también posee una gran capacidad sintética de mediadores neurotóxicos: RLs, aminoácidos excitotóxicos y enzimas proteolíticos activados (Banati y cols., 1993). Citoquinas como el TNF- α , interleukinas como IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-10, histamina, trombina, factor de activación plaquetaria (“platelet activating factor”, “PAF”), proteínas quimiotácticas monocíticas (“monocyte chemotactic proteins”, “MCPs”), proteína inflamatoria 1 de macrófago (“macrophage inflammatory protein 1”, “MIP-1”), etc., son sintetizadas y liberadas al plasma. Esta liberación es la responsable de la activación y quimiotaxis de los PMNLs y monocitos/macrófagos. También algunas citoquinas específicas son las que inician la transcripción de receptores de adhesión en los leucocitos y en el endotelio microvascular. La modificación de las características del endotelio durante la isquemia y reperfusión es esencial para la participación de los PMNLs en los eventos que conducen al infarto cerebral. La relevancia de los PMNLs en el desarrollo del infarto tras la isquemia cerebral focal fue puesta de manifiesto por Matsuo y colaboradores (1994), que demostraron una reducción significativa del tamaño de infarto asociada a una leucopenia inducida.

La migración de los leucocitos se piensa que está dirigida por un gradiente transendotelial de quimioatrayentes solubles: productos de la activación del complemento, metabolitos de la cascada del ácido araquidónico (como consecuencia

de la activación de fosfolipasas A_2 , ciclooxigenasa y lipoxigenasa), quimioquinas como IL-8 y quimioatrayentes neutrofílicos inducidos por citoquinas (“cytokine-induced neutrophil chemoattractants”, “CINC”).

- *Participación de las PLA₂s en la fisiología cerebral y en la fisiopatología de la isquemia.*

Las fosfolipasas A_2 (PLA₂s) son un grupo de enzimas que hidrolizan fosfolípidos de membrana en la posición sn-2, liberando ácidos grasos y lisofosfolípidos. Las distintas isoformas de las PLA₂s tienen una función limitante en la generación de mediadores lipídicos como el ácido araquidónico (AA), PAF y toda la batería de eicosanoides, que tienen un papel muy importante en procesos como la potenciación a largo plazo (Wolf y cols., 1995) así como en la proliferación y diferenciación celular (revisado por Akiba y Sato, 2004). También se ha relacionado la actividad PLA₂ con los procesos de plasticidad sináptica asociada a la formación de la memoria (Holscher y Rose, 1994). Sin embargo, en condiciones fisiopatológicas, las distintas isoformas de PLA₂s juegan un papel muy importante en procesos neurodegenerativos, así como en la desmielinización y apoptosis en el SNC (Farooqui y cols., 1997a; Kalyvas y David, 2004).

Se han caracterizado tanto formas citosólicas (cPLA₂s) como de secreción (sPLA₂s), formando una lista que sigue creciendo en la actualidad. Estas fosfolipasas se pueden clasificar en base a, entre otros parámetros, su peso molecular y su actividad catalítica dependiente o no de Ca^{2+} (**tabla 1.2**). Así, en Mamíferos, hasta la fecha se conocen 19 formas distintas de PLA₂s, 10 de secreción (subgrupos IB, IIA, IIC, IID, IIE, IIF, III, V, X y VIIA) y 9 intracelulares, 3 dependientes de Ca^{2+} (grupos IVA y IVB) y 6 independientes de Ca^{2+} (subgrupos IVC, VIA-1, VIA-2, VIB, VIIB, VIIIA y VIIIB). También se han encontrado isoformas de PLA₂ en plantas (subgrupo XI) (Revisado por Six y Dennis, 2000; Phillis y O’Regan, 2004).

Tabla 1.2: Comparativa de las PLA₂s en mamíferos.

PLA ₂ s de secreción			PLA ₂ s citosólicas			
Grupo	Subgrupo	Tamaño (kDa)	Grupo	Subgrupo	Tamaño (kDa)	Dependencia de Ca ²⁺
I	B	13-15	IV	A	85	Si
II	A	13-15		B	114	Si
	C	15		C	61	Si
	D	14-15	VI	A-1	84-85	No
	E	14-15		A-2	88-89	No
	F	16-17		B	88	No
III		15-18	VII	A	40	No
V		14		B	26	No
X		14	VIII		26	No
XII		21				

Molloy y cols. (1998) han revelado la expresión de mRNA de 4 isoformas de secreción (IB, IIA, IIC y V) y 1 citosólica (VI) en el cerebro de rata adulta. Los subgrupos IIA, IV y VI se expresan de forma ubicua en todo el cerebro, con niveles similares en todas las regiones. La actividad PLA₂ dominante en la fracción citosólica es la VI (Ca²⁺-independiente). El mRNA de los subgrupos IIA, IV y VI se expresa de forma ubicua en todo el cerebro, con niveles similares en todas las regiones. El subgrupo IB no se expresa prácticamente en el cerebro.

Las isoformas citosólicas hidrolizan preferentemente fosfolípidos que contienen araquidonato en la posición sn-2, liberándolo como AA. En condiciones normales, la síntesis y reciclado del AA se encuentran equilibradas y dependen, principalmente, de la actividad cPLA₂ independiente de Ca²⁺. La función principal de esta actividad cPLA₂ es el remodelado de los fosfolípidos de membrana y no induce la síntesis neta de eicosanoides porque la tasa de liberación de AA es menor o igual a la de incorporación a la membrana por las acilasas de los fosfolípidos generados, no quedando disponible AA para las ciclooxigenasas y lipooxigenasas. Sin embargo, en condiciones fisiopatológicas, la generación de AA sobrepasa a la capacidad de reincorporación a la membrana del AA, debido fundamentalmente al incremento en la [Ca²⁺]_i y la activación de las isoformas citosólicas cuya actividad depende de Ca²⁺ y, si esta sobreestimulación es lo suficientemente prolongada en el tiempo, por la

inducción de las isoformas de secreción (Fitzpatrick y Soberman, 2001). Este incremento de la actividad PLA₂ induce la síntesis masiva de sustancias bioactivas, por un lado por la liberación de lisofosfolípidos y, por otro, la acumulación de AA y su degradación por la vía de los eicosanoides (**figura 1.4**).

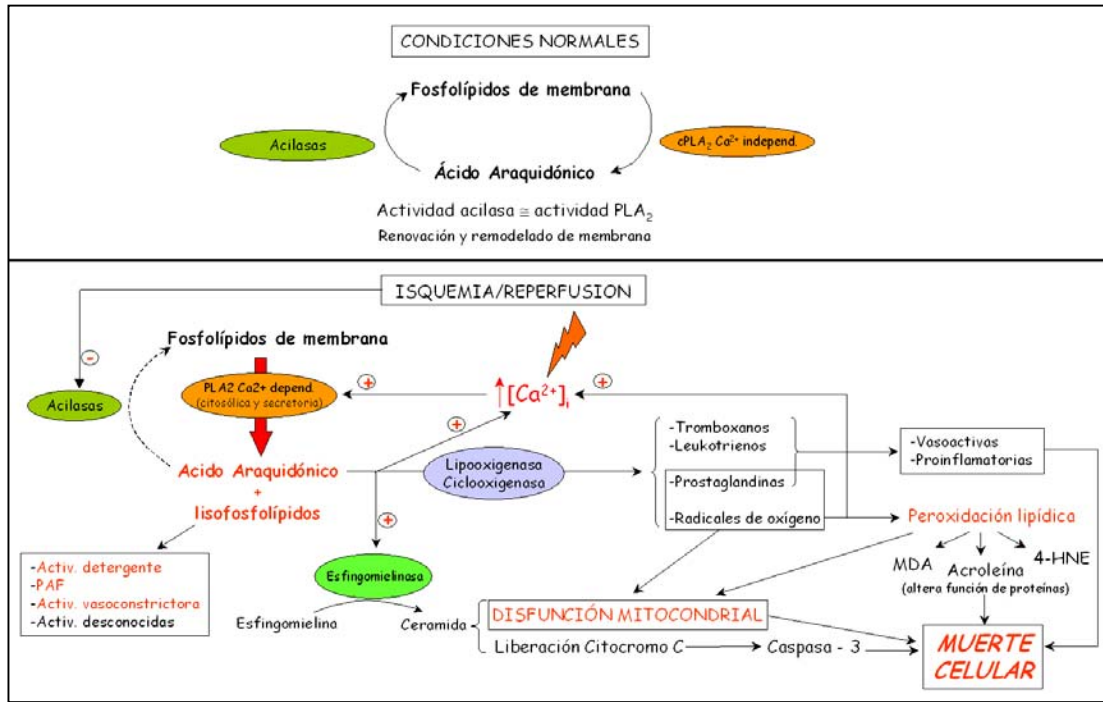


Figura 1.4: Actividad de PLA₂s en condiciones normales y tras un episodio de isquemia-reperfusión.

Los lisofosfolípidos, aparte de tener acción detergente sobre la membrana a altas concentraciones, son capaces de alterar la homeostasis iónica del Ca²⁺ (Inoue y cols., 1992), de provocar vasoconstricción y son fácilmente convertibles en PAF por acetilación. Por otro lado, el AA origina también, a través de la ciclooxigenasa (COX), la síntesis de factores pro-inflamatorios y otros metabolitos importantes en la inflamación y daño neuronal. Además, las sPLA₂s son capaces de inducir la liberación de glutamato (O'Regan y cols., 1995; Wei y cols., 2003) y muerte celular debido a un incremento en la concentración de Ca²⁺ intracelular (Kolko y cols., 1999; DeCoster y cols., 2002). Este incremento está posiblemente mediado por la producción masiva de AA, que modula la actividad de los receptores NMDA y/o de los canales de Ca²⁺.

Las principales funciones de las sPLA₂s clásicamente se han asociado a su actividad catalítica, aunque recientemente se ha puesto de manifiesto la existencia de, al menos, dos tipos distintos de receptores de membrana (tipos N y M), siendo el tipo N el más abundante en el cerebro de la rata, que permiten la unión de estas isoformas de secreción a la superficie externa de la membrana celular (revisado por Lambeau y Lazdunski, 1999). La unión de las distintas isoformas de sPLA₂ al receptor puede inducir tanto la inactivación de su actividad catalítica, como la activación de procesos de eliminación de la propia sPLA₂, proliferación y migración celular, producción de citoquinas pro-inflamatorias, etc. (Hanasaki y Arita, 2002).

1.4. TERAPÉUTICA DEL ICTUS: NEUROPROTECCIÓN.

De todo lo expuesto hasta ahora se pueden derivar tres posibles estrategias orientadas a minimizar las consecuencias del accidente cerebrovascular isquémico: 1) incrementar las reservas energéticas de las células (tratamiento profiláctico exclusivamente), 2) minimizar el daño restableciendo la perfusión lo antes posible (terapias trombolíticas), y 3) neuroprotección propiamente dicha.

El incremento de las reservas energéticas de las células (por ejemplo con un suplemento de creatina en el medio de cultivo o la dieta) retrasa la aparición de la despolarización anóxica y por lo tanto la muerte celular propiamente dicha (Balestrino y cols., 2002). Por otra parte, la restauración temprana de la perfusión del área afectada (terapia trombolítica) se ha demostrado como una terapia farmacológica efectiva tanto en modelos animales como en ensayos clínicos (NINDS rt-PA Stroke Study Group, 1995), y la única aprobada para su uso en clínica. Tras un breve episodio de isquemia, las células son capaces de recuperar la homeostasis iónica simultáneamente a una recuperación (al menos parcial) del contenido energético de las células (Ekholm y cols., 1993). Si la isquemia es lo suficientemente prolongada, el tratamiento trombolítico no sólo no resulta efectivo (Hacke y cols., 1995), sino que exacerba el daño por reperfusión (Jenkins y cols., 1981). Por último, la neuroprotección consiste en impedir o limitar farmacológicamente la progresión de la cascada isquémica en el tejido cerebral una vez que ésta se ha iniciado. Según

su mecanismo de acción primario, las estrategias neuroprotectoras se pueden clasificar en los siguientes grupos (Dorman, 1996):

- 1- Moduladores del sistema de aminoácidos excitadores.
- 2- Moduladores del flujo de calcio.
- 3- Activadores metabólicos.
- 4- Agentes anti-edema.
- 5- Inhibidores de la adhesión leucocitaria.
- 6- Secuestradores de RLs.
- 7- Promotores de la reparación de membranas (e inhibidores de su degradación).
- 8- Compuestos con efectos desconocidos.

Debido a la redundancia de vías metabólicas distintas que conducen finalmente a la muerte celular, la línea a seguir debe pasar necesariamente por el empleo de fármacos capaces de interferir en puntos clave de varios de los procesos desencadenados por la isquemia/reperfusión. En el presente trabajo se han elegido como dianas farmacológicas el sistema del NO, el estrés oxidativo y la inflamación.

1.4.1- Estrategias relacionadas con el NO.

La modulación terapéutica de la producción de NO como tratamiento en aquellas patologías en las que se ha observado su implicación, ha generado un interés creciente en los últimos años. Willmot y Bath (2003) han revisado el potencial uso terapéutico de la modulación de la producción de NO en el caso del accidente cerebrovascular. Así, se han diseñado estrategias neuroprotectoras tanto basadas en la estimulación de NO en la fase aguda administrando el sustrato de la NOS (Morikawa y cols., 1994; Temiz y cols., 2003) o dadores de NO (Salom y cols., 2000), como orientadas a la inhibición selectiva o no de cada una de las isoformas de la NOS. Frente al efecto deletéreo de la activación de la nNOS durante la isquemia, la activación de la eNOS juega un papel protector manteniendo el nivel regional de flujo sanguíneo (Faraci y Brian, 1994; Lefer y Lefer, 1996). El uso de inhibidores selectivos de la nNOS ha resultado en neuroprotección en modelos de isquemia focal (Yoshida y cols., 1994; Zhang y cols., 1996), mientras que el uso de dosis elevadas

de inhibidores no selectivos de la NOS, que afectan también a la eNOS, resultan en graves alteraciones del FSC local y en el subsiguiente aumento del tamaño de infarto. Evidencias en el mismo sentido las proporciona el hecho de que ratones knockout, deficientes en nNOS, desarrollan menor infarto cerebral que la cepa salvaje (Huang y cols., 1994), y los cultivos celulares de estos animales son más resistentes al daño ocasionado por glutamato e hipoxia/hipoglucemia (Dawson y cols., 1996).

Existe una gran dependencia temporal para la efectividad del tratamiento de la isquemia con estrategias farmacológicas relacionadas con el NO. Así, las basadas en la inhibición inespecífica de la NOS con N^o-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME) durante las primeras etapas de la agresión isquémica se han revelado deletéreas, incrementando el tamaño del infarto, mientras que la inhibición inespecífica tardía, 3-6 horas tras el inicio de la oclusión, no afecta ya al tamaño de infarto (Zhang y cols., 1995) o resulta beneficioso (Ding-Zhou y cols., 2002).

Los mecanismos moleculares implicados en el efecto terapéutico temprano del NO son complejos. Por un lado, la protección vascular está ligada a sus propiedades vasodilatadoras y antitrombóticas, mecanismos mediados por GMPc, que mejoran la fluidez de la sangre y ayudan a mantener la perfusión en el área de penumbra isquémica (Lefer y Lefer, 1996; Utepbergenov y cols., 1998). Por otra parte, al ser un radical el NO puede reaccionar con EROs y otros RLs, disminuyendo parcialmente el daño oxidativo inducido por isquemia (Wink y cols., 1993). También se ha sugerido que el NO puede interactuar con un sitio específico del canal o receptor de NMDA, nitrosilándolo y disminuyendo la unión de glutamato y/o provocando una disminución del flujo de Ca²⁺ a través del canal (Hoyt y cols., 1992; Choi y cols., 2000).

De forma tardía tras la isquemia la producción de NO se debe a la inducción de la expresión de la iNOS, fundamentalmente a partir de la activación de astrocitos reactivos e infiltración de neutrófilos en el tejido infartado. Esta expresión ha sido demostrada en el tejido cerebral tras isquemia permanente y transitoria tanto en roedores (Iadecola y cols., 1995a; Grandati y cols., 1997) como en humanos (Forster y cols., 1999). Esta isoforma produce grandes cantidades de NO durante largos períodos y es la isoforma con mayor probabilidad de ser la responsable en los

mecanismos de daño tardío tras la isquemia cerebral. Se ha observado que el NO es capaz de provocar una depleción rápida del ATP neuronal (Bal-Price y Brown, 2001), por los mecanismos descritos anteriormente, que incluirían la inhibición de la generación de ATP al inhibir el NO y ONOO⁻ la cadena respiratoria mitocondrial, alterar la permeabilidad de la membrana mitocondrial e inhibir la glicólisis a nivel de la enzima gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa, así como fomentar el consumo de ATP al activar la actividad PARP (Zhang y Snyder, 1992; Zhang y cols., 1994a; Pieper y cols., 1999; Brown and Borutaite, 2002; Stewart y Heales, 2003) resultando deletérea para la supervivencia celular al exacerbar el daño tisular.

Así pues, el empleo de inhibidores de esta isoforma de expresión tardía como N-(3-(aminometil)-benzil)-acetamida (**1400W**; **Figura 1.4**) podría resultar beneficioso en el tratamiento de la isquemia cerebral. 1400W es un inhibidor muy potente y selectivo de la iNOS, al menos 5000 y 200 veces más potente frente a iNOS humana que frente a eNOS y nNOS, respectivamente (Garvey y cols, 1997). Frente a otros inhibidores selectivos de iNOS, como las bis-isotiureas de las que deriva, presenta la ventaja de ser mucho más selectivo y tener una toxicidad mucho menor (Garvey y cols., 1994; 1997).

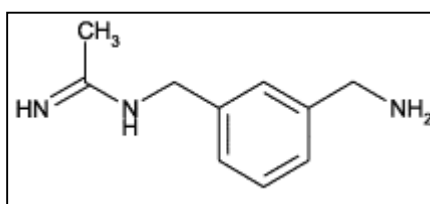


Figura 1.4: Estructura molecular de 1400W.

1.4.2. Estrategias relacionadas con el estrés oxidativo.

Los antioxidantes son compuestos endógenos o exógenos que, o bien reducen la formación de RLs, o bien reaccionan con ellos para neutralizarlos, protegiendo, por lo tanto, a la célula del daño oxidativo. En la **tabla 1.1** se recogen algunos ejemplos de las distintas categorías de sistemas antioxidantes (Delanty y Dichter, 2000).

Tabla 1.1: Clasificación y ejemplos de las sustancias con actividad antioxidante.

Categorías de antioxidantes o sequestradores de RLs.	
Enzimas endógenos.	SOD, catalasa, GSH-Px
Antioxidantes endógenos (también encontrados en la dieta).	α -tocoferol, ácido ascórbico (vit. C)
Otras sustancias antioxidantes endógenas.	ácido úrico, GSH
Cofactores antioxidantes endógenos.	Selenio, Coenzima Q ₁₀
Precusores y derivados de compuestos y enzimas antioxidantes endógenos.	Acetilcisteína, polietilen glicol, superóxido dismutasa
Quelantes metálicos.	Deferoxamina
Derivados naturales vegetales.	Flavonoides (<i>Ginkgo biloba</i>), licopeno (tomates), Guilingji (hierba medicinal china)
Sequestradores sintéticos de RLs.	21-aminoesteroides, pirrolopirimidinas, ebselén
Compuestos con otro efecto terapéutico primario, pero que pueden poseer actividad sequestradora de RLs	Selegilina, probucol, carvedilol, aspirina, magnesio, estatinas

Los antioxidantes pueden ser solubles en lípidos (ej. vitamina E) o en agua (vitamina C, GSH), y algunos de ellos, en particular aquellos con una buena permeabilidad de la BHE, han demostrado ser eficaces en la neuroprotección, como por ejemplo las pirrolopirimidinas (Andrus y cols., 1997; Schmid-Elsaesser y cols., 1997), el coenzima Q₁₀ (Matthews y cols., 1998), etc. Sin embargo, en determinadas condiciones algunos de estos antioxidantes pueden actuar como prooxidantes (Bowry y cols., 1992). El GSH, pese a ser el principal antioxidante endógeno, también puede contribuir al daño celular por excitotoxicidad tras la salida al exterior de GSH debido a la activación de los receptores de NMDA por glutamato (Wallin y cols., 1999), produciendo la entrada de más Ca²⁺ al interior de las células mediante receptores propios (Shaw y Bains, 2002).

Se han empleado, en modelos experimentales y con relativo éxito, distintas terapias relacionadas con la administración exógena de antioxidantes. Una de ellas es

el tratamiento de la isquemia-reperfusión con SOD y conjugados de SOD con otras moléculas (Francis y cols., 1997). El mayor problema de las enzimas antioxidantes es su incapacidad para atravesar la BHE y su corta vida media en el torrente sanguíneo. Sin embargo, la sobreexpresión de esta enzima en ratones los protegió frente a la agresión isquémica con perfusión (Yang y cols., 1994; Kamii y cols., 1995). Otras terapias han consistido en la inducción de la expresión de enzimas antioxidantes endógenas mediante el empleo de citoquinas, como TNF e IL-1, que inducen selectivamente la expresión de mRNA de una de las isoformas de SOD, en concreto la MnSOD. También se han llevado a cabo ensayos clínicos con moléculas antioxidantes exógenas, no enzimáticas, como el Tirilazad, un 21-aminoesteroide administrado durante las 6 horas posteriores al establecimiento de la isquemia. No se ha encontrado efecto beneficioso a largo plazo (3 meses) frente al control (RANTTAS investigators, 1996).

Algo similar ocurre con la molécula 2-fenil-1,2-benzoselenazol-3(2H)-ona (**ebselén; PZ51**), un compuesto selenoorgánico insoluble en agua pero rápidamente absorbido por el tracto gastrointestinal, que posee actividad mimética de la GSH-Px (Müller y cols., 1984). Su estructura molecular se muestra en la **figura 1.5**. Posee la capacidad de inhibir la actividad lipooxigenasa y, por lo tanto, la cascada del ácido araquidónico (Safayhi y cols., 1985). Soluble en lípidos, es efectivo frente a la peroxidación lipídica, capaz de reducir hidroperóxidos de membrana, al contrario que la GSH-Px endógena (Maiorino y cols., 1988). También bloquea la producción de O_2^- por los leucocitos activados (Ichikawa y cols., 1987), inhibe a la iNOS (Hattori, 1994) y es capaz de reaccionar con $ONOO^-$ (Masumoto y Sies, 1996) y NADPH oxidasa (Cotgreave y cols., 1989). Este compuesto se ha empleado con éxito en modelos experimentales (Handa y cols., 2000) y ensayos clínicos (Saito y cols., 1998) de hemorragia subaracnoidea, así como en modelos de isquemia focal transitoria en ratas a tiempos cortos de supervivencia (Dawson y cols., 1995; Takasago y cols., 1997; Imai y cols., 2001; 2003) o isquemias no muy severas (Namura y cols., 2001). También se ha demostrado efectivo en ensayos clínicos de infarto cerebral (Yamaguchi y cols., 1998).

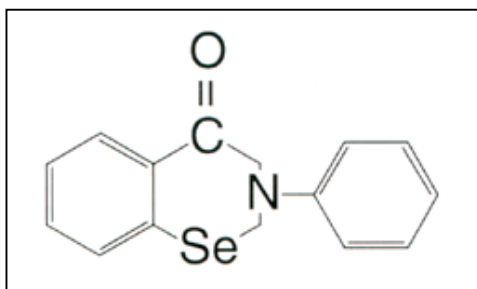


Figura 1.5: Estructura molecular del antioxidante Ebselén.

1.4.3- Estrategias relacionadas con la inflamación.

Las sPLA₂s, especialmente las de tipo II, se expresan constitutivamente en órganos implicados en la respuesta inflamatoria, pero su expresión se ve aumentada intensamente durante los procesos inflamatorios, acumulándose en los fluidos inflamatorios y en el plasma (Vadas y cols., 1985; Masuda y cols., 2005). Muchas células (endoteliales, células del músculo liso, plaquetas, mastocitos, neutrófilos, macrófagos y células hepáticas) son capaces de secretar sPLA₂ II como respuesta a citoquinas proinflamatorias, y su expresión génica se ve estimulada por diversos factores como ésteres de forbol, citoquinas e hipoxia, siendo regulada su expresión por diversos factores transcripcionales, entre los que se encuentra NF- κ B (Niessen y cols., 2003).

Dentro de los diferentes subtipos de la sPLA₂ II se encuentra el tipo IIA, también conocida como “sPLA₂ inflamatoria”, debido a que aparece en elevados niveles en los tejidos inflamados, en el plasma y en otros fluidos extracelulares (sinovial, peritoneal, seminal, lacrimal, etc) tras un episodio inflamatorio, donde parece desempeñar un importante papel (Nevalainen y cols., 2000). Así mismo, se ha observado que la expresión de sPLA₂ IIA se encuentra incrementada tras la isquemia cerebral (Lauritzen y cols., 1994). Los inductores más potentes de la expresión de esta isoforma incluyen citoquinas proinflamatorias (IL-1 α , IL-1 β , TNF α) y endotoxinas (lipopolisacárido) (Hamaguchi y cols., 2003).

Varias líneas de evidencia apuntan a las sPLA₂s como factores involucrados en la fisiopatología del cerebro isquémico:

- 1- Se ha observado la acumulación de ácidos grasos libres en el cerebro tras procesos patológicos como hipoxia, daños traumáticos e isquemia cerebral (Dhillon y cols., 1999).
- 2- sPLA₂-IIA y IB inducen la muerte celular en neuronas y glía en cultivo (Kolko y cols., 2002; Yagami y cols., 2002a; 2002b).
- 3- Las sPLA₂s se expresan después de la isquemia tanto en neuronas como en la glía reactiva (Lauritzen y cols., 1994).
- 4- El incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ debido a la isquemia tiene como consecuencia la activación de las distintas isoformas de la fosfolipasa A₂, que actúan en la membrana alterando su estructura y liberando ácidos grasos libres (Farooqui y cols., 1997b). Si la $[Ca^{2+}]_i$ se mantiene elevada durante el tiempo suficiente se produce la inducción de la isoforma de secreción, que contribuye a aumentar aún más la acumulación de ácidos grasos liberados de la membrana (Fitzpatrick y Soberman, 2001). Esta alteración de la membrana permite la salida al compartimento extracelular de los constituyentes intracelulares, entre los que se encuentran los aminoácidos excitadores como glutamato y aspartato. La inhibición de las PLA₂s provoca una reducción de su liberación, así como de ácidos grasos (Phillis y O'Regan, 1996; 2003; Pilitsis y cols., 2002).

Las evidencias presentadas hasta ahora sugieren la posible utilidad de los inhibidores de las sPLA₂s para reducir el daño inducido por isquemia-reperusión, atenuando la degradación de los fosfolípidos de membrana, la acumulación de ácidos grasos libres en el tejido y la liberación de sustancias bioactivas deletéreas para el tejido. La mayoría de los inhibidores de las sPLA₂s no se han probado en modelos de inflamación del SNC y se desconoce de muchos su mecanismo de acción, vida media, toxicidad, etc.

Algunos productos aislados de organismos marinos (p.ej. la esponja *Cacospongia mollior*) se han mostrado como potentes inhibidores de las sPLA₂s, como por ejemplo manoalido, pseudopterinas, vidaloles, scalaradial y algunos terpenoides (Potts y cols., 1992). En concreto, el scalaradial y su análogo **12-epi-scalaradial**, fueron caracterizados como potentes y selectivos inhibidores de las

sPLA₂s de 14 kDa (De Carvalho y Jacobs, 1991), con actividad antiinflamatoria en el modelo de edema de piel (oreja) inducido por distintos agentes (Glaser y cols., 1995). Otras investigaciones adicionales han demostrado su capacidad para disminuir la liberación de mediadores inflamatorios como AA, leukotrieno B₄ (LTB₄) y PAF, así como para inhibir la degranulación de neutrófilos humanos (Barnette y cols., 1994; Marshall y cols., 1994). Desde entonces, el 12-*epi*-scleradiol se ha convertido en una valiosa herramienta para estudiar el papel de las sPLA₂s, especialmente en la iniciación y/o propagación de episodios inflamatorios en una amplia variedad de modelos (McCord y cols., 1994; Payá y cols., 1996; Winkler y cols., 1997; Thommesen y cols., 1998), pero no hay evidencias respecto a su efectividad en modelos de inflamación inducida por la isquemia cerebral. La estructura molecular del 12-*epi*-scleradiol se muestra en la **figura 1.6**.

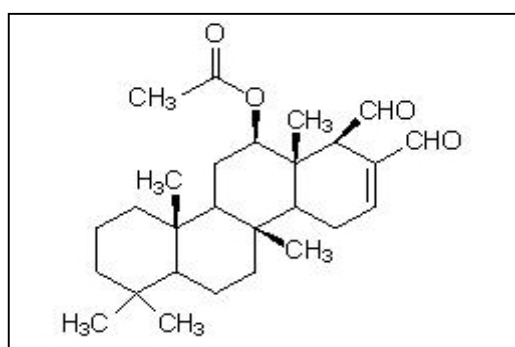


Figura 1.6: Estructura molecular de 12-*epi*-scleradiol.

Objetivos

El objetivo genérico del presente trabajo es evaluar el potencial terapéutico de determinadas sustancias capaces de interferir sobre tres de los principales mecanismos fisiopatológicos implicados en el daño cerebral producido por isquemia/reperfusión: NO, estrés oxidativo e inflamación. Ahora bien, dada la importancia que el modelo experimental utilizado tiene en este tipo de investigaciones, previamente a los estudios sobre neuroprotección se realizará la caracterización del modelo de isquemia cerebral a utilizar en esta investigación. Los objetivos pormenorizados son:

- 1- Caracterizar el modelo de isquemia cerebral focal transitoria en rata, inducida por oclusión de la ACM mediante la “técnica de la sutura intraluminal”. Para ello se monitorizarán los siguientes parámetros: PCC por láser-Doppler en un área de penumbra isquémica, PAS, presiones parciales de oxígeno (pO_2) y dióxido de carbono (pCO_2), pH y glucemia en sangre arterial. Finalmente se determinará la valoración neurológica y el tamaño de infarto cerebral resultante.
- 2- Evaluar la hipótesis de que el NO producido por la iNOS tras la isquemia origina el descenso tardío en los niveles de ATP, lo cual, a su vez, provoca la liberación tardía de glutamato. Esta secuencia podría contribuir a la progresión del infarto, y por lo tanto su inhibición podría resultar beneficiosa en el tratamiento de la isquemia cerebral. Para evaluar dicha hipótesis se utilizará el inhibidor de iNOS, 1400W.
- 3- Evaluar la hipótesis de que la isquemia cerebral elimina la actividad glutatión peroxidasa y reduce, consiguientemente, la capacidad antioxidante endógena. Por lo tanto, la recuperación de la actividad peroxidasa mediante la administración de fármacos que mimetizan su actividad (antioxidantes), podría tener efectos beneficiosos sobre el daño cerebral isquémico. Para evaluar dicha hipótesis se utilizará el antioxidante seleno-orgánico, ebselén.

- 4- Evaluar la hipótesis de que las sPLA₂s están implicadas en la fisiopatología del daño cerebral isquémico por su participación en el desarrollo de la respuesta inflamatoria, y por lo tanto su inhibición podría tener efectos neuroprotectores. Para evaluar dicha hipótesis se utilizará el inhibidor de las sPLA₂s, 12-*epi*-scylaradial.

Material
y
Métodos

Todos los animales utilizados en el presente estudio son ratas macho albinas de la raza Wistar y 300-350 g de peso, alimentadas con una dieta estándar (dieta de cría A03, Panlab S.L.) y estabuladas en condiciones de luz/oscuridad en ciclos de 12 h de duración. Los procedimientos de experimentación animal se realizaron de conformidad con la legislación española sobre “Protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos” (Real Decreto 223/88 de 14 de marzo), y de acuerdo con la directiva comunitaria 86/609/CEE del Consejo de 24 de noviembre. Los protocolos experimentales utilizados han sido aprobados por el comité ético del Hospital Universitario “La Fe” de Valencia.

3.1- REGISTRO DE LA PERFUSIÓN CEREBROCORTICAL Y OTROS PARÁMETROS HEMODINÁMICOS Y METABÓLICOS EN LA RATA.

3.1.1- Técnica quirúrgica.

La preparación del animal para el experimento se lleva a cabo en dos días. En el primer día, el animal se anestesia mediante inyección intramuscular de una mezcla de clorhidrato de ketamina (Ketolar[®], Parke-Davis S.L.) (75 mg/Kg), diazepam (Valium[®] 10, Roche Farma S.A.) (7.5 mg/Kg) y sulfato de atropina (Atropina Braun, Braun Medical S.A.) (0.15 mg/Kg). La rata se coloca en decúbito prono en un aparato estereotáxico (Kopf[®] Instruments, mod. 900), utilizando soportes intraauriculares y para la mandíbula superior. A continuación se realiza una incisión longitudinal en la línea media de la cabeza, se separa la piel y el periostio y se expone el cráneo. Con la ayuda de un microscopio quirúrgico se realizan uno o dos trépanos (según se pretenda medir la perfusión cerebrocortical de uno o de ambos hemisferios) de 1 mm de diámetro a 2 mm de Bregma en dirección caudal y a 3.5 mm a derecha e izquierda de la sutura sagital (**Figura 3.1**), profundizando hasta alcanzar la duramadre pero sin llegar a perforarla. Se realizan también otros dos trépanos de 0.8 mm de diámetro, sin llegar a perforar completamente el hueso: en el caso de la preparación doble uno situado a 3.5 mm a la derecha de la sutura sagital y a 4.5 mm posterior a la sutura coronal, y otro a 2.5 mm a la izquierda de la sutura parietal y a 2.5 mm anterior a la sutura coronal; en el caso de la preparación sencilla, un trépano situado a 3.5 mm a la derecha de la sutura sagital y a 4.5 mm posterior a

la sutura coronal, y otro situado a 1 mm a la derecha de la sutura sagital y 2 mm posterior a bregma. En cada uno de estos dos trépanos se enrosca un minitornillo de acero inoxidable. A continuación se colocan en cada uno de los trépanos de 1 mm de diámetro un cono de aguja de 21G cortada y limada, divergiendo 10° con la vertical (20° entre sí) en el caso de la preparación doble y 0° en la sencilla, y que servirán posteriormente de guía para las sondas láser-Doppler. Estos conos se fijan al cráneo con cemento dental, aprovechando el anclaje al mismo que ofrecen los tornillos. Posteriormente se sutura la herida. Tras la intervención se recupera al animal de la anestesia y se estabula en condiciones de ayuno con libre acceso al agua hasta el día siguiente.

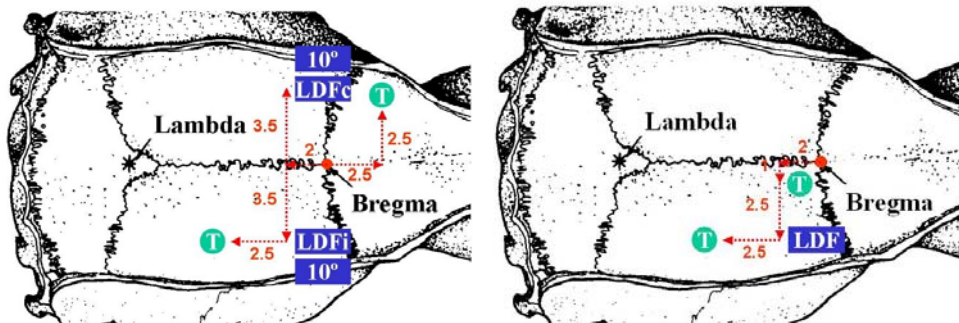


Figura 3.1: Localización de los soportes de las sondas LDF y tornillos de fijación. Preparación doble (izqda) y sencilla (dcha). LDFi/LDFc: soportes para las sondas láser-Doppler ipsi- y contralateral; T: tornillos de fijación.

La **figura 3.2** muestra la localización de la sonda LDF sobre la corteza cerebral en la preparación sencilla.

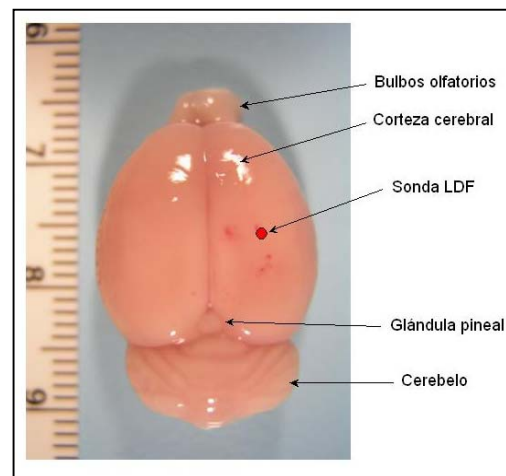


Figura 3.2: Vista esquemática dorsal del cerebro de rata y la localización de la sonda LDF sobre la corteza cerebral derecha (ipsilateral a la oclusión).

En el segundo día, el animal se anestesia con una inyección intramuscular de clorhidrato de ketamina (120 mg/Kg) y sulfato de atropina (0.3 mg/Kg) para permitir su intubación orotraqueal con una cánula de 16G. Una vez intubado, se alojan las sondas láser-Doppler de fibra óptica (mod. MT B500-0 L 120, Perimed AB) en las respectivas guías, avanzando su extremo hasta establecer contacto suave con la corteza cerebral. El animal se coloca en posición de decúbito supino, fijado a la mesa de trabajo y conectado a un respirador (Harvard Rodent Ventilator mod. 683). La anestesia se mantiene con una mezcla de halotano (Fluothane, Zeneca Farma S.A.) 0.5 - 0.75% en N₂O y O₂ (70:30, respectivamente), un volumen de 2.5 mL por pulso y una frecuencia inicial de 55-60 pulsos/minuto. La proporción de gases, volumen y frecuencia son modificados en función de los requerimientos del animal.

La temperatura corporal se mantiene a 37.5 °C durante todo el experimento mediante una manta calefactora y una sonda rectal (Yellow Springs Instrument mod. YSI 402) conectada a un medidor de temperatura (Letica mod. HB101/2) dotado de un sistema termostatzado.

Para el registro de la presión arterial sistémica y toma de muestras de sangre se introduce un catéter de 0.9 mm de diámetro externo (Vasocan[®] Braunüle[®], Braun Medical S.A.) en la arteria femoral izquierda.

3.1.2- Técnicas de registro y medición de variables fisiológicas.

El registro de la perfusión cerebrocortical se lleva a cabo conectando la sonda láser-Doppler (Probe 418, Perimed AB) a un medidor láser-Doppler (Periflux 4001 Master, Perimed AB).

La presión arterial y la frecuencia cardíaca se registran conectando el catéter introducido en la arteria femoral a un transductor de presión (Hewlett-Packard Medical Products Group, mod. 1290C) a través de una cúpula estéril (Hewlett-Packard Medical Products Group, mod. 1295C), y éste a una unidad de registro de presión arterial (Stoelting mod. 1 canal).

Las señales de presión arterial, frecuencia cardíaca, perfusión cerebrocortical y temperatura corporal, son digitalizadas (PF 472, Perimed AB) y enviadas a un ordenador equipado con un programa de adquisición y almacenamiento de datos (Perisoft v5.10, Perimed AB).

Por otro lado, se realiza una monitorización discontinua de las presiones parciales de oxígeno (pO_2), dióxido de carbono (pCO_2) y pH en las muestras de sangre arterial con un analizador de gases (ABLTM5, Radiometer Medical A/S). También se monitoriza la glucemia (Glucometer Elite[®], Química Farmacéutica Bayer). Las muestras (0.2 mL) son tomadas tras introducir el catéter en la arteria femoral (control), instantes antes de realizar la oclusión y a los 45, 90 y 120 minutos.

3.2- INDUCCIÓN DE ISQUEMIA CEREBRAL FOCAL TRANSITORIA EN RATA.

La oclusión de la ACM se lleva a cabo mediante la “técnica del filamento intraluminal” (Zea Longa y cols., 1989), esquematizada en la **figura 3.3**.

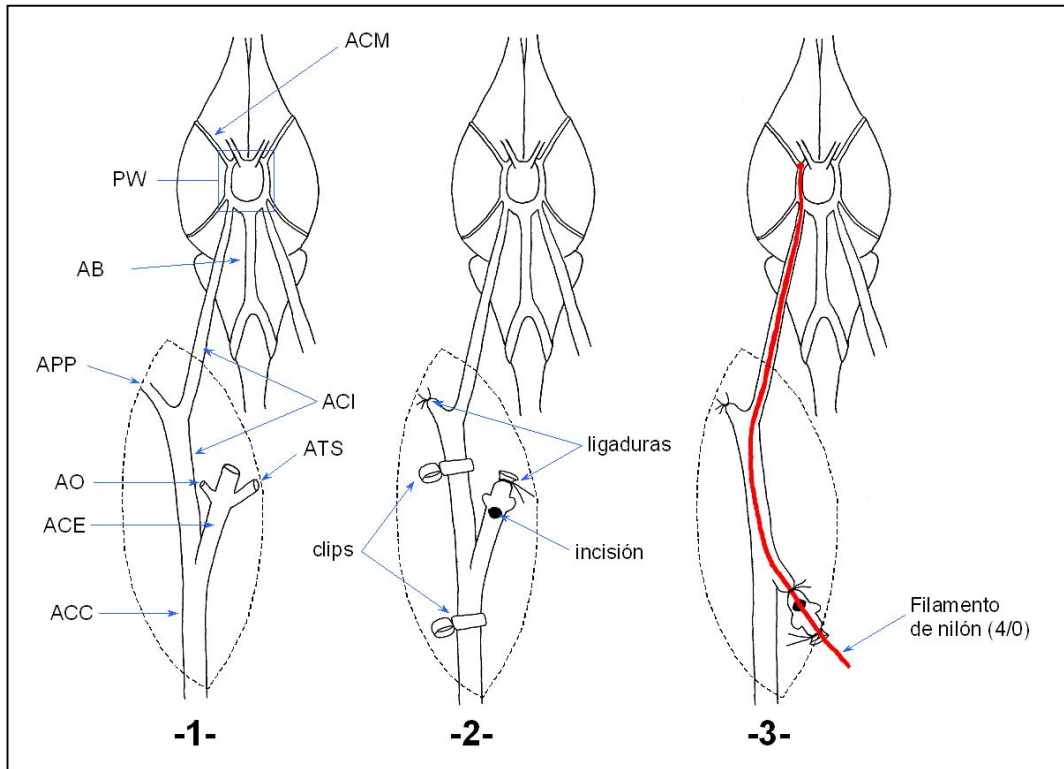


Figura 3.3: Anatomía vascular de la zona ventral derecha del cuello y de la base del encéfalo de la rata, mostrando la secuencia quirúrgica para la introducción de la sutura intraluminal. La línea discontinua delimita el campo quirúrgico.

- 1- Arteria basilar (**AB**); arteria carótida común (**ACC**); arteria carótida externa (**ACE**); arteria carótida interna (**ACI**); arteria cerebral media (**ACM**); arteria occipital (**AO**); arteria pterigopalatina (**APP**); arteria tiroidea superior (**ATS**); polígono de Willis (**PW**).
- 2- Termocoagulación y sección de las ramas de la **ACE**; ligadura y sección de la **ACE**; colocación de clips microvasculares para impedir el aporte sanguíneo y realización de una incisión (**incisión**) en la **ACE**.
- 3- Retirada de los clips microvasculares e introducción de la sutura de nylon con la cabeza redondeada hasta la base de la **ACM** en el polígono de Willis.

La exposición de la arteria carótida común derecha se lleva a cabo mediante una incisión longitudinal en la línea media ventral del cuello y posterior separación por disección roma de las glándulas submaxilares y los músculos omohioideo y esternohioideo. Seguidamente se disecan las arterias carótidas común y carótida externa. A continuación se disecan y termocoagulan las dos primeras ramas de la carótida externa: la arteria tiroidea superior y la arteria occipital. Por encima de estas

ramificaciones se colocan dos ligaduras y se corta la arteria carótida externa entre ambas, dejando un muñón. Se disecciona la arteria carótida interna, separándola del nervio vago y del cuerpo carotídeo, hasta visualizar la bifurcación donde surge la arteria pterigopalatina. Esta última se liga en su parte distal. El siguiente paso es interrumpir momentáneamente el flujo sanguíneo en la arteria carótida interna para introducir el filamento que ocluirá posteriormente la ACM. Para ello se colocan dos clips microvasculares: uno sobre la arteria carótida común y otro sobre la arteria carótida interna. A continuación se realiza una pequeña incisión en el extremo distal del muñón de la arteria carótida externa y se introduce un filamento de nilón (4/0) con la punta redondeada, comprobando que se encuentra en la luz de la arteria y colocando una ligadura para impedir que sangre por la incisión al retirar los clips. Llegados a este punto, se retiran los clips, permitiendo la circulación de la sangre. La oclusión de la ACM se lleva a cabo avanzando el filamento hasta su origen en el polígono de Willis. La colocación óptima del filamento se pone de manifiesto por el descenso brusco en la perfusión cerebrocortical registrada con la sonda láser-Doppler.

3.3- EVALUACIÓN DEL ESTADO NEUROLÓGICO.

La evaluación de la afectación neurológica se llevó a cabo aplicando al animal objeto de estudio un test que permite cuantificar (de 0 a 9, siendo 0 la ausencia de afectación neurológica y 9 la máxima) el grado de deterioro neurológico. El test se basa en la observación de las siguientes respuestas tras sacar al animal de la caja donde se encuentra estabulado:

- Desplazamiento/exploración: 0.- Normal; 1.- Desplazamiento sin exploración; 2.- Desplazamiento sólo al estimular o no se desplaza en absoluto.
- Deriva a la izquierda: 0.- Nunca; 1.- Al elevar por la cola (hacia adelante y hacia atrás); 2.- Espontáneamente; 3.- “Peonza” (giro sin desplazamiento).
- Sujeción de la pata delantera izquierda: 0.- No permite; 1.- Permite con resistencia; 2.- No opone resistencia.

- Reflejo paracaídas (extensión de las patas delanteras al simular una caída libre, manteniendo al animal sujeto por la cola): 0.- Simétrico; 1.- Asimétrico; 2.- Pata izquierda retraída hacia el cuerpo.

3.4- EVALUACIÓN DEL TAMAÑO DE INFARTO CEREBRAL.

El infarto cerebral se determinó con el método del cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolio (“TTC”; Sigma) para la tinción de tejido fresco (Bederson y cols., 1986). Este compuesto es un sustrato para las cadenas redox de las mitocondrias: aquellas que no han resultado afectadas por la isquemia reaccionan con el TTC dando una coloración roja en el tejido.

El animal se anestesia con éter etílico en una campana y se sacrifica mediante inyección intracardíaca de una solución de cloruro potásico (Antibióticos Farma, S.A.) (75 mg/Kg). A continuación se extrae rápidamente el cerebro y se sumerge en solución salina fisiológica fría (4° C) durante 5 minutos, para ser cortado seguidamente en secciones coronales de 2 mm de grosor con un cortador de tejido (Stoelting tissue slicer mod. 51425). Seguidamente, los cortes de cerebro se incuban durante 10 minutos a 37 °C en una solución de TTC al 2% en salino fisiológico, tras lo cual se fijan en una solución de formaldehído al 10% en tampón fosfato sódico (0.1 M, pH 7.4) durante 24 horas. Para la evaluación del tamaño de infarto cerebral se empleó un programa de análisis de imagen por ordenador (Scion Image© v4.02, Scion Corporation). El área de infarto en cada sección (en mm²) se obtuvo por sustracción del área no dañada del hemisferio ipsilateral al área total del hemisferio contralateral. El volumen (expresado en mm³) del infarto se obtuvo multiplicando el área obtenida por el grosor de cada una de las secciones y sumando el resultado de todas ellas.

3.5- DETERMINACIONES INMUNOHISTOQUÍMICAS, ENZIMÁTICAS Y BIOQUÍMICAS.

3.5.1- Determinación bioquímica de MPO: perfusión transcardíaca y ensayo de actividad enzimática.

Para determinar la infiltración leucocitaria se utilizó como marcador la presencia del enzima MPO, presente en los neutrófilos activados. La expresión de esta proteína se puso de manifiesto tanto por inmunohistoquímica como ensayando su actividad enzimática en el tejido. Barone y cols. (1991) confirmaron, histológicamente y mediante ensayo de la actividad MPO, la infiltración de los leucocitos polimorfonucleares tras la isquemia focal. Matsuo y cols. (1994) hallaron una correlación positiva entre la acumulación de neutrófilos y el daño isquémico, con un pico de expresión a las 24 horas tras la reperfusión, volviendo a niveles normales a los 7 días.

Los animales destinados para determinar la extensión de la infiltración leucocitaria mediante cuantificación de la actividad MPO en el tejido, son profundidos a través de la arteria aorta con 60 mL de una solución salina isotónica heparinizada primero y 120 mL sin heparinizar después, a un ritmo de 10 mL/min. Para ello se accede al corazón rápidamente, abriendo la caja torácica completamente, y se introduce un catéter a través del ventrículo izquierdo hasta la arteria aorta, donde se asegura con una ligadura. Para drenar la sangre se realiza una incisión en la aurícula derecha. El cerebro es extraído y cortado en secciones de 2 mm tal y como se ha descrito anteriormente. Los hemisferios de la sección número 3 desde el polo apical, correspondiente a los mm 6 a 8, son separados y congelados en nitrógeno líquido y almacenados a -80°C hasta su posterior utilización. El resto de secciones son incubadas en TTC y postfijadas para la posterior determinación del tamaño de infarto.

Para la determinación de la actividad MPO en los hemisferios infartado y sano en las secciones congeladas, se puso a punto el siguiente protocolo:

- 1- Descongelar las muestras en hielo y pesar el tejido.
- 2- Homogeneizar en 2 mL de tampón Tris-HCl 50 mM, pH 7.4 a 4°C, durante 30 segundos con un homogenizador de cuchillas (Ultra-Turrax® T8, IKA-WERKE GMBH & CO). Completar hasta 3 mL con el mismo tampón.
- 3- Tomar 1 mL y añadirle 30 mL de tampón fosfato (PB) 5 mM, pH 6.0 a 4 °C en un tubo de ultracentrífuga (Polyallomer centrifuge tubes, Beckman Coulter España, S.A.). El resto de muestra (2 mL) se puede guardar congelado (-80°C) para posteriores determinaciones.
- 4- Centrifugar a 30.000 g durante 30 minutos a 4°C (Beckman Optima™ L-80, Beckman Coulter España, S.A.).
- 5- Resuspender el sedimento en 1 mL de PB 50 mM con bromuro de hexadecil trimetil amonio (HTAB; Sigma) 0.5%, pH 6.0 a 25°C, durante aproximadamente 2 minutos.
- 6- Tres ciclos de congelación (en hielo seco), descongelación y sonicación (10 segundos a 25°C). Las muestras se pueden guardar congeladas hasta el día siguiente tras la última sonicación.
- 7- Incubar durante 20 minutos a 4°C.
- 8- Centrifugar a 15.000 g durante 15 minutos a 4°C (Eppendorf Centrifuge mod. 5417R, Huco-Erlöss).
- 9- Ensayar la actividad MPO en el sobrenadante: variación de la absorbancia a 460 nm durante 2-3 minutos. El medio de reacción contiene o-dianisidina (Sigma) 0.167 mg/mL en tampón fosfato 0.05 M pH 6.0 y H₂O₂ 0.0005%. Añadir el H₂O₂, agitar y empezar a medir rápidamente.

La variación de absorbancia con el tiempo ($\Delta A/\Delta t$) se midió en un espectrofotómetro (Shimadzu UV-Visible Spectrophotometer UV240), en condiciones saturantes de sustrato (V_{max}). Para determinar la cantidad de MPO en las muestras, se realizó una curva patrón con MPO comercial (Sigma). La preparación de la curva patrón y de las muestras se resume en la **tabla 3.1**:

Tabla 3.1: Curva patrón y muestra para determinación de actividad MPO.

<i>Curva patrón</i>							<i>Muestra</i>
Uds MPO	0	0.002	0.005	0.01	0.02	0.05	333 μ l de muestra + 666 μ l de o-dianisidina 0.251 mg/ml + 8.35 μ l H ₂ O ₂ al 0.12%
MPO (2 ud/mL)	0	1 μ l	2.5 μ l	5 μ l	10 μ l	25 μ l	
o-dianisidina 0.251 mg/mL	666 μ l	666 μ l	666 μ l	666 μ l	666 μ l	666 μ l	
PB 50 mM	333 μ l	332 μ l	330.5 μ l	328 μ l	323 μ l	308 μ l	
H ₂ O ₂ al 0.12%	8.35 μ l	8.35 μ l	8.35 μ l	8.35 μ l	8.35 μ l	8.35 μ l	

3.5.2- Determinación inmunohistoquímica de MPO.

Los animales destinados a la detección inmunohistoquímica de MPO fueron perfundidos a través de la arteria aorta, primero con salino heparinizado seguido de una solución de paraformaldehído al 4% en PB 0.1 M, pH 7.4. El cerebro fue extraído, cortado en secciones coronales de 2 mm de grosor, y las secciones postfijadas con el mismo fijador durante 2 horas e incluidas en un medio de inclusión parafínico (Poliwax, Difco Laboratories). Seguidamente fueron cortadas en secciones de 10 μm de grosor con un microtomo (MICROM mod. HM440E) y adheridas con gelatina-alumbre de cromo a portaobjetos.

Para la detección del enzima MPO en estas secciones se empleó un anticuerpo primario policlonal desarrollado en conejo frente a la MPO humana, un anticuerpo secundario biotinilado frente al primario y el complejo AB (ABC), todo adquirido a DakoCytomation S.A., y se puso a punto el siguiente protocolo:

1) DESPARAFINAR E HIDRATAR LAS SECCIONES.

2) INMUNOTINCIÓN.

1- Lavar con PB 0.1 M durante 10 minutos.

2- Lavar con PB salino 0.01 M (PBS; NaCl al 0.9%, p/v) durante 10 minutos.

3- Bloqueo de la actividad peroxidasa endógena durante 10 minutos. La solución de bloqueo contiene metanol al 10% (v/v) y H_2O_2 al 1% (v/v), en PBS.

4- Tres lavados de 5 minutos en PBS con Triton X-100 al 0.1% (v/v) (PBS-T).

5- Bloqueo de uniones inespecíficas durante 30-45 minutos. La solución de bloqueo contiene suero normal de cabra (NGS) al 10% (v/v), gelatina al 0.2% (p/v) y leche en polvo al 1% (p/v), en PBS-T.

6- Incubar con el anticuerpo primario frente a MPO (directamente, sin lavados; sólo decantar la solución de bloqueo inespecífico). Incubar toda la noche y a temperatura ambiente. La solución de incubación contiene NGS al 5% (v/v), gelatina al 0.2% (p/v) y el anticuerpo frente a MPO humana ("rabbit anti-human myeloperoxidase", dilución 1:500), en PBS-T.

7- Tres lavados de 5 minutos con PBS.

8- Lavar con PBS-T durante 10 minutos.

9- Incubar con el anticuerpo secundario ("goat anti-rabbit" biotinilado) durante 1 hora. La solución de incubación contiene NGS al 5% (v/v), gelatina al 0.2% (p/v) y el anticuerpo secundario (dilución 1:300), en PBS-T.

10- Tres lavados de 5 minutos con PBS.

- 11- Lavar con PBS-T durante 10 minutos.
 - 12- Incubar con ABC durante 1 hora. La solución de incubación contiene el componente A (1:100) y B (1:100), en PBS-T. Preparar al menos 30 minutos antes de usar. Guardar en nevera. Los lavados y la incubación hay que realizarlos en ausencia total de azida sódica (NaN_3).
 - 13- Tres lavados de 5 minutos con PBS.
 - 14- Revelado de la peroxidasa del ABC con 3,3'-diaminobenzidina 0.05% (p/v), H_2O_2 al 0.0132% en PBS. Añadir el H_2O_2 justo antes de iniciar la reacción. El revelado se hace en oscuridad, evitando fuentes de luz. Controlar visualmente el desarrollo de la reacción. El precipitado aparece de color marrón oscuro.
 - 15- Parar la reacción con PBS.
- A continuación se deshidratan y se montan con Entellan (Merck).

Los pasos 1 a 4, lavados y revelado, se realizan en cubetas. Las incubaciones con anticuerpo o bloqueo de uniones inespecíficas, en cámara húmeda.

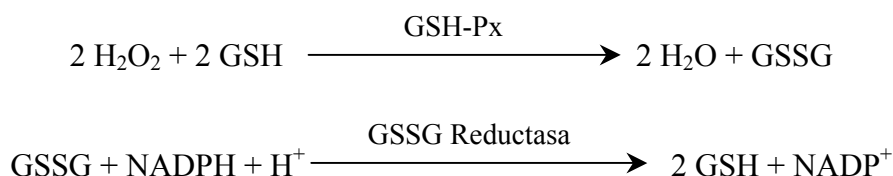
Las preparaciones se observaron al microscopio óptico (mod. BX50, Olympus Optical España S.A.), equipado con cámara fotográfica (mod. SC35, Olympus Optical España S.A.).

3.5.3- Determinación de Se en plasma sanguíneo.

La determinación de selenio en plasma fué llevada a cabo en colaboración con el Departamento de Medicina Preventiva y Salud Pública (Área de Bromatología y Nutrición) de la Universitat de València. Tras la administración oral de ebselén y sedación con éter, se tomaron muestras de sangre por punción cardíaca en los siguientes intervalos de tiempo: 1, 2, 3, 4, 24, 72 y 144 horas tras el bolo oral. Las muestras fueron inmediatamente centrifugadas (Biofugue *pico*, Heraeus S.A.) y se guardó el plasma congelado a $-20\text{ }^\circ\text{C}$ hasta el momento de realizar la determinación. El selenio fue medido mediante espectrometría de absorción electrotérmica (ET-AAS1100B, Perkin Elmer España, S.L.), con corrección de deuterio, tras la adición de $\text{Pd/Mg}(\text{NO}_3)_2$ como matriz modificada y una dilución apropiada (Alegría y cols., 1996). La exactitud del método fue comprobada utilizando material de referencia (Seronorm Trace Elements Serum Level 1, Sero A/S).

3.5.4- Determinación de la actividad GSH-Px en tejido cerebral.

La determinación de la actividad GSH-Px y de la concentración de GSH en tejido cerebral sano e infartado fueron llevadas a cabo en colaboración con el Departamento de Fisiología de la Universitat de València. Las ratas fueron sacrificadas mediante inyección intracardiaca de KCl (75 mg/Kg) bajo anestesia profunda con éter. El cerebro fue rápidamente extraído y cortado en secciones coronales de 2 mm. La sección correspondiente a los mm 6 a 8 desde el polo anterior fue dividida en sus dos hemisferios y éstos congelados rápidamente en N₂ líquido y almacenados a -80°C hasta el momento de realizar la determinación. Las muestras de tejido fueron homogenizadas en ácido perclórico al 2% conteniendo EDTA 1 mM y centrifugadas a 105.000 g durante 1 h. La actividad GSH-Px frente a peróxido de hidrógeno se midió en el sobrenadante neutralizado, siguiendo el método descrito por Lawrence y Burk (1976). Brevemente, el método combina la actividad de las enzimas GSH-Px y GSSG reductasa, determinando espectrofotométricamente la desaparición de NADPH como se muestra en la serie de reacciones mostrada a continuación.



La desaparición de NADPH se monitorizó a 340 nm de longitud de onda.

3.5.5- Determinación de GSH en tejido cerebral.

Para la determinación del contenido en GSH se empleó el método en HPLC de Reed y cols. (1980). Las muestras de tejido fueron homogenizadas en ácido perclórico al 2% conteniendo EDTA 1 mM. Se trataron 0.2 mL de sobrenadante de la muestra tras la centrifugación (9.000 g durante 10 min) con 0.04 mL de ácido iodoacético 100 mM, ajustando el pH a 8.5-9 con KOH 2 M y permitiendo que reaccione durante toda la noche a temperatura ambiente con un exceso de 1-fluoro-2,4-dinitrobenzeno. Tras la centrifugación, el sobrenadante fue separado a través de

una columna de 5 μm 3-Spherisorb-NH₂, 250 x 4.6 mm con un incremento de gradiente de acetato sódico en metanol:agua (4:1, v/v). Las curvas de calibración se hicieron diariamente. El contenido en proteínas se determinó con el método de Lowry y colaboradores (1951).

3.5.6- Determinación de L-arginina y L-glutamato en microdializado cerebral y suero.

El implante de la cánula de la sonda de microdialísis se realizó utilizando una variación del esquema mostrado en la **figura 3.1**, empleando una sola sonda laser-Doppler inclinada 15° en sentido caudal y desplazada ligeramente según se muestra en la **figura 3.4**. Para el implante de la guía de la sonda de microdialísis, se realiza un trépano de 1 mm de diámetro 1 mm anterior a bregma y 3 mm a la derecha de la sutura media. A través de este trépano y tras haber retirado todo el hueso y abierto una pequeña incisión en la duramadre, con la ayuda de un aparato estereotáxico (Kopf® Instruments mod. 900) se introduce la guía de la sonda de microdialísis (CMA/12 Guide Canulae, CMA Microdialysis AB) 4.3 mm a través de la corteza cerebral hasta alcanzar el estriado. La guía para la sonda de microdialísis se hace solidaria con la cánula de soporte de la sonda LDF y los tornillos con cemento dental.

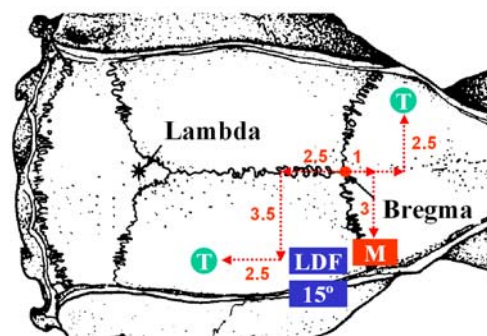


Figura 3.4: Localización de los soportes de las sondas LDF, sonda de microdialísis y tornillos de fijación. **LDF:** soporte para la sonda láser-Doppler ipsilateral a la oclusión; **T:** tornillos de fijación; **M:** guía de la sonda de microdialísis.

Al día siguiente se colocó la sonda de microdiálisis (CMA/12, CMA Microdialysis AB) en la guía y se perfundió con una bomba de infusión (Hardvard Apparatus mod. PHD 2000) a través de ella líquido cefalorraquídeo (LCR), a una velocidad de 1 $\mu\text{L/h}$, compuesto por: NaCl 125 mmol/L, KCl 2.5 mmol/L, Cl_2Mg 1.18 mmol/L, CaCl_2 1.26 mmol/L, NaH_2PO_4 0.5 mmol/L y Na_2HPO_4 5mmol/L. El microdializado se recogió en tubos eppendorf a los tiempos previstos en el protocolo experimental (basal y 3-4, 5-6 horas tras el inicio de la isquemia) y se almacenó a -40°C hasta la determinación.

Las muestras de suero se obtuvieron a partir del catéter implantado en la arteria femoral durante la intervención quirúrgica para la inducción de la isquemia, a 0, 1 y 2 horas tras el inicio de la isquemia, y posteriormente recogiendo el sangrado obtenido tras inmovilizar al animal y seccionar el extremo de la cola al resto de los tiempos previstos en el protocolo experimental (4, 6, 24, 48 y 72 horas). La sangre se dejó coagular (45-60 min) y se recogió el suero tras centrifugarla (9.500 g durante 6 min)(Biofugue Pico, Heraeus S.A.).

Las determinaciones de L-arginina y L-glutamato se llevaron a cabo en colaboración con el Servicio de Neurología del Hospital Clínico Universitario de Santiago de Compostela. Brevemente, a 500 μL de muestra se le añadieron 250 μL de ácido sulfosalicílico para desproteínizarla. Tras centrifugar y filtrar a través de una membrana de 0.22 μm de diámetro de poro, se recogió el sobrenadante y se le añadió una solución de norleucina 1.66 $\mu\text{mol/L}$ a un ratio de 5:1 como control interno. 200 μL de esta solución se inyectaron en una columna de intercambio catiónico (LKB/4151 Alpha Plus autoanalyzer, Amersham Biosciences Europe) y el eluyente se mezcló con ninhidrina para determinar la concentración de cada aminoácido.

3.5.7- Expresión de iNOS en tejido cerebral: (Western-blot).

Las determinaciones de iNOS en el tejido cerebral sano e infartado fueron llevadas a cabo en colaboración con el Departamento de Farmacología de la Universidad Complutense de Madrid. Las ratas fueron sacrificadas mediante una inyección intracardíaca de KCl (75 mg/Kg) bajo anestesia profunda con éter. El cerebro fue rápidamente extraído y cortado en secciones coronales de 2 mm. La

sección correspondiente a los mm 6 a 8 desde el polo anterior fue dividida en sus dos hemisferios y a su vez separada la corteza de las estructuras subcorticales, tal y como se muestra en la **figura 3.5**. Las cuatro muestras por rata fueron congeladas rápidamente en N₂ líquido y almacenadas a -80°C hasta la determinación.

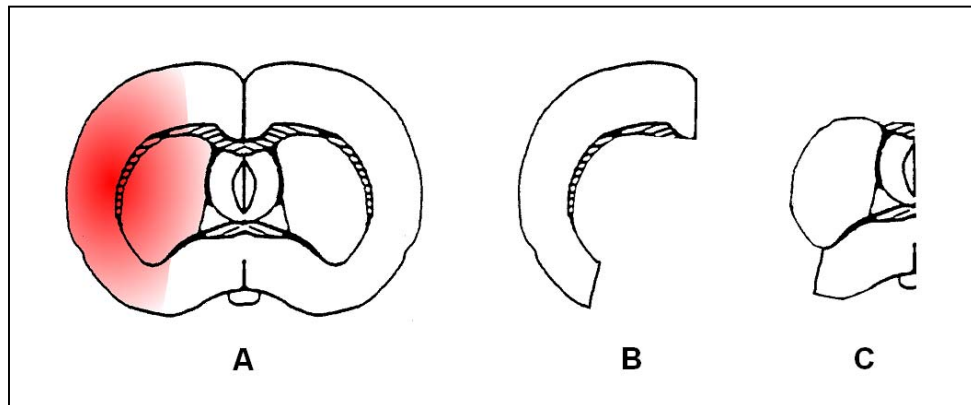


Figura 3.5: Representación esquemática de la sección cerebral correspondiente a los mm 6 a 8 desde el polo anterior (A). El área de mayor probabilidad de lesión isquémica aparece en rojo. Muestras correspondientes a la corteza (B) y a las estructuras subcorticales (C), una vez separadas.

Cada muestra fue homogenizada en 400 μ l de tampón de homogeneización compuesto por: sacarosa 320 mM, EDTA 1 mM, ditioneitol 1 mM, leupeptina 10 μ g/mL, fluoruro de fenilmetilsulfonilo (100 μ g/mL), inhibidor de tripsina 10 μ g/mL, aprotinina 2 μ g/mL y Tris Base 50 mM, ajustado a pH 7.0 a 20°C con HCl. El homogenizado se centrifugó a 12.000 g a 4°C durante 20 minutos y se descartó el sedimento. Se determinó la concentración de proteína en el sobrenadante mediante el método del ácido bicinonónico (Hill y Straka, 1988). A continuación se ajustó la proteína del sobrenadante a una concentración de 2 mg/mL en todas las muestras, se cargó una muestra del sobrenadante (10 μ g de proteína) y se separaron las proteínas por peso molecular mediante electroforesis en un gel de poliacrilamida-SDS al 10% (50 mA). Los geles se transfirieron a una membrana de fluoruro de polivinilidina (Millipore) e incubados con un anticuerpo policlonal específico para iNOS (Santa Cruz; dilución 1:1000). El revelado se realizó con un kit de

enzimoquimioluminiscencia (ECLTM-kit, Amersham Biosciences Europe), siguiendo las instrucciones del fabricante.

3.5.8- Determinación de ATP en tejido cerebral.

Las determinaciones de los niveles de ATP en el tejido cerebral sano e infartado fueron llevadas a cabo en colaboración con el Departamento de Farmacología de la Universidad Complutense de Madrid. Las ratas fueron decapitadas tras sedación profunda con éter etílico y las cabezas congeladas en nitrógeno líquido. Una vez congeladas, se extrajeron los cerebros y se guardaron a –80°C hasta su procesamiento y determinación (De Cristóbal y cols., 2001). Brevemente, se separaron la corteza y el estriado y ambos fueron homogenizados en un medio compuesto por ácido tricloroacético al 0.3% (p/v) y EDTA 1 mM. El homogenado fue centrifugado a 10.000 g durante 3 min y el sobrenadante mezclado con tampón Tris-acetato pH 7.75 a una proporción 1:1. Finalmente, se le añadió luciferín-luciferasa (concentración final de 1.5 mg/ml) y se midió la producción de ATP en un lector de microplaca (Fluoroskan Ascent FL, Labsystems).

3.6- ADMINISTRACIÓN DE LOS FÁRMACOS.

3.6.1- Vía oral.

La administración de fármacos por vía oral se realizó con la rata sedada ligeramente con éter etílico, introduciendo el fármaco directamente en el estómago del animal empleando una sonda gástrica de acero inoxidable de 10 cm de longitud. Se permitió la recuperación del animal durante unos minutos para evitar que regurgitara. A continuación, el animal se anestesió e intubó orotraquealmente, y se procedió con la cirugía descrita para la isquemia.

3.6.2- Bombas de infusión continua (I): infusión intracerebroventricular.

Para el implante de las bombas osmóticas Alzet® (Charles River Laboratories España S.A.) de infusión intracerebroventricular continua, se utiliza una variación del esquema mostrado en la **figura 3.1**, empleando una sola sonda laser-Doppler desplazada ligeramente según se muestra en la **figura 3.6**. Para ello, se realiza un

trépano de 0.8 mm de diámetro 1 mm posterior a bregma y 1.5 mm a la derecha de la sutura media. A través de este trépano y tras haber retirado todo el hueso y abierto una pequeña incisión en la duramadre, se introduce a través de la corteza cerebral la cánula de infusión intracerebroventricular (Alzet® “Brain Infusion Kit II”, 3-5 mm) hasta alcanzar el ventrículo. Para ello primero se hace descender 4 mm la cánula desde la superficie de la corteza y ascender seguidamente 1 mm. Antes de retirar el soporte se coloca un disco de ajuste para mantener esa distancia y se hace solidario con la cánula de soporte de la sonda LDF y los tornillos con cemento dental.

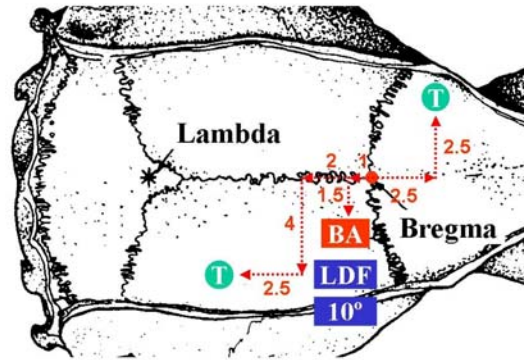


Figura 3.4: Localización de los soportes de las sondas LDF, cánula de infusión intracerebroventricular y tornillos de fijación. LDF: soporte para la sonda láser-Doppler; T: tornillos de fijación; BA: cánula de infusión conectada a la bomba Alzet®.

Finalmente, se coloca la bomba osmótica de infusión continua (“Alzet® Osmotic Pump”), conectada a la cánula de infusión intracerebroventricular mediante un catéter flexible suministrado con el kit, en un saco subdérmico practicado en la zona escapular del animal.

3.6.3- Bombas de infusión continua (II): infusión intraperitoneal.

Para la administración de fármacos intraperitonealmente y de forma continua se emplearon también las bombas osmóticas Alzet®, colocadas en la cavidad abdominal. Para ello, tras finalizar la cirugía de la isquemia/reperfusión, se realizó una incisión en la pared abdominal a través de la cual se introdujo la bomba osmótica cargada con la sustancia objeto de estudio. Una vez acomodada dentro de la cavidad

abdominal se suturó la pared y la piel. A continuación se recuperó al animal de la anestesia y se estabuló con libre acceso a la comida y agua hasta el día de su sacrificio.

3.7- PROTOCOLOS EXPERIMENTALES.

3.7.1- Caracterización del modelo: grupos pseudo-isquémico (control) e isquémico (O/R-ACM 90 min/3 d).

Para la caracterización del modelo se emplearon un total de 46 ejemplares de rata albina de la raza Wistar, distribuidos en dos grupos: 17 pseudo-isquémicos y 29 isquémicos con reperusión (O/R-ACM 90 min/3 d). El transcurso temporal de los experimentos se muestra en la **figura 3.7**.

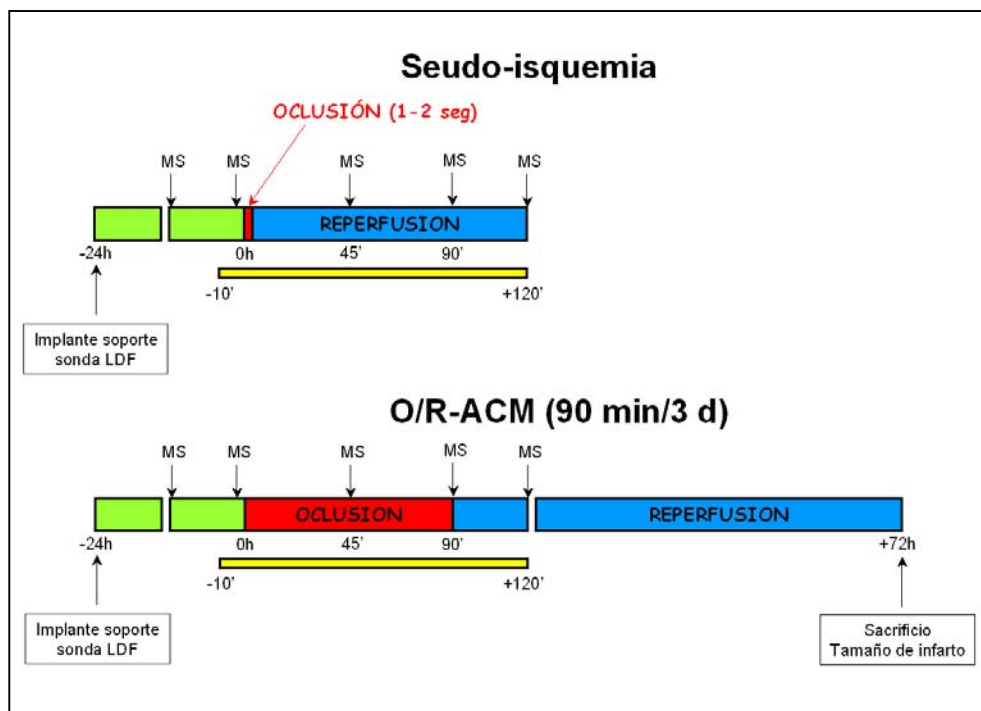


Figura 3.7: Representación esquemática del transcurso temporal de los experimentos para la caracterización del modelo, así como los puntos de toma de muestras de sangre arterial (MS) para la determinación de pO_2 , pCO_2 , pH y glucosa. La barra amarilla indica el tiempo de registro de las variables hemodinámicas (PCC ipsi y contralateral y PAS).

No se excluyó ningún ejemplar del estudio, salvo aquellos muertos por causas accidentales.

Para la caracterización de la respuesta a los distintos fármacos, además de las muertes accidentales durante la cirugía, se consideraron los siguientes casos como criterios para la exclusión del estudio:

- 1- No lograr una reducción de la perfusión cerebrocortical al introducir la sutura intraluminal (PCC oclusión media \geq 90% PCC control media).
- 2- No observar reperfusion, aunque sea parcial, tras retirar el filamento ni durante los 30 min siguientes, por la posibilidad de que sea una isquemia permanente (PCC oclusión media \geq PCC reperfusion media).
- 3- Hemorragia subaracnoidea intraquirúrgica masiva, manifestada como un descenso cercano al 100% de la perfusión cerebrocortical control y un incremento concomitante y transitorio de la PAS, terminando con la muerte del animal. Se confirma la existencia de la hemorragia en la autopsia.

3.7.2- Inhibidor de iNOS: 1.400W.

3.7.2.1- Administración intracerebroventricular.

El transcurso temporal de los experimentos se muestra en la **figura 3.8**:

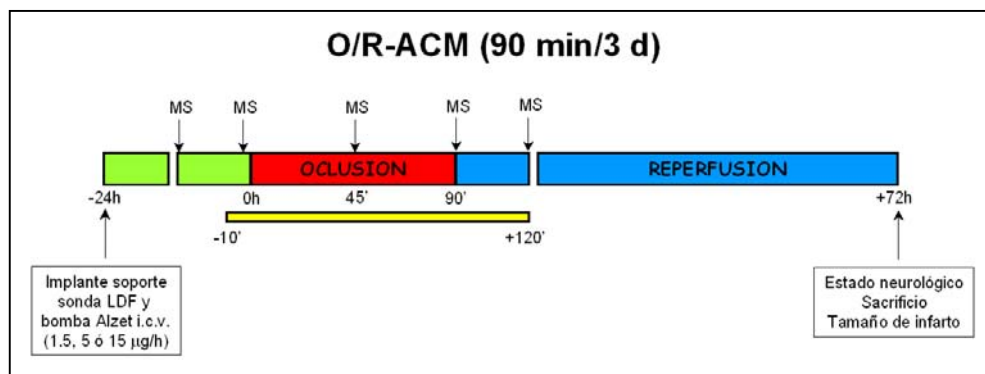


Figura 3.8: Representación esquemática del transcurso temporal del experimento, así como los puntos de toma de muestras de sangre arterial (MS) para la determinación de pO₂, pCO₂, pH y glucosa. La barra amarilla indica el tiempo de registro de las variables hemodinámicas (PCC ipsilateral y PAS).

El inhibidor selectivo de iNOS, 1400W (GlaxoSmithKline) se administró intracerebroventricularmente, disuelto en suero fisiológico, utilizando bombas Alzet® modelo 2ML1 de 2 mL de capacidad y una tasa de liberación de 10 µl/h. Las

La tasa de liberación intraperitoneal de 1.400W empleada fue de 2.5 mg/Kg/h. Se emplearon un total de 83 animales. La distribución de los animales en los distintos grupos experimentales se muestra en la **tabla 3.3**. Fueron descartados 2 animales en el grupo isquémico sin tratamiento y 4 en el isquémico tratado, por los motivos expuestos en el punto 3.7.1.

Tabla 3.3: Relación de animales empleados en cada uno de los grupos experimentales utilizados para la caracterización de la respuesta a 1.400W administrado intraperitonealmente.

	Hemodinámica, volumen infarto, L-glu y L-arg (suero)	Expresión iNOS	ATP estriatal	Microdiálisis (L-glu estriatal)
Seudo-isquemia	8	3	3	4
Sin tratamiento	14	15	6	4
1.400W(2.5 mg/Kg/h)	17	--	6	3
n	39	18	15	11

Las muestras de sangre (0.5 mL) para la determinación de L-arginina y L-glutámico en suero se obtuvieron a partir de la arteria de la cola, previamente inmovilizado el animal, recogiendo la sangre en tubos eppendorf®. Una vez coagulada, se centrifugó (11.000 g durante 6 min) (Biofugue *pico*, Heraeus S.A.) y se guardó el sobrenadante a -20°C hasta la determinación.

3.7.4 Antioxidante: Ebselén.

El transcurso temporal de los experimentos se muestra en la **figura 3.10**:

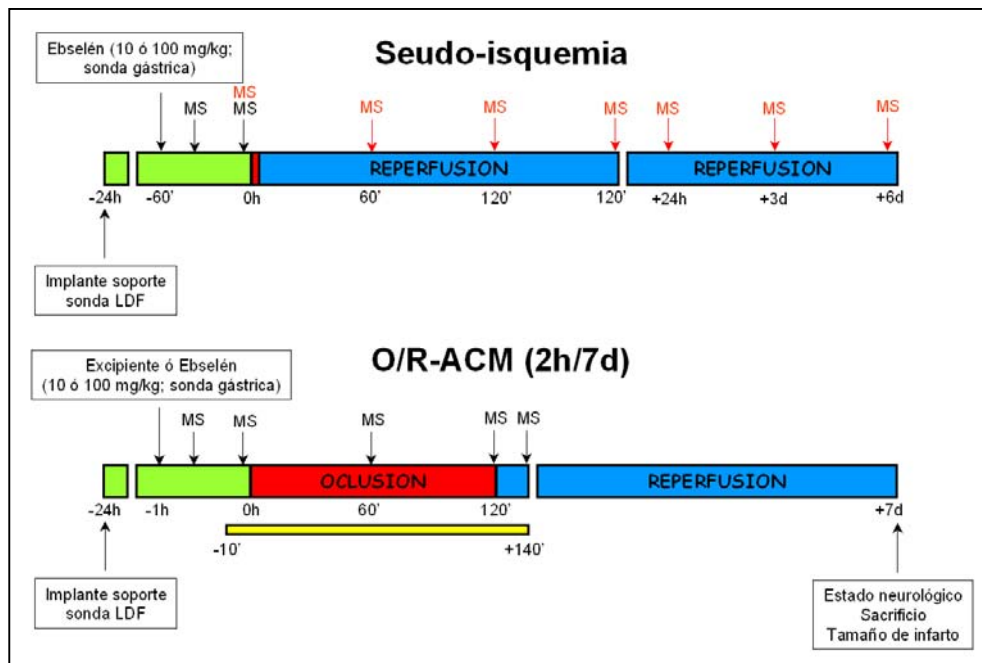


Figura 3.10: Representación esquemática del transcurso temporal de los experimentos así como los puntos de toma de muestras de sangre arterial (MS) para la determinación de pO_2 , pCO_2 , pH y glucosa. En rojo se indican las muestras de sangre tomadas a los animales seudo-isquémicos (MS) en las que se determinó la concentración de selenio en suero sanguíneo. La barra amarilla indica el tiempo de registro de las variables hemodinámicas (PCC ipsilateral y PAS).

El ebselén (Sigma) se administró por vía oral, 1 h antes de la inducción de la isquemia, suspendido en aceite de oliva y empleando una sonda gástrica introducida hasta el estómago en la rata sedada.

En este grupo experimental se emplearon un total de 108 animales, de los cuales 7 murieron durante la cirugía y 8 fueron descartadas por alguno de los motivos expuestos en el punto 3.7.1 (5 del grupo control, 2 del tratado con 10 mg/kg y 1 del tratado con 100 mg/Kg).

La distribución de los animales en los distintos grupos experimentales se muestra en la **tabla 3.4**.

Tabla 3.4: Relación de animales empleados en cada uno de los grupos experimentales utilizados para la caracterización de la respuesta a ebselén administrado por vía oral.

		Volumen de infarto (7 días)	GSH / GSH-Px	Selenio plasmático
Seudo-isquemia	Basal	--	5	--
	Excipiente	--	4	3
	10 mg/Kg	--	--	5
	100 mg/Kg	--	5	3
Isquemia	Sin tratamiento Sin reperfusión	--	6	--
	Sin tratamiento Con reperfusión	14	11	--
	10 mg/Kg Sin reperfusión	--	8	--
	10 mg/Kg Con reperfusión	11	8	--
	100 mg/Kg Sin reperfusión	--	5	--
	100 mg/kg Con reperfusión	9	4	--
	n	34	56	11

Las muestras de sangre (0.8-1 mL) para la determinación de la evolución temporal de los niveles de selenio en plasma tomadas 1, 2, 3 y 4 horas tras el bolo oral, se obtuvieron de la arteria femoral izquierda cateterizada y con el animal anestesiado y ventilado mecánicamente. Las muestras tomadas a 24 h, 3 y 6 días, se obtuvieron por punción cardíaca, con el animal anestesiado con éter etílico. La sangre se recogió en una jeringa heparinizada y se centrifugó (11.000 g durante 6 min) (Biofugue *pico*, Heraeus S.A.). Se guardó el sobrenadante congelado a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta la determinación.

3.7.5- Inhibidor de las fosfolipasas A₂ de secreción: 12-*epi*-scalaradial.

El transcurso temporal de los experimentos se muestra en la **figura 3.11**:

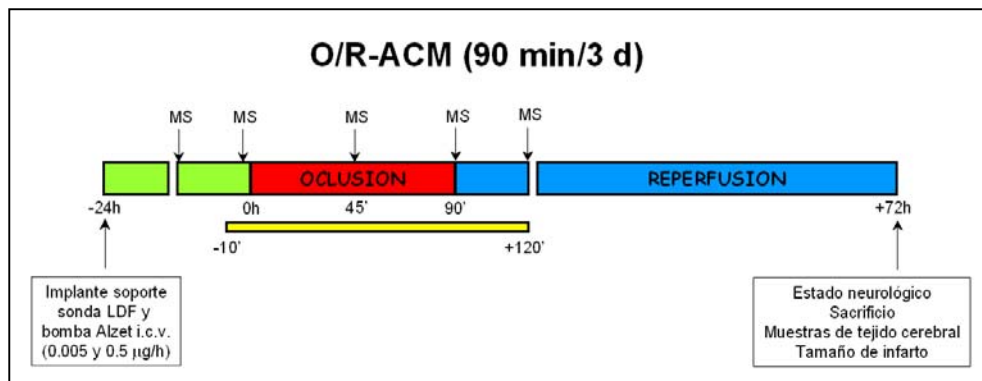


Figura 3.11: Representación esquemática del transcurso temporal del experimento, así como los puntos de toma de muestras de sangre arterial (MS) para la determinación de pO₂, pCO₂, pH y glucosa. La barra amarilla indica el tiempo de registro de las variables hemodinámicas (PCC ipsilateral y PAS).

Debido a su insolubilidad en agua o suero fisiológico, el 12-*epi*-scalaradial (Calbiochem) se administró intracerebroventricularmente disuelto en una disolución compuesta por 2-hidroxiopropil-β-ciclodextrina (13.5%) (Sigma) y etanol (10%) en solución salina fisiológica, con tasas de liberación de 0.005 y 0.5 µg/h. Se utilizaron bombas Alzet® modelo 2001 de 200 µl de capacidad y una tasa de liberación de 1 µl/h. Se utilizaron un total de 33 animales; 12 sin tratamiento y 13 y 8 con 0.005 µg/h y 0.5 µg/h de 12-*epi*-scalaradial, respectivamente, de los cuales 3 murieron durante la cirugía y 1 fue descartado (grupo scalaradial 0.005 µg/h) por alguno de los motivos expuestos en el punto 3.7.1.

3.8- ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS (ESTADÍSTICA).

Para la comparación estadística dentro de un grupo se empleó un test de la *t* o un ANOVA para muestras repetidas seguido de un post-test Dunnet, siempre que la disponibilidad de los datos lo permitió. Cuando la ausencia de algún dato experimental no permitía su aplicación, se empleó un test de la *t* o un ANOVA para muestras independientes.

Para la comparación estadística entre distintos grupos, se utilizó un test de la *t* para muestras independientes (dos grupos), o un ANOVA para muestras independientes (más de dos grupos). En este segundo caso, el post-test seleccionado fue el de Dunnett cuando se pretendió hacer una comparación respecto a un grupo concreto, y el de Student-Newman-Keuls cuando se pretendió comparar todos los grupos entre sí.

Para comparar la tasa de mortalidad asociada al modelo o los tratamientos, se usó una tabla de contingencia y un test de Fisher.

Para comparar el déficit neurológico observado entre los distintos tratamientos se utilizó un test no paramétrico (Mann-Whitney para comparar dos grupos y Kruskal-Wallis con post-test Dunn para comparar más de dos grupos).

Las significaciones estadísticas se indican en los pies de cada figura o gráfica. Se consideró estadísticamente significativo un valor de $p < 0.05$.

Resultados

4.1- CARACTERIZACIÓN DEL MODELO EXPERIMENTAL.

4.1.1- Parámetros hemodinámicos y metabólicos.

A) Grupo pseudo-isquémico (control).

Con el fin de determinar su posible variación a lo largo del tiempo de forma espontánea, se llevó a cabo la monitorización de los parámetros objeto de estudio en un grupo de animales sometidos a toda la intervención quirúrgica, salvo la oclusión mantenida de la ACM (n=17). La **figura 4.1** muestra la evolución de la perfusión cerebrocortical (PCC) y la presión arterial sistémica (PAS) en un registro representativo de este grupo.

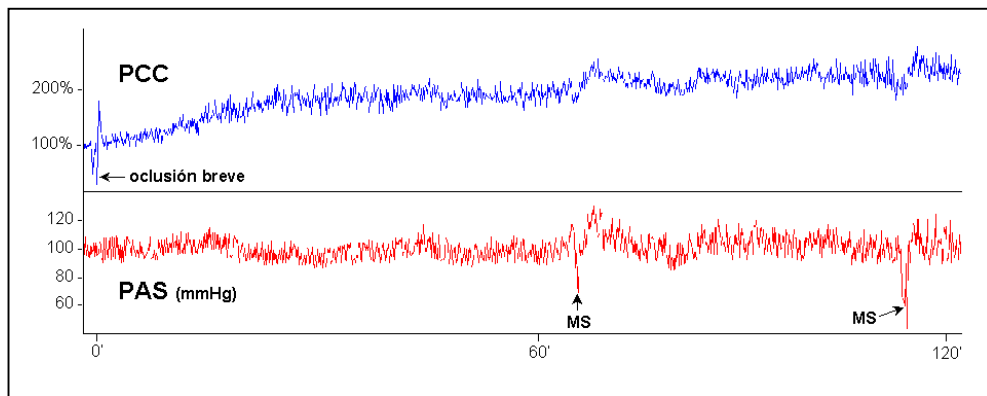


Figura 4.1: Registro representativo (aprox. 2 h) obtenido en una ratona del grupo pseudo-isquémico. La perfusión cerebrocortical (**PCC**) aparece expresada como porcentaje de la perfusión existente previa a la oclusión breve de la ACM. La presión arterial sistémica (**PAS**) aparece expresada en valores absolutos (mmHg). **MS** indican los artefactos en la PAS producido por la toma de muestra de sangre arterial para la determinación de pO_2 , pCO_2 , pH y glucemia.

La PAS no varió significativamente a lo largo de las 2 h de registro, con una media aritmética del grupo comprendida en todo momento en valores normotensos en el rango entre 94.4 y 101.4 mmHg. Sin embargo, la PCC aumentó de forma progresiva alcanzando significación estadística a partir de los 80-90 min. tras la oclusión transitoria breve, tal y como se muestra en la **figura 4.2**.

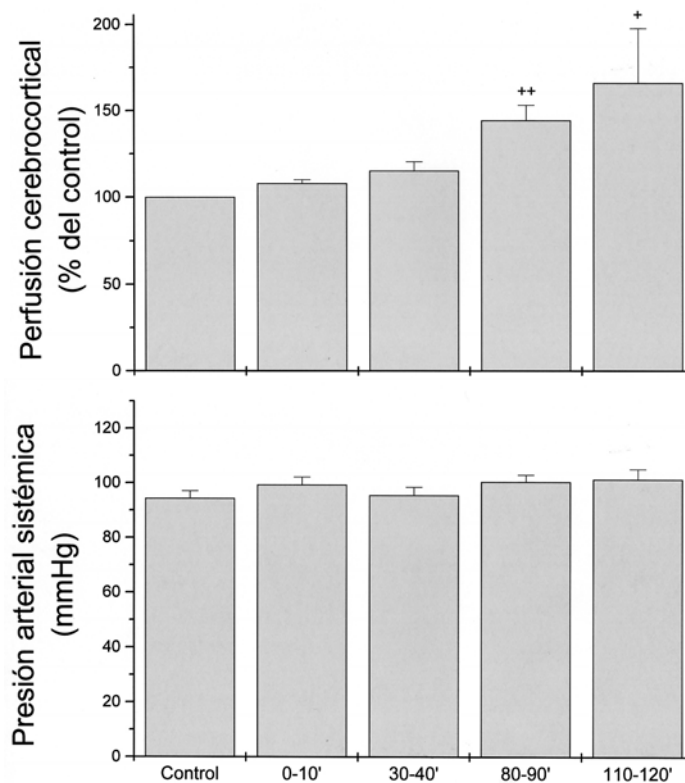


Figura 4.2: Evolución de la perfusión cerebrocortical (PCC) y la presión arterial sistémica (PAS) en el grupo pseudo-isquémico a lo largo del experimento. Los valores se expresan porcentualmente respecto del control (PCC) y como valores absolutos en mmHg (PAS), y están representados como Media \pm Error Estándar de la Media (EEM) obtenidos en 17 experimentos.

+ y ++ Significativamente diferente de los valores previos a la pseudo-isquemia (Control), $p < 0.05$ y $p < 0.01$, respectivamente (ANOVA muestras repetidas; post-test Dunnet).

Los valores de pO_2 , pCO_2 , pH y glucemia obtenidos en este grupo experimental se presentan en la **tabla 4.1**. Se produjo un descenso progresivo de la PaO_2 respecto a los valores previos a la inducción de la isquemia, que alcanzó significación a los 120 min.

En el caso de la pCO_2 , ésta se mantuvo constante desde el inicio de la intervención quirúrgica, y sólo se observó un ligero incremento a los 120 minutos que no alcanzó significación estadística.

La pseudo-isquemia provocó un descenso progresivo de pH respecto al valor existente antes de la oclusión, que alcanzó su valor máximo en la muestra tomada a los 90 min.

En el caso de la glucemia, se observó una ligera tendencia a su disminución a lo largo de los 120 min que duró el registro, aunque las diferencias no llegaron a ser significativas respecto del valor de referencia (pseudo-isquemia).

Tabla 4.1: Valores de pO₂, pCO₂, pH y glucemia obtenidos en las diferentes etapas del experimento, en el grupo pseudo-isquémico (control).

	Control	Seudo- isquemia	45'	90'	120'
pO ₂ (mmHg)	141.8 ± 28.0	138.9 ± 20.9	128.3.0 ± 22.6	122.3 ± 16.3	106.6 ± 16.0 ⁺
pCO ₂ (mmHg)	30.4 ± 2.9	29.3 ± 3.4	30.2 ± 4.1	29.5 ± 6.6	37.0 ± 6.8
pH	7.45 ± 0.03	7.46 ± 0.04	7.41 ± 0.05 ⁺⁺	7.38 ± 0.06 ⁺⁺	7.38 ± 0.04 ⁺
Glucemia (mg/dL)	91.8 ± 12.1	85.6 ± 23.9	79.9 ± 33.4	80.1 ± 31.7	75.4 ± 13.5
n	16	17	12	10	5

Los valores se expresan en unidades absolutas, y están tabulados como Media ± Desviación Estándar de la Media (DEM) a partir de “n” experimentos.

+ y ++ Significativamente diferente de los valores previos a la pseudo-isquemia, p<0.05 y p<0.01, respectivamente (ANOVA muestras repetidas; post-test Dunnet).

B) Grupo isquémico.

En la **figura 4.3** se presentan los trazados de las diferentes señales registradas en el desarrollo de un episodio representativo de 90 min. de isquemia seguido de reperfusión.

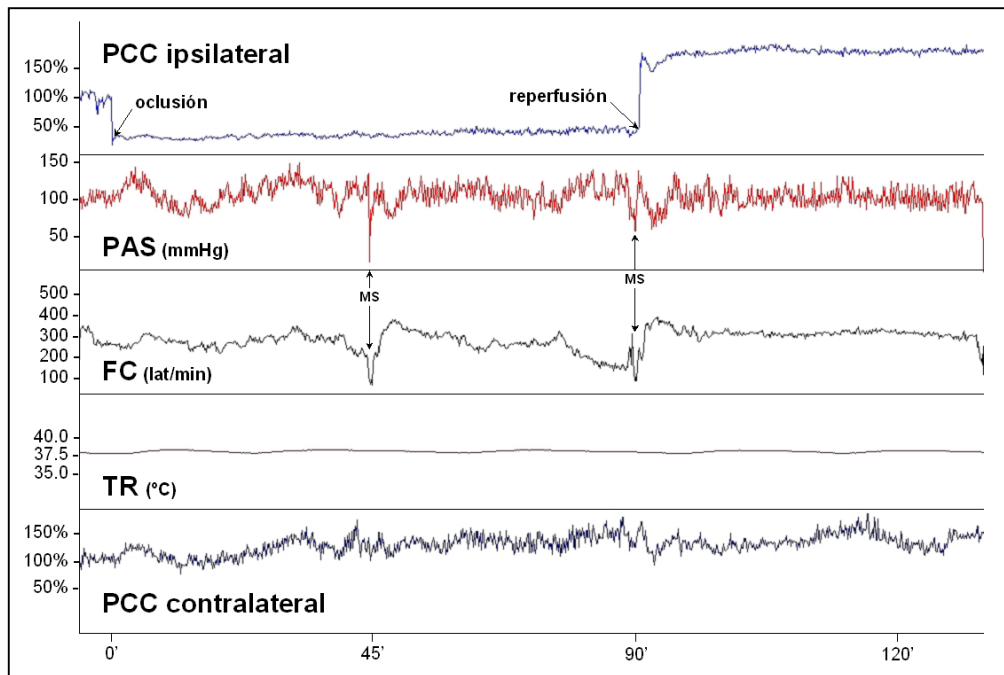


Figura 4.3: Registro completo (aprox. 2 h. 45 min.) y comprimido, donde se indican los momentos de oclusión y reperusión de la ACM. PCC y TR son la perfusión cerebrocortical (ipsi- y contralateral a la ACM ocluida) y la temperatura rectal, respectivamente. Los artefactos producidos en los trazados de la presión arterial sistémica (PAS) y frecuencia cardiaca (FC) se deben a la maniobra para la toma de las muestras de sangre (MS) de la arteria femoral.

El deslizamiento de la sutura intraluminal hasta el origen de la ACM, produjo un descenso brusco de la PCC en el hemisferio ipsilateral que se mantuvo constante durante los 90 min. de oclusión. Transcurrido este período se retiró la sutura (reperusión), maniobra que dió lugar a un incremento brusco de la PCC (hiperemia). Durante la fase de oclusión, la PCC media en el hemisferio ipsilateral quedó en un $46.3 \pm 19.9\%$ (Media \pm DEM, n=29) del control. Durante la fase de reperusión que se monitorizó (30 min) la PCC alcanzó el $215.9 \pm 94.5\%$ (Media \pm DEM, n=29) del control. Tras esta fase hiperémica temprana, la PCC ipsilateral se recuperó paulatinamente y a los 30 min tras permitir la reperusión se igualó a la PCC contralateral (**figura 4.4**). En el hemisferio contralateral se produjo un incremento progresivo de la PCC a lo largo de la intervención, similar al observado en el grupo pseudo-isquémico (**figuras 4.3 y 4.4**).

La PAS no varió significativamente a lo largo del experimento, manteniéndose en valores próximos a los existentes antes de la oclusión (**figuras 4.3 y 4.4**).

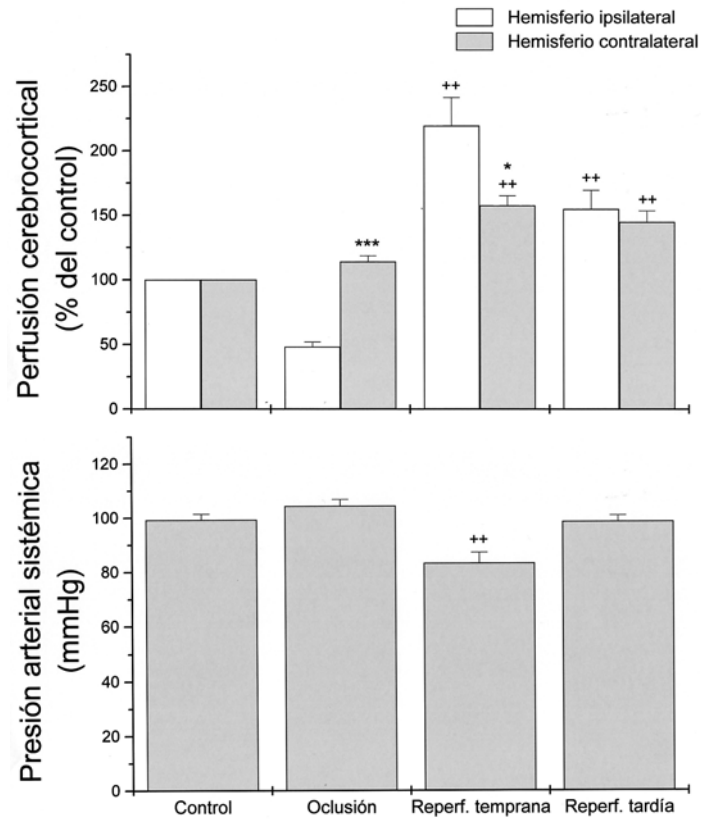


Figura 4.4: Valores de perfusión cerebrocortical (PCC) y presión arterial sistémica (PAS) del grupo de animales sometidos a isquemia focal transitoria de 90 min. de duración. Los valores de PCC y PAS se expresan como porcentaje de la PCC basal y mmHg, respectivamente, y representan la Media \pm Error Estándar de la Media (EEM) de los valores obtenidos en 29 experimentos.

++ Significativamente diferente de los valores control, $p < 0.01$ (ANOVA muestras repetidas; post-test Dunnet).

* y *** Significativamente diferente de los valores correspondientes al hemisferio ipsilateral, $p < 0.05$ y $p < 0.001$, respectivamente (test de la t).

Sólo en dos breves intervalos se observaron variaciones significativas respecto al control. Inmediatamente tras la oclusión se produjo un incremento de la PAS de 24.7 ± 10.4 mmHg (Media \pm DEM; **figura 4.5**), que representó un incremento del 24.8 %. El tiempo medio transcurrido desde la oclusión de la ACM

hasta que se alcanzó el valor máximo de dicho incremento de presión fue de 160 ± 88 seg. A continuación la PAS se recuperó con rapidez hasta alcanzar valores similares al control. Tras la liberación de la oclusión se produjo un descenso significativo de la PAS de 25.6 ± 19.1 mmHg (Media \pm DEM; **figura 4.5**), lo que representó un descenso del 24.6%. Esta reacción a la liberación de la oclusión tardó 149 ± 81 seg. en alcanzar su punto máximo. Tras esta caída, la presión se recuperó rápidamente hasta valores similares a los control.

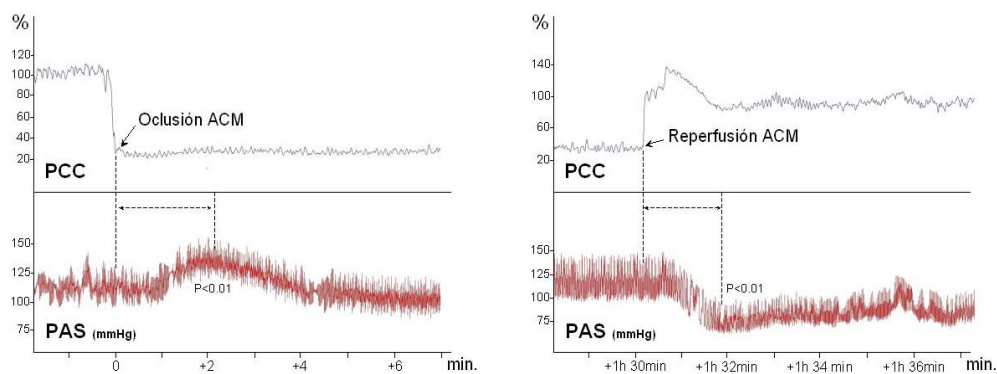


Figura 4.5: Registro gráfico de la perfusión cerebrocortical (PCC) ipsilateral y presión arterial sistémica (PAS) durante los momentos de oclusión y reperfusión de la ACM. Los valores de PCC y PAS se expresan como porcentaje de la PCC basal y mmHg, respectivamente.

Los valores de pO_2 , pCO_2 , pH y glucemia arteriales obtenidos en este grupo experimental se presentan en la **tabla 4.2**. Se produjo un descenso progresivo de la pO_2 respecto a los valores previos a la inducción de la isquemia, que alcanzó significación a los 45 y 90 min. Al establecer la reperfusión la pO_2 se recuperó hasta valores similares e incluso ligeramente superiores a los existentes antes de la isquemia, siendo significativa la diferencia respecto al grupo control.

En el caso de la pCO_2 se produjo un incremento significativo en las muestras tomadas a los 45 y 90 min. tras la oclusión respecto de los valores pre-isquémicos. Estas diferencias desaparecieron después de unos minutos tras el inicio de la reperfusión, recuperándose hasta alcanzar valores comparables a los existentes antes de la oclusión.

La isquemia provocó un descenso progresivo de pH respecto al valor existente antes de la oclusión, que alcanzó su valor máximo en la muestra tomada a los 90 min. El pH se recuperó completamente al establecer la reperfusión.

En el caso de la glucemia, se observó una ligera tendencia a su disminución a lo largo de toda la intervención, aunque sólo se evidenciaron diferencias significativas respecto a los valores existentes antes de la oclusión a los 90 min.

Tabla 4.2: Valores de pO₂, pCO₂, pH y glucemia arteriales obtenidos en las diferentes etapas del experimento, en el grupo sometido a isquemia de 90 min. de duración.

	Control	Pre-OACM	45' OACM	90' OACM	30' Reperf.
pO ₂ (mmHg)	135.8±29.39	126.4±16.4*	114.8±23.5 ⁺	115.3±22.1 ⁺	135.5±20.6*
pCO ₂ (mmHg)	32.5±7.0	31.4±6.5	39.8±11.2 ⁺⁺⁺	40.2±8.6 ⁺⁺⁺	28.7±6.0
pH	7.47±0.06	7.46±0.06	7.36±0.07 ⁺⁺⁺	7.35±0.06 ⁺⁺⁺	7.44±0.05*
Glucemia (mg/dL)	90.5±12.2	84.0±16.9	80.3±15.6	77.4±17.5 ⁺	74.3±18.4
n	29	29	29	29	6

Los valores se expresan en unidades absolutas, y están tabulados como Media ± Desviación Estandar de la Media (DEM) a partir de “n” experimentos.

+ y ++ Significativamente diferente de los valores previos a la oclusión (pre-OACM), p<0.05 y p<0.01, respectivamente (ANOVA muestras repetidas; post-test Dunnet).

* y ** Significativamente diferente de la muestra equivalente en el grupo pseudo-isquémico, p<0.05 y p<0.01, respectivamente (test de la *t*).

4.1.2- Valoración neurológica y volumen de infarto.

Los déficits neurológicos en los animales sometidos al protocolo de 90 minutos de oclusión y 3 días de reperfusión (90 min/3 d) y evaluados con el test descrito en el punto 3.3 del apartado Material y Métodos, alcanzaron una puntuación media de 2.3 ± 1.7 (Media ± DEM, n=21).

El tejido afectado por la oclusión transitoria de la ACM se pone de manifiesto mediante la tinción con TTC. Un ejemplo de cerebro sometido a isquemia se muestra en la **figura 4.6**.

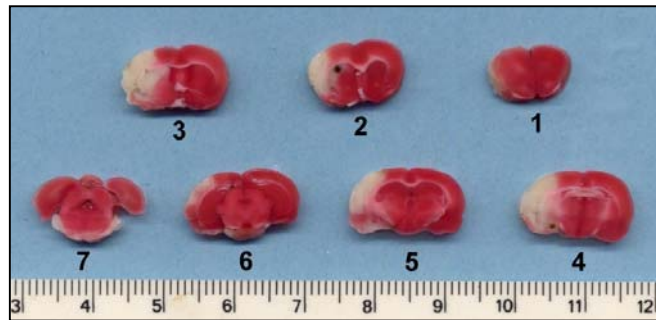


Figura 4.6: Secciones de 2 mm de grosor del cerebro de rata (cara frontal), teñidas con TTC y postfijadas durante 24 h en formaldehído 10% en PB 0.1 M, pH 7.4.

La **figura 4.7** muestra la distribución del tejido infartado a lo largo de las 7 secciones de 2 mm obtenidas de cada cerebro.

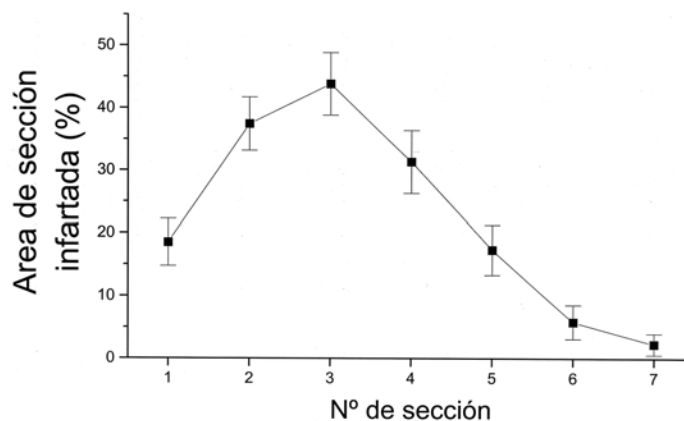


Figura 4.7: Representación gráfica de la distribución por secciones del tejido infartado en el modelo O/R-ACM 90 min/3 d. Los valores de área infartada se expresan como porcentaje del hemisferio completo, y representan la Media \pm Desviación Estándar de la Media (DEM) de los resultados obtenidos en 15 experimentos.

El volumen medio de infarto obtenido con este modelo de isquemia fue de $185.7 \pm 100.20 \text{ mm}^3$, lo que representa un $25.3 \pm 13.8\%$ (Media \pm DEM, n=15) del hemisferio cerebral completo.

4.1.3- Evolución ponderal.

El peso medio inicial de las ratas sometidas a isquemia fue de 338.9 ± 20.1 g (Media \pm DEM, n=28). Tras el implante de las sondas para el registro de PCC, las ratas (en ayunas) perdieron un 5.6% de su peso antes de sufrir la isquemia ($94.4 \pm 1.8\%$ del inicial; n=28). Al cabo de tres días desde el comienzo de la reperusión perdieron peso hasta alcanzar el $85.2 \pm 4.7\%$ del peso inicial (n =23).

4.2- EVALUACIÓN DEL POTENCIAL NEUROPROTECTOR.

4.2.1- Inhibidor de iNOS: 1400W.

La **administración intracerebroventricular** de 1400W (15 µg/h) se resultó neurotóxica, causando la muerte de 4 de los 5 animales durante las primeras horas tras implantar la cánula intracerebroventricular. Con las dosis inferiores (1.5 y 5 µg/h) no se produjeron muertes previas a la inducción de la isquemia, pero la mayoría de los animales lo hicieron después (5 de un total de 5 en el grupo tratado con 1.5 µg/h; y 5 de un total de 7 en el grupo tratado con 5 µg/h). Estas circunstancias motivaron el cambio de vía de administración de 1400W.

4.2.1.1- Parámetros hemodinámicos y metabólicos.

La **administración intraperitoneal** mediante bomba osmótica del inhibidor de iNOS, 1400W (2.5 mg/Kg/h), no originó diferencias significativas en la perfusión cerebrocortical entre el grupo control y el tratado, tanto antes, como durante la fase de isquemia y durante la fase de reperfusión, tal y como muestra la **figura 4.8**. La presión arterial sistémica tampoco varió debido al tratamiento.

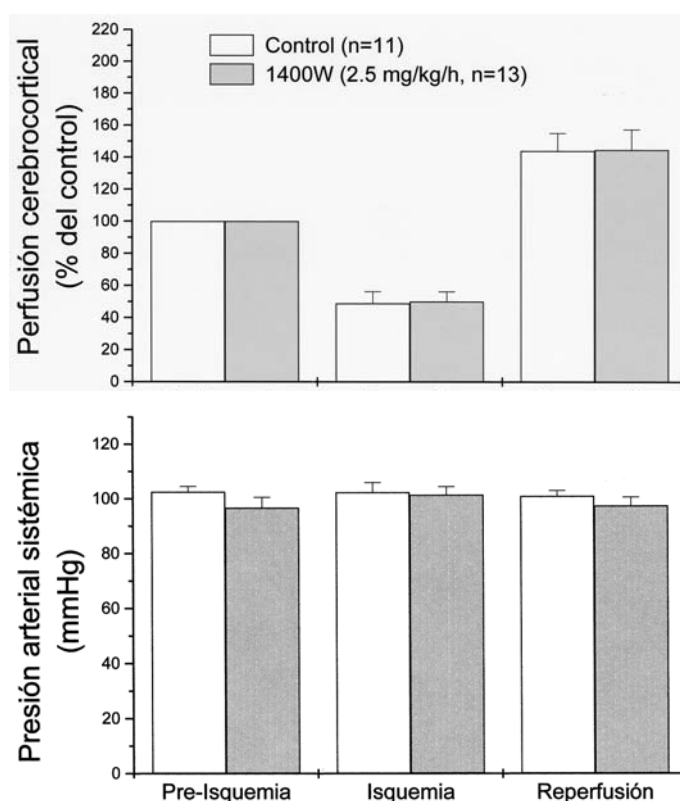


Figura 4.8: Valores de perfusión cerebrocortical (PCC) y presión arterial sistémica (PAS) de los grupos control y tratado con 1400W (2.5 mg/Kg/h) sometidos a isquemia focal transitoria de 90 min. Los valores de PCC y PAS se expresan como porcentaje de la PCC basal y mmHg, respectivamente, y representan la Media \pm Error Estándar de la Media (EEM) de los valores obtenidos en “n” experimentos.

No hubo diferencias significativas entre el grupo control y el tratado respecto a pO_2 , pCO_2 , pH y glucemia, en sangre arterial. Las diferencias que aparecieron dentro de los grupos son las que suceden debido a la isquemia, descritas en el apartado 4.1.1, y que no se ven alteradas debido al tratamiento con 1400W. Los valores medios de pO_2 , pCO_2 , pH y glucemia en los tres grupos a lo largo del experimento se resumen en la **tabla 4.3**:

Tabla 4.3: Valores de pO₂, pCO₂, pH y glucemia arteriales obtenidos en las diferentes etapas del experimento, en los grupos control y tratado con 1400W (2.5 mg/Kg/h intraperitoneal), sometidos a isquemia de 90 min. de duración.

	Pre-OACM (0')		45-60' OACM	
	Control	Tratado	Control	Tratado
pO ₂ (mmHg)	7.51±0.04	7.53±0.04	7.39±0.06 ⁺⁺	7.40±0.07 ⁺⁺
pCO ₂ (mmHg)	116.9±20.8	132.3±25.4	107.0±22.7	102.2±22.4 ⁺⁺
pH	7.37±3.6	7.26±3.7	7.36±5.0 ⁺⁺	7.37±8.9 ⁺⁺
Glucemia (mg/dL)	87.6±22.6	82.8±23.3	77.4±12.8	86.0±21.3
n	11	13	11	13

90' OACM		Reperusión	
Control	Tratado	Control	Tratado
7.37±0.05 ⁺⁺	7.37±0.06 ⁺⁺	7.43±0.02	7.43±0.03 ⁺⁺
107.18±19.6	104.1±22.3 ⁺	105.5±16.5	135.0±22.9
37.6±5.0 ⁺⁺	37.5±6.6 ⁺⁺	30.5±2.1	30.3±2.8
78.8±23.7	68.5±22.5	78.0±22.7	59.0±12.9
11	13	2	4

Los valores se expresan en unidades absolutas, y están tabulados como Media ± Desviación Estándar de la Media (DEM) a partir de “n” experimentos. El valor de referencia de los tres grupos es el existente previo a la oclusión (pre-OACM).

+ y ++ Significativamente diferente de los valores pre-OACM, p<0.05 y p<0.01, respectivamente (ANOVA muestras repetidas; post-test Dunnet).

4.2.1.2- Mortalidad.

La mortalidad postquirúrgica en ambos grupos fue similar. De los 12 animales del grupo control y los 13 del tratado con 2.5 mg/Kg/h de 1400W i.p., murieron 2 y 3 animales, respectivamente.

4.2.1.3- Valoración neurológica y volumen de infarto.

El estado neurológico de los animales tratados mejoró significativamente respecto del estado de los animales control, tal y como se observa en la **figura 4.9**.

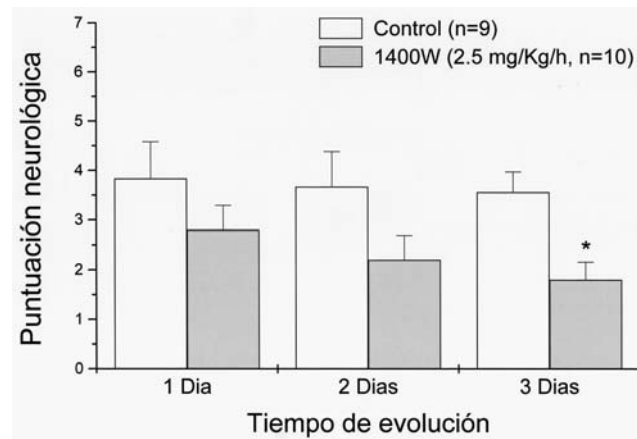


Figura 4.9: Valoración neurológica de los animales de los grupos control y tratado durante los 3 días de supervivencia tras la isquemia focal transitoria. Los valores se expresan como la puntuación obtenida en el test neurológico, descrito en el apartado 3.3 de la sección de Material y Métodos, y representan la Media \pm Error Estándar de la Media (EEM) a partir de “n” experimentos.

* Significativamente diferente del grupo control (test de Mann-Whitney).

El tratamiento con 1400W intraperitoneal redujo el tamaño de infarto de forma significativa respecto al grupo control, pasando de representar el $30.4 \pm 12.2\%$ del volumen del hemisferio completo en el grupo control, al $18.5 \pm 10.0\%$ en el grupo tratado (**figura 4.10 izquierda**). El volumen de infarto obtenido en el grupo control fue de $201.4 \pm 77.5 \text{ mm}^3$ y de $129.7 \pm 71.7.0 \text{ mm}^3$ para el grupo tratado con 1400W. Los volúmenes de los hemisferios contralaterales fueron de $671.8 \pm 46.8 \text{ mm}^3$ y $698.7 \pm 34.8 \text{ mm}^3$, respectivamente. El área media de sección infartada en el grupo tratado con 1400W intraperitoneal es menor en todas las secciones (**figura 4.10 derecha**), y las mayores diferencias con el grupo control se observan en las secciones 3 y 4, donde alcanzan significación estadística ($p < 0.05$). Estas secciones coronales, de 2 mm de grosor, corresponden a los mm 6 a 8 y 8 a 10, respectivamente, en que se ha dividido el hemisferio.

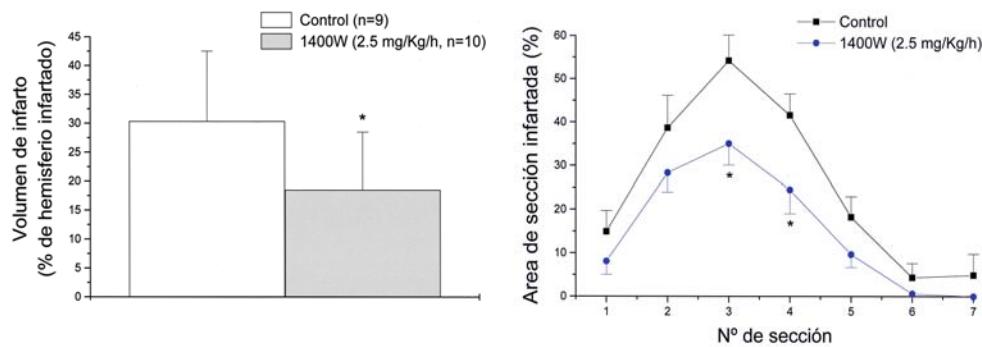


Figura 4.10: Representación gráfica del volumen de hemisferio infartado (izqda.) y la distribución por secciones del tejido infartado (dcha.) en el grupo control y en el tratado con 1400W. Los valores se expresan como porcentaje infartado del hemisferio completo (izqda.) y de cada una de las 7 secciones en que se ha dividido el cerebro (dcha.), y representan la Media \pm Desviación Estándar de la Media (DEM) obtenidas en “n” experimentos.

* Significativamente diferente del grupo control, $p < 0.05$ (test de la t para muestras independientes).

4.2.1.4- Evolución ponderal.

El peso medio inicial de las ratas sometidas a isquemia fue de 330.9 ± 16.7 g en el grupo control ($n = 11$) y 330.7 ± 13.7 g en el grupo tratado con 1400W ($n = 13$). Tras el implante de las cánulas las ratas (en ayunas) de los grupos control y tratado perdieron peso hasta alcanzar, inmediatamente antes de la inducción de la isquemia, un $92.4 \pm 3.2\%$ y $93.6 \pm 1.2\%$, respectivamente, del peso inicial. Tras la isquemia/reperfusión y al cabo de tres días de evolución, su peso representaba el $81.2 \pm 5.3\%$ y el $84.4 \pm 3.6\%$, respectivamente, del peso inicial.

4.2.1.5- Niveles séricos de L-arginina y L-glutamato.

En la **figura 4.11** se presentan las concentraciones de L-arginina sérica a lo largo del experimento en los grupos pseudo-isquémico, isquémico no tratado e isquémico tratado con 2.5 mg/Kg/h de 1400W i.p. La concentración de L-arginina en el suero de las ratas pseudo-isquémicas permaneció constante durante todo el muestreo, en torno a valores comprendidos entre 71.5 y 77.8 $\mu\text{mol/L}$. En las ratas sometidas a isquemia sin tratamiento, la concentración se mantuvo constante en estos valores hasta las 2 h. (inclusive) tras el inicio de la isquemia (30' tras la reperfusión).

A partir de aquí disminuyó bruscamente en la muestra tomada a las 4 h (30.9 ± 7.4 $\mu\text{mol/L}$), alcanzando el mínimo valor (23.1 ± 4.0 $\mu\text{mol/L}$) a las 6 h y manteniéndose en niveles muy bajos (27.0 ± 11.5 $\mu\text{mol/L}$) hasta 24 h después. A las 48 h se había recuperado hasta 51.2 ± 8.2 $\mu\text{mol/L}$ y a las 72 h había retornado a los valores control. La administración intraperitoneal del 1400W redujo este descenso de L-arginina sérica, alcanzando un mínimo de concentración a las 4 h (55.7 ± 11.2 $\mu\text{mol/L}$), siendo las concentraciones en las muestras significativamente mayores que las alcanzadas a las 4, 6, 24 y 48 h sin tratamiento (55.7 ± 11.2 , 57.0 ± 11.3 , 58.2 ± 13.5 y 70.7 ± 8.6 $\mu\text{mol/L}$ respectivamente), retornando también a los valores control a las 72 h tras la isquemia.

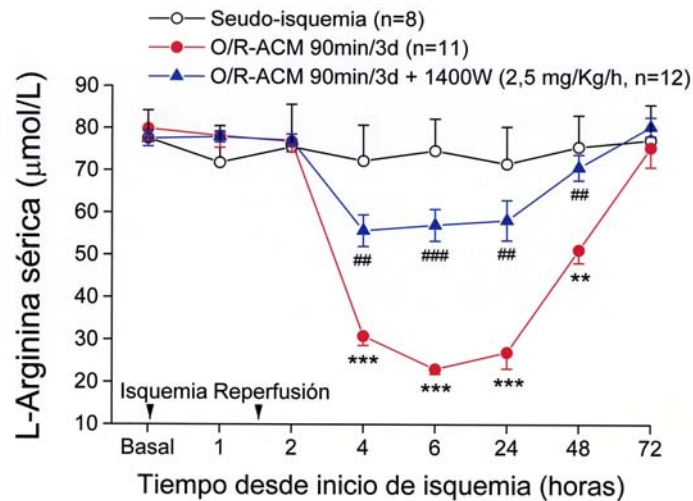


Figura 4.11: Evolución temporal de la concentración de L-arginina sérica en los grupos seudo-isquémico e isquémico con y sin tratamiento con 1400W intraperitoneal (2.5 mg/Kg/h). Los valores se expresan en $\mu\text{mol/L}$ y representan la Media \pm Desviación Estándar de la Media (DEM) obtenida en cada tiempo de muestreo a partir de “n” experimentos. En el eje de abscisas se indican los momentos de inicio de **isquemia** y **reperfusión**. El valor basal es el previo a la oclusión.

** y *** Significativamente diferente del grupo seudo-isquémico, $p < 0.01$ y $p < 0.001$, respectivamente. ## y ### Significativamente diferente del grupo isquémico sin tratamiento (O/R-ACM 90 min/3 d), $p < 0.01$ y $p < 0.001$, respectivamente (ANOVA para muestras independientes, post-test Student-Newman-Keuls).

En la **figura 4.12** se presentan las concentraciones de L-glutamato sérico a lo largo del experimento en los grupos pseudo-isquémico, isquémico e isquémico tratado con 2.5 mg/Kg/h de 1400W i.p. La concentración de L-glutamato en el suero de las ratas pseudo-isquémicas permaneció durante todo el muestreo en valores comprendidos entre 138 y 170 $\mu\text{mol/L}$. En las ratas sometidas a isquemia sin tratamiento, la concentración se mantuvo constante en estos valores hasta las 4 h. (inclusive) tras el inicio de la isquemia (2 h y 30 min. tras la reperfusión). A partir de aquí aumentó bruscamente hasta alcanzar el valor máximo en la muestra tomada a las 6 h ($416 \pm 28 \mu\text{mol/L}$) y se mantuvo en niveles elevados ($351 \pm 30 \mu\text{mol/L}$) 24 h después. A las 48 h prácticamente alcanzó los valores control ($184 \pm 20 \mu\text{mol/L}$), y a las 72 h había retornado a los valores control. La administración intraperitoneal de 1400W redujo este incremento de L-glutamato sérico, alcanzando el máximo de concentración también a las 6 h ($252 \pm 16 \mu\text{mol/L}$), siendo la diferencia significativamente menor que la alcanzada a las 24 h sin tratamiento ($210 \pm 9 \mu\text{mol/L}$) y retornando a los valores control a las 48 h tras la isquemia ($149 \pm 8 \mu\text{mol/L}$).

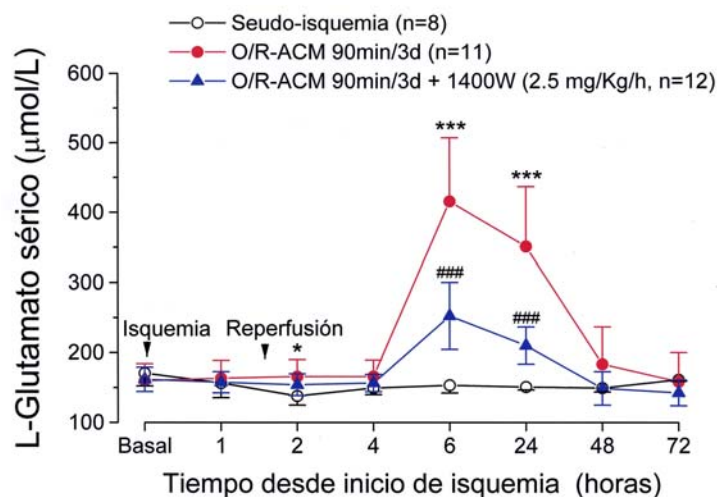


Figura 4.12: Evolución temporal de la concentración de L-glutamato sérico en los grupos pseudo-isquémico e isquémico con y sin tratamiento con 1400W intraperitoneal (2.5 mg/Kg/h). Los valores se expresan en $\mu\text{mol/L}$ y representan la Media \pm Desviación Estándar de la Media (DEM) obtenida en cada tiempo de muestreo a partir de “n” experimentos. Sobre la gráfica se indican los momentos de inicio de **isquemia** y **reperfusión**. El valor basal es el previo a la oclusión.

* y *** Significativamente diferente del grupo pseudo-isquémico, $p < 0.05$ y $p < 0.001$, respectivamente.
 ### Significativamente diferente del grupo O/R-ACM 90 min/3 d (sin tratamiento), $p < 0.001$ (ANOVA para muestras independientes, post-test Student-Newman-Keuls).

4.2.1.6- Expresión de iNOS.

La determinación de la expresión de iNOS por Western-Blot en el tejido cerebral intacto e infartado mostró que la expresión basal de iNOS en la corteza es aproximadamente unas tres veces la del estriado. La expresión de iNOS aumentó tras la inducción de la isquemia, y a las 2 horas del inicio de la isquemia (30 min tras la reperusión) aumentó unas 6 y 3 veces en corteza y estriado, respectivamente. La máxima expresión se observó a las 12 h en el caso de la corteza y a las 24 h en el estriado (14 y 18 veces los respectivos niveles basales). La evolución temporal de la expresión de iNOS se muestra en la **figura 4.13**. Se determinó asimismo la expresión de actina como control interno de la muestra.

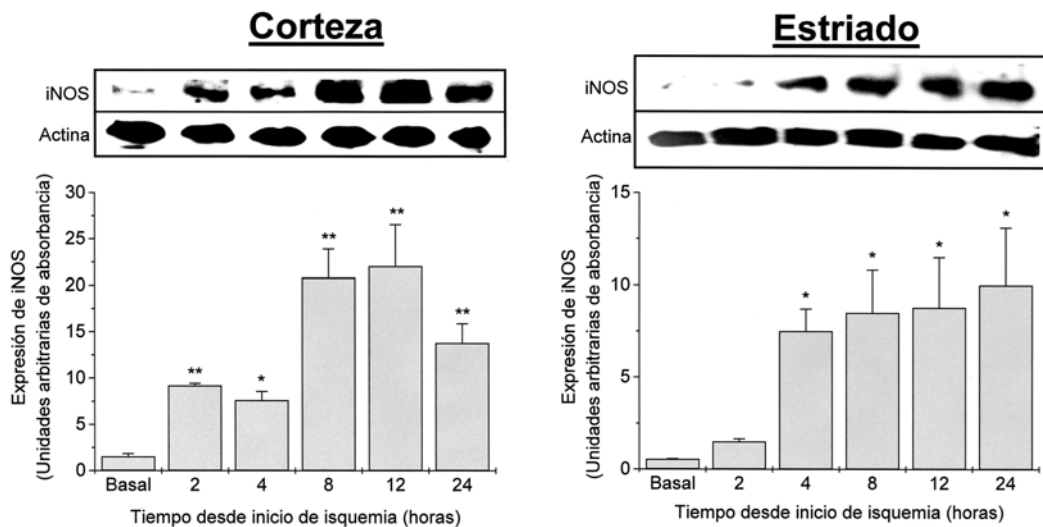


Figura 4.13: Evolución temporal de la expresión de iNOS en corteza y estriado del hemisferio sometido al protocolo de oclusión de 90 min. Los valores se expresan como unidades arbitrarias de absorbancia de las bandas de iNOS del gel, y representan la Media \pm Desviación Estándar de la media (DEM) obtenidas a partir de 3 muestras en cada caso.

* y ** Significativamente diferente del valor basal, $p < 0.05$ y $p < 0.01$, respectivamente. (ANOVA para muestras independientes, post-test Dunnet).

4.2.1.7- Niveles cerebrales de L-glutamato.

En la **figura 4.14** se presentan las concentraciones de L-glutamato extracelular cerebral tras 2, 5-6 y 24 h tras el inicio de la isquemia en los grupos pseudo-isquémico, isquémico e isquémico tratado con 2.5 mg/Kg/h de 1400W i.p. La cantidad de L-glutamato extracelular determinado por microdiálisis a 2, 5-6 y 24 horas, se mantuvo constante tras el inicio de la isquemia en los animales pseudo-isquémicos (14.4 ± 6.6 , 14.0 ± 5.0 y 12.3 ± 1.8 $\mu\text{mol/L}$, respectivamente). La isquemia produjo un incremento en el nivel de L-glutamato extracelular tras la isquemia a las 2 h (23.4 ± 1.5 $\mu\text{mol/L}$), alcanzando su máximo a las 5-6h (30.2 ± 12.2 $\mu\text{mol/L}$, $p < 0.05$) y descendiendo a las 24 h (20.4 ± 8.7 $\mu\text{mol/L}$). El tratamiento con 1400W intraperitoneal no alteró de forma significativa el incremento observado 2 h tras la isquemia (21.0 ± 1.9 $\mu\text{mol/L}$), pero sí lo redujo de forma significativa a las 5-6 h (17.2 ± 9.3 $\mu\text{mol/L}$, $p < 0.05$), manteniéndose en valores similares a los pseudo-isquémicos a las 24 h (14.6 ± 10.4 $\mu\text{mol/L}$).

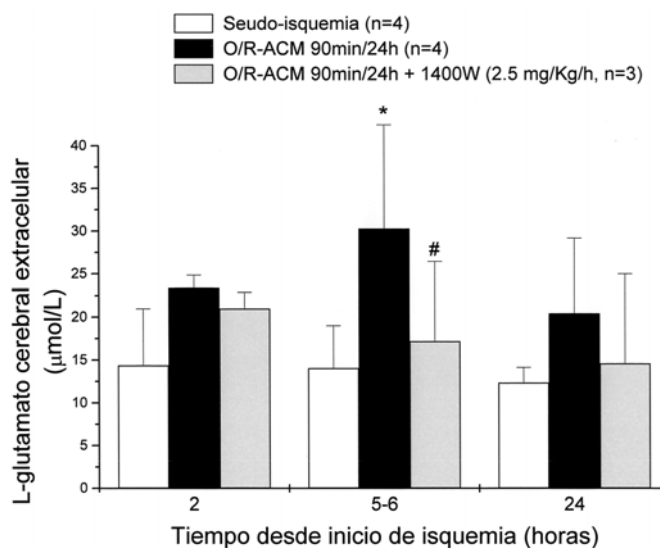


Figura 4.14: Evolución temporal de la concentración de L-glutamato cerebral extracelular en los grupos pseudo-isquémico e isquémico con y sin tratamiento con 1400W intraperitoneal (2.5 mg/Kg/h). Los valores se expresan en $\mu\text{mol/L}$ y representan la Media \pm Desviación Estándar de la Media (DEM) obtenida a las 2 h, 5-6 h y 24 h, respectivamente, a partir de “n” experimentos.

* Significativamente diferente del grupo pseudo-isquémico, $p < 0.05$.

Significativamente diferente del grupo O/R-ACM 90 min/3d (sin tratamiento), $p < 0.05$.

(ANOVA para muestras independientes, post-test Student-Newman-Keuls).

4.2.1.8- Niveles cerebrales de ATP.

En la **figura 4.15** se muestran los niveles de ATP en corteza y estriado de los distintos grupos experimentales a las 4 y 6 h desde el inicio de la isquemia, expresados como porcentaje de los niveles de ATP registrados en el grupo pseudo-isquémico.

El contenido de ATP en la corteza cerebral del grupo pseudo-isquémico (contando ambos hemisferios) fue de 2.0 ± 0.5 $\mu\text{mol/g}$ de proteína. La isquemia seguida de perfusión redujo de forma significativa la cantidad de ATP en la corteza, alcanzando un $58 \pm 6\%$ ($p < 0.05$) y un $45 \pm 3\%$ ($p < 0.05$) del valor en el grupo pseudo-isquémico a las 4 y 6 h, respectivamente, tras el inicio de la isquemia. El tratamiento con 1400W intraperitoneal impidió parcialmente, pero de forma significativa, la reducción de ATP causada por la isquemia a las 4 h ($75 \pm 9\%$, $p < 0.05$), pero no fue capaz de hacer lo mismo a las 6 h ($47 \pm 4\%$).

En el estriado, el contenido de ATP determinado en el grupo pseudo-isquémico (contando ambos hemisferios) fue de 1.8 ± 0.5 $\mu\text{mol/g}$ de proteína. La isquemia no redujo los niveles de ATP a las 4 h ($122 \pm 6\%$), pero sí lo hizo significativamente a las 6 h ($66 \pm 3\%$, $p < 0.05$). El tratamiento con 1400W no afectó al los niveles de ATP a las 4 h ($110 \pm 9\%$), pero previno completamente el descenso observado a las 6 h ($122 \pm 4\%$, $p < 0.05$).

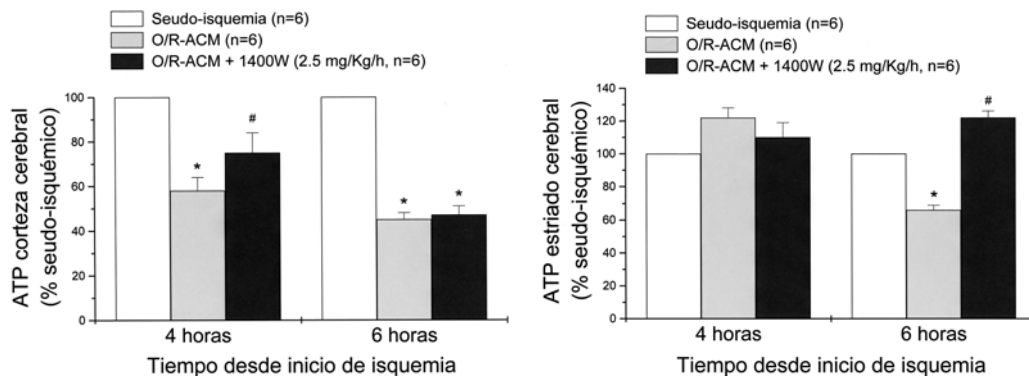


Figura 4.15: Niveles de ATP en corteza y estriado de ratas pseudo-isquémicas, isquémicas sin tratamiento e isquémicas tratadas con 2.5 mg/Kg/h de 1400W intraperitoneal, determinados a las 4 y 6 horas tras el inicio de la isquemia (2.5 y 4.5 horas tras la perfusión). Los valores se expresan como

porcentaje del valor obtenido en el grupo seudo-isquémico (100%) y representan la Media \pm Desviación Estándar de la Media (DEM) obtenida a las 4 y 6 h, respectivamente, a partir de “n” experimentos.

* Significativamente diferente del grupo seudo-isquémico, $p < 0.05$.

Significativamente diferente del grupo O/R-ACM sin tratamiento, $p < 0.05$.

(ANOVA para muestras independientes, post-test Student-Newman-Keuls).

4.2.2- Antioxidante exógeno: Ebselén.

4.2.2.1- Parámetros hemodinámicos y metabólicos.

La administración del antioxidante ebselén por vía oral afectó a los parámetros hemodinámicos estudiados. La reducción de la perfusión cortical al ocluir la ACM fue significativa tanto en el grupo control como en los tratados con 10 mg/Kg y 100 mg/Kg de ebselén, alcanzando valores respecto del control del $32.1 \pm 17.5\%$, $35.6 \pm 20\%$ y $51.0 \pm 21.2\%$, respectivamente. Sin embargo, la perfusión cortical durante las fases de isquemia y reperfusión fue significativamente mayor en el grupo tratado con 100 mg/Kg ebselén que en el grupo control (**figura 4.16**).

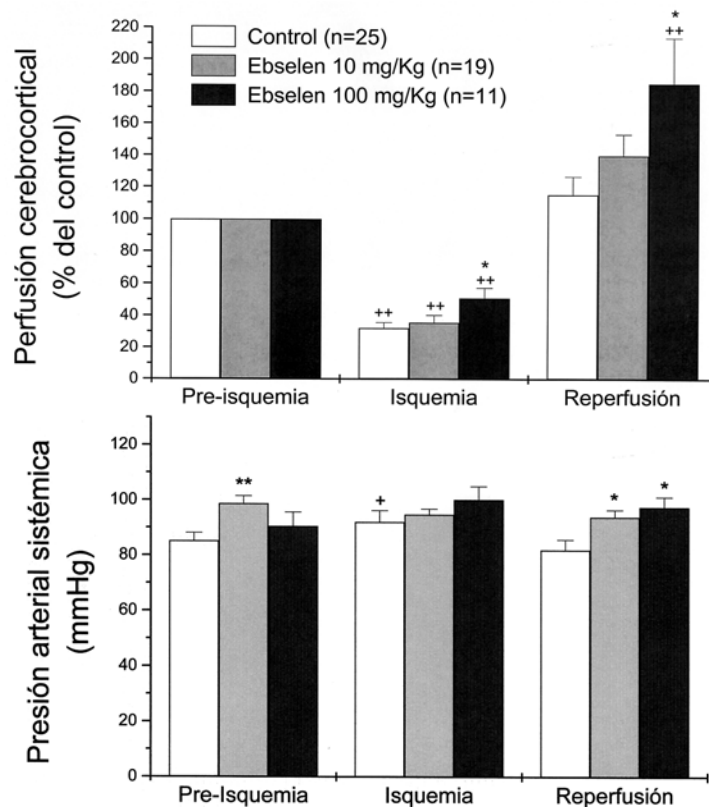


Figura 4.16: Valores de perfusión cerebrocortical (PCC) y presión arterial sistémica (PAS) de los grupos control y tratados con ebselén (10 y 100 mg/Kg) sometidos a isquemia focal transitoria de 90 min. Los valores de PCC y PAS se expresan como porcentaje de la PCC basal y mmHg, respectivamente, y representan la Media \pm Error Estándar de la Media (EEM) de los valores obtenidos en “n” experimentos.

+ y ++ Significativamente diferente de los valores control (pre-isquemia), $p < 0.05$ y $p < 0.01$ (ANOVA para muestras repetidas; post-test Dunnet).

* y ** Significativamente diferente de los valores del grupo control, $p < 0.05$ y $p < 0.01$, respectivamente (ANOVA para muestras independientes; post-test Dunnet).

La PAS en el grupo tratado con 10 mg/Kg de ebselén fue significativamente mayor que la del grupo control antes de la isquemia. Durante la reperfusión, la PAS fue significativamente mayor en ambos grupos tratados con ebselén respecto al grupo control. No hubo diferencias significativas durante la fase de isquemia. En general, la PAS de los grupos tratados fue mayor en todos los casos, aunque los valores se mantuvieron siempre dentro de la normalidad.

Los valores medios de pO_2 , pCO_2 , pH y glucemia arteriales en los tres grupos a lo largo del experimento se presentan en la **tabla 4.4**.

Tabla 4.4: Valores de pO_2 , pCO_2 , pH y glucemia arteriales obtenidos en las diferentes etapas del experimento, en los grupos control y tratados con ebselén (10 y 100 mg/Kg), sometidos a isquemia de 90 min. de duración.

	Pre-OACM (0')			60' OACM		
	Control	Ebs. 10	Ebs. 100	Control	Ebs. 10	Ebs. 100
pO_2 (mmHg)	97.5±23.3	116.6±22.2*	115.8±23.3*	128.5±14.8	113.6±28.0	110.3±21.3
pCO_2 (mmHg)	48.5±11.4	33.1±5.3**	32.5±5.2**	57.5±17.7	39.7±9.1 ⁺	45.2±14.4 ⁺⁺
pH	7.35±0.05	7.42±0.07**	7.46±0.05**	7.28±0.08	7.31±0.16 ⁺⁺	7.35±0.09 ⁺
Glucemia (mg/dL)	102.7±31.5	82.9±20.2*	90.3±18.3	78.5±9.2	71.8±16.5	76.3±13.8
n	14	12	8	14	12	8

	120' OACM			Reperfusión		
	Control	Ebs. 10	Ebs. 100	Control	Ebs. 10	Ebs. 100
	84.4±20.1	108.8±22.6**	118.7±13.7**	92.6±24.6	119.4±24.0	123.5±19.7
	55.0±12.4	38.9±8.0**	42.0±6.6 ^{***}	49.6±20.3	36.8±5.8	40.5±9.3
	7.32±0.06	7.33±0.07 ⁺	7.34±0.06 ⁺	7.30±0.07	7.32±0.03	7.19±0.34 ⁺⁺
	109.5±34.1	75.0±11.9**	74.2±12.8 ^{***}	101.6±47.5	73.8±40.7	80.3±20.8
n	14	12	8	14	12	8

Los valores se expresan en unidades absolutas, y están tabulados como Media ± Desviación Estándar de la Media (DEM) a partir de “n” experimentos. El valor de referencia los tres grupos es el existente previo a la oclusión (pre-OACM).

+ y ++ Significativamente diferente de los valores pre-OACM, $p < 0.05$ y $p < 0.01$, respectivamente (ANOVA muestras repetidas; post-test Dunnet).

* y ** Significativamente diferente de la muestra equivalente en el grupo control, $p < 0.05$ y $p < 0.01$, respectivamente (ANOVA para muestras independientes; post-test Dunnet).

Las diferencias encontradas son las descritas para el modelo de isquemia, con dos salvedades: por un lado las ratas de los grupos tratados con ebselén oral presentaron una menor $p\text{CO}_2$ y mayor $p\text{O}_2$ basales que el grupo control. Estas diferencias en $p\text{CO}_2$ y $p\text{O}_2$ se repitieron a 120 min. tras el inicio de la isquemia. Por otro lado, el pH no se recuperó tras instaurar la reperfusión, especialmente en el caso del grupo tratado con ebselén 100 mg/Kg. La glucemia fue, por lo general, mayor en el grupo control que en los tratados, alcanzando significación estadística en algunas muestras (ebselén 10 mg/Kg pre-OACM y ebselén 10 y 100 mg/Kg 120 min. OACM).

4.2.2.2- Mortalidad.

De los 14 animales del grupo control, 6 murieron antes de alcanzar los 7 días de supervivencia establecidos en el protocolo experimental. En el grupo tratado con la dosis inferior de ebselén oral (10 mg/Kg) la mortalidad postquirúrgica fue de 2 animales sobre un total de 12. En el grupo tratado con la dosis superior de ebselén (100 mg/Kg) la mortalidad postquirúrgica fue de 3 animales sobre un total de 8.

4.2.2.3- Valoración neurológica y volumen de infarto.

La puntuación neurológica obtenida por los animales tratados con la dosis de 100 mg/Kg de ebselén oral fue menor que la obtenida por el grupo control y el grupo tratado con ebselén 10 mg/Kg, tal y como se observa en la **figura 4.17**, aunque no llegó a alcanzar significación estadística. El grupo control obtuvo una puntuación de 2.0 ± 2.0 (Media \pm DEM), y los grupos tratados con ebselén 10 mg/Kg y 100 mg/Kg obtuvieron 2.2 ± 1.9 y 0.8 ± 0.8 , respectivamente.

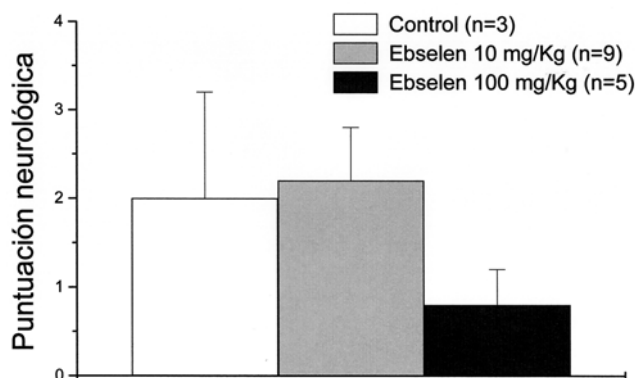


Figura 4.17: Valoración neurológica a los 7 días tras la isquemia focal transitoria del grupo control y los grupos tratados con ebselén (10 y 100 mg/Kg). Los valores se expresan como la puntuación obtenida en el test neurológico, descrito en el apartado 3.3 de la sección de Material y Métodos, y representan la Media \pm Error Estándar de la Media (EEM) a partir de “n” experimentos.

El tratamiento con ebselén oral produjo un ligero descenso dosis-dependiente del tamaño de infarto (26.9% del hemisferio en el grupo sin tratamiento y 25.1% y 22.7% en los grupos tratados con ebselén 10 y 100 mg/Kg, respectivamente), tal y como se observa en la **figura 4.18 izquierda**. Estas diferencias no alcanzaron significación estadística. El volumen de infarto que se obtuvo para el grupo control fue de $191.9 \pm 101.6 \text{ mm}^3$, $188.6 \pm 81.6 \text{ mm}^3$ para el grupo tratado con ebselén 10 mg/Kg, y $157.1 \pm 85.0 \text{ mm}^3$ para el grupo tratado con ebselén 100 mg/Kg. Los volúmenes de los hemisferios contralaterales fueron: $713.2 \pm 99.3 \text{ mm}^3$, $750.9 \pm 71.8 \text{ mm}^3$ y $691.7 \pm 47.9 \text{ mm}^3$, respectivamente. En la **figura 4.18 derecha** se muestra representada la distribución del infarto por secciones. Las mayores diferencias se observan entre el grupo control y el tratado con la mayor dosis de ebselén (100 mg/Kg), en las secciones 3, 4 y 5, pero sin llegar a alcanzar significación estadística. Estas secciones coronales, de 2 mm de grosor, corresponden a los mm 6 a 8, 8 a 10 y 10 a 12, respectivamente, en que se ha dividido el hemisferio.

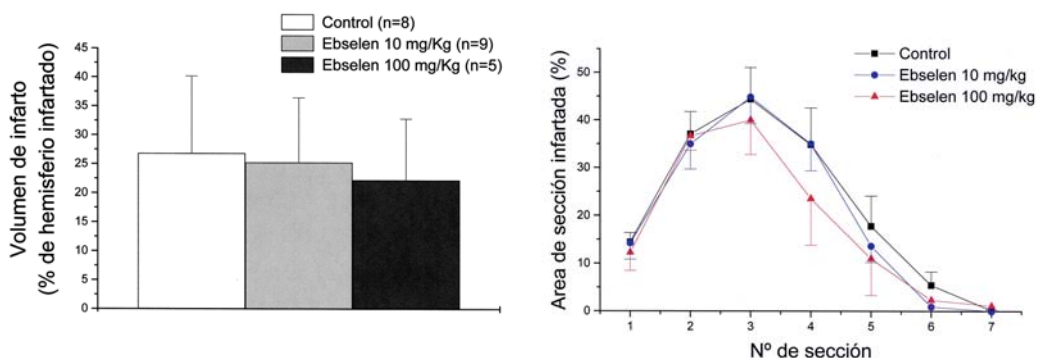


Figura 4.18: Representación gráfica del volumen de hemisferio infartado (izqda.) y la distribución por secciones del tejido infartado (dcha.) en el grupo control y en cada uno de los grupos tratados con ebselén (10 y 100 mg/Kg). Los valores se expresan como porcentaje infartado del hemisferio completo (izqda.) y de cada una de las 7 secciones en que hemos dividido el cerebro (dcha.), y representan la Media \pm Desviación Estándar de la Media (DEM) obtenidas en “n” experimentos.

4.2.2.4- Evolución ponderal.

El peso medio inicial de las ratas sometidas a isquemia fue de 337.2 ± 15.6 g en el grupo control ($n = 16$), 319.6 ± 4.6 g en el grupo tratado con 10 mg/Kg de ebselén ($n = 13$), y 362.6 ± 41.9 g en el grupo tratado con 100 mg/Kg de ebselén ($n = 11$). Tras el implante de las cánulas soporte de la sonda de registro de la PCC, las ratas (en ayunas) de los grupos control y tratados con 10 y 100 mg/Kg de ebselén perdieron entre un 6% y un 3.4% del peso inicial, pesando antes de la inducción de la isquemia el $96.6 \pm 2.2\%$, $94.0 \pm 1.7\%$ y $94.9 \pm 1.2\%$, respectivamente. Al cabo de tres días de evolución desde la inducción de la isquemia, perdieron peso hasta alcanzar el $73.6 \pm 11.1\%$, 81.6 ± 11.1 y $86.5 \pm 9.8\%$, respectivamente, del peso inicial. La pérdida de peso fue inferior en los grupos tratados con ebselén, aunque las diferencias con el grupo control no llegaron a ser significativas.

4.2.2.5- Niveles plasmáticos de selenio.

La evolución temporal de la concentración de selenio en plasma tras la administración de ebselén se muestra en la **figura 4.19**.

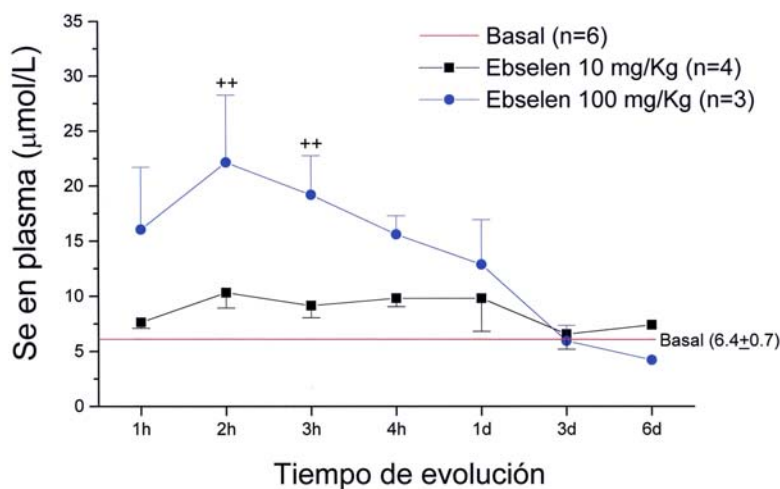


Figura 4.19: Evolución temporal de la concentración de Selenio (Se) en plasma tras la administración del antioxidante ebselén. Los valores se expresan en $\mu\text{mol/L}$ y representan la Media \pm Desviación Estándar de la Media (DEM) obtenida en cada tiempo de muestreo tras la administración del bolo oral a partir de “n” experimentos.

++ Significativamente diferente del valor basal, $p < 0.01$ (ANOVA para muestras independientes; post-test Dunnet).

La administración del excipiente (aceite de oliva) no modificó el nivel de Se en plasma, que fue de $6.4 \pm 0.7 \mu\text{mol/L}$ (Media \pm DEM). La administración de 100 mg/Kg de ebselén por vía oral 1 h antes de la inducción de la isquemia hizo aumentar significativamente la concentración plasmática de selenio hasta alcanzar un valor máximo de $22.1 \pm 10.6 \mu\text{mol/L}$ a las 2 h tras su administración, para disminuir progresivamente hasta alcanzar valores similares a los basales a las 72 h. El valor máximo obtenido con 10 mg/Kg de ebselén, alcanzado también a las 2 h tras la administración, fue de $10.3 \pm 2.8 \mu\text{mol/L}$.

4.2.2.6- Actividad GSH-Px.

La actividad GSH-Px determinada en muestras de cerebro de ratas pseudo-isquémicas sin tratamiento fue de $20.0 \pm 8.8 \text{ nmol de GSH consumido por miligramo de proteína y por minuto (nmol/mg prot./min)}$, y de 20.1 ± 11.8 y $25.7 \pm 9.9 \text{ nmol/mg prot./min}$ en los grupos tratados con 10 y 100 mg/Kg de ebselén, respectivamente. La administración de ebselén no produjo variación significativa de

la actividad, aunque la media obtenida para el grupo tratado con 100 mg/Kg fue un 29% mayor que en el grupo control (**figura 4.20**).

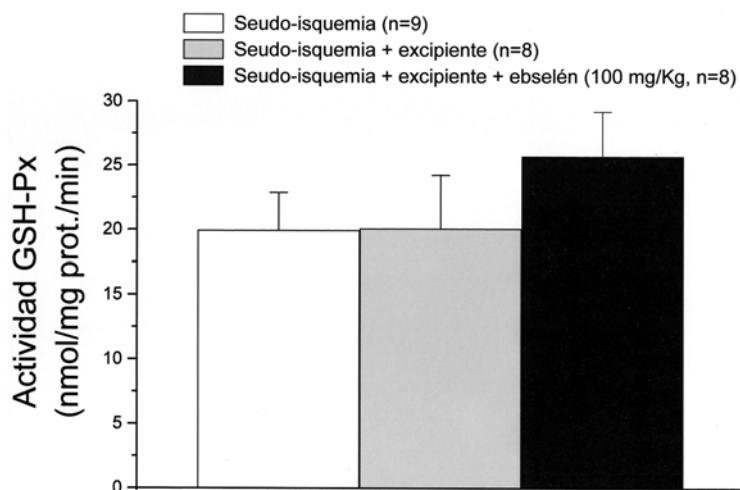


Figura 4.20: Actividad GSH-Px del tejido cerebral en los grupos seudo-isquémico control y seudo-isquémicos tratados con 10 y 100 mg/Kg de ebselén, 1 h tras la administración. Los valores se expresan en nmol de GSH consumido por minuto y normalizado respecto a la cantidad de proteína de la muestra y representan la Media \pm Error Estándar de la Media (EEM) obtenida a partir de “n” experimentos.

4.2.2.7- Niveles de GSH.

La cantidad de GSH obtenida en el hemisferio contralateral a la isquemia, sin y con reperfusión, fue de 17.0 ± 2.4 y 17.4 ± 0.8 nmol por mg de proteína, respectivamente. La isquemia no redujo la cantidad de GSH en el hemisferio ipsilateral de forma apreciable, manteniendo valores muy similares a los del hemisferio contralateral (16.1 ± 1.9 nmol/mg proteína). Sin embargo, tras 1 h. de reperfusión se redujo significativamente la cantidad de GSH en el hemisferio isquémico hasta 13.1 ± 1.6 nmol/mg. proteína, siendo la diferencia significativa con el contralateral y con el isquémico sin reperfusión, tal y como muestra la **figura 4.21**.

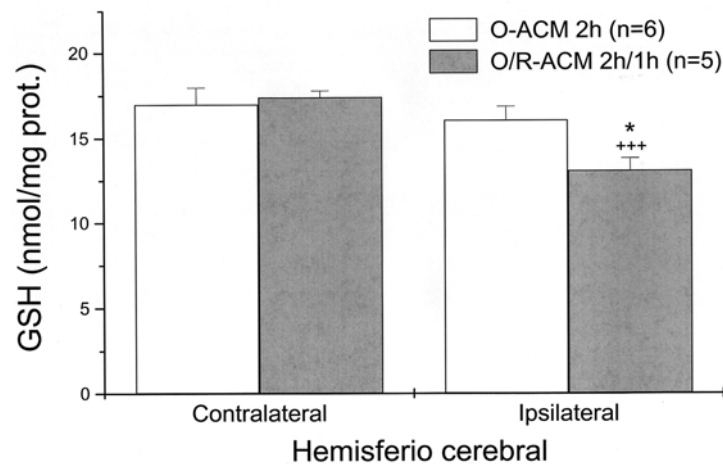


Figura 4.21: Efecto de la reperusión sobre la cantidad de GSH en el tejido cerebral de animales no tratados con ebselén sometidos a una O-ACM de 2 h de duración, sin y con reperusión (1 h). Los valores se expresan en nmol de GSH, normalizados respecto a la cantidad de proteína de la muestra, y representan la Media \pm Error Estándar de la Media (EEM) obtenida a partir de “n” experimentos.

+++ Significativamente diferente del hemisferio contralateral del grupo con reperusión, $p < 0.001$ (test de la t de Student para muestras independientes).

* Significativamente diferente del hemisferio ipsilateral del grupo sin reperusión, $p < 0.05$ (test de la t de Student para muestras independientes).

Los valores de GSH obtenidos en el grupo sometido a isquemia con reperusión tratado con 10 mg/Kg de ebselén para los hemisferios ipsi- y contralateral, fueron de 13.0 ± 3.7 y 17.4 ± 3.1 nmol/mg proteína, respectivamente. En el grupo tratado con 100 mg/Kg, los valores obtenidos fueron de 10.9 ± 2.4 y 15.4 ± 2.3 nmol/mg proteína. El tratamiento con la dosis menor de ebselén no alteró ni la cantidad de GSH en el hemisferio contralateral ni su descenso en el hemisferio sometido a isquemia con posterior reperusión (**figura 4.22**). En el caso de la dosis de 100 mg/Kg, los valores de GSH fueron menores en ambos hemisferios, aunque no llegaron a alcanzar significación estadística en ninguno.

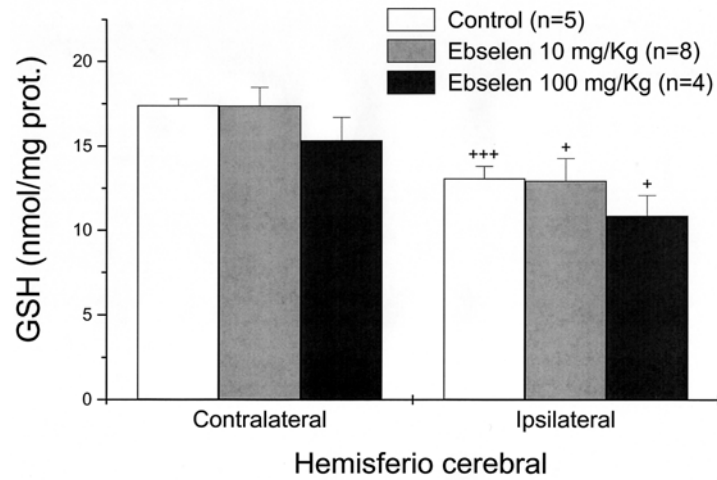


Figura 4.22: Efecto del tratamiento con ebselén sobre los niveles de GSH en los hemisferios ipsilateral y contralateral tras O-ACM de 2h con perfusión (1h). Los valores se expresan en nmol de GSH, normalizados respecto a la cantidad de proteína de la muestra, y representan la Media \pm Error Estándar de la Media (EEM) obtenida a partir de “n” experimentos.

+ y +++ Significativamente diferente del hemisferio contralateral, $p < 0.05$ y $p < 0.001$, respectivamente (test de la t de Student para muestras independientes).

4.2.3- Inhibidor de sPLA₂s: 12-*epi*-scalaradial.

4.2.3.1- Parámetros hemodinámicos y metabólicos.

La administración intracerebroventricular de 12-*epi*-scalaradial (0.005 y 0.5 $\mu\text{g/h}$), no originó diferencias significativas en la perfusión cerebrocortical entre el grupo control y los tratados, ni durante la fase de isquemia ni durante la de reperfusión, tal y como muestra la **figura 4.23**. La presión arterial sistémica no varió debido al tratamiento, manteniéndose siempre en valores en torno a 100 mmHg en los tres grupos en cada una de las fases del experimento.

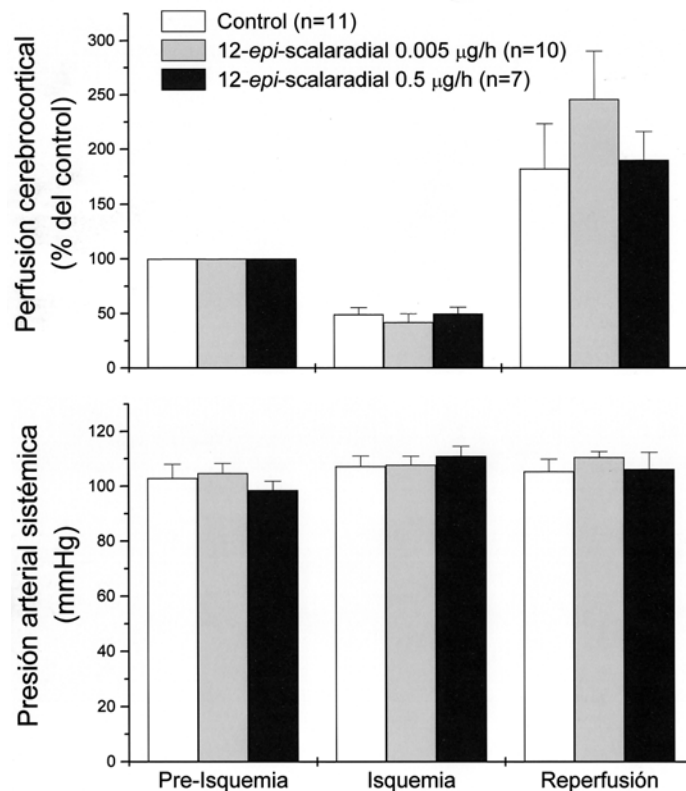


Figura 4.23: Valores de perfusión cerebrocortical (PCC) y presión arterial sistémica (PAS) de los grupos control y tratados con 12-*epi*-scalaradial (0.005 y 0.5 $\mu\text{g/h}$) sometidos a isquemia focal transitoria de 90 min. Los valores de PCC y PAS se expresan como porcentaje de la PCC basal y mmHg, respectivamente, y representan la Media \pm Error Estándar de la Media (EEM) de los valores obtenidos en “n” experimentos.

Los valores medios de pO₂, pCO₂, pH y glucemia arteriales, en los tres grupos a lo largo del experimento se resumen en la **tabla 4.5**. No se observaron

diferencias significativas en los valores de pO₂, pCO₂ y glucemia entre el grupo control y el tratado. Tan sólo se observó una pequeña diferencia significativa en el pH arterial antes de la oclusión (valor de referencia) entre el grupo control y el tratado (7.47 ± 0.04 y 7.52 ± 0.03 , respectivamente). Las diferencias que aparecen dentro de los grupos son las que suceden debido a la isquemia, descritas en el apartado 4.1.1, y que no se ven alteradas debido al tratamiento con 12-*epi*-scalaradial.

Tabla 4.5: Valores de pO₂, pCO₂, pH y glucemia arteriales obtenidos en las diferentes etapas del experimento, en los grupos control y tratados con 12-*epi*-scalaradial (Scl, 0.005 y 0.5 µg/h), sometidos a isquemia de 90 min. de duración.

	Pre-OACM (0')			45' OACM		
	Control	Scl 0.005	Scl 0.5	Control	Scl 0.005	Scl 0.5
pO ₂ (mmHg)	122.6±15.4	119.2±18.0	128.9±19.1	107.0±26.0	100.6±12.8	112.4±21.7
pCO ₂ (mmHg)	29.3±5.8	28.7±3.5	27.7±3.3	36.2±10.0	37.5±4.6	36.4±7.5 ⁺
pH	7.48±0.05	7.50±0.04	7.52±0.03*	7.41±0.06 ⁺⁺	7.40±0.05 ⁺⁺	7.43±0.07 ⁺⁺
Glucemia (mg/dL)	92.0±20.6	79.7±18.7	91.1±17.5	82.3±24.3	71.2±18.4	90.7±24.5
n	12	11	7	12	11	7

	90' OACM			Reperusión		
	Control	Scl 0.005	Scl 0.5	Control	Scl 0.005	Scl 0.5
pO ₂ (mmHg)	116.0±24.9	105.0±21.7	114.6±21.4	125.4±9.8	117.4±11.8	131.6±23.3
pCO ₂ (mmHg)	39.2±9.5 ⁺	40.9±8.5 ⁺	34.7±6.2	31.8±6.0	34.3±6.0	32.7±5.2
pH	7.37±0.07 ⁺⁺	7.36±0.05 ⁺⁺	7.39±0.04 ⁺⁺	7.43±0.05	7.41±0.05 ⁺⁺	7.43±0.03 ⁺⁺
Glucemia (mg/dL)	92.0±25.3	76.5±16.8	77.4±16.4	91.0±20.1	60.7±17.3 ^{***}	80.6±14.9
n	11	11	7	8	11	7

Los valores se expresan en unidades absolutas, y están tabulados como Media ± Desviación Estándar de la Media (DEM) a partir de “n” experimentos. El valor de referencia en los tres grupos es el existente previo a la oclusión (pre-OACM).

+ y ++ Significativamente diferente de los valores pre-OACM, p<0.05 y p<0.01, respectivamente (ANOVA muestras repetidas; post-test Dunnet).

* y ** Significativamente diferente de la muestra equivalente en el grupo control, p<0.05 y p<0.01, respectivamente (ANOVA para muestras independientes; post-test Dunnet).

4.2.3.2- Mortalidad.

La mortalidad postquirúrgica en los tres grupos fue similar. De los 11 animales del grupo control y 11 del grupo tratado con 0.005 $\mu\text{g/h}$ de 12-*epi*-scalaradial murieron 3 y 2, respectivamente, tras la intervención quirúrgica antes de agotar el tiempo de supervivencia establecido en el protocolo experimental. De los 7 animales tratados con 0.5 $\mu\text{g/h}$ de 12-*epi*-scalaradial, 2 murieron tras la cirugía.

4.2.3.3- Valoración neurológica y volumen de infarto.

El estado neurológico de los animales tratados con 12-*epi*-scalaradial no difirió significativamente del estado de los animales control, tal y como se observa en la **figura 4.24**. El grupo control obtuvo una puntuación de 4.1 ± 1.8 (Media \pm DEM), y los grupos tratados con 0.005 y 0.5 $\mu\text{g/h}$ de 12-*epi*-scalaradial i.c.v. obtuvieron una puntuación de 3.1 ± 1.9 y 4.2 ± 1.6 , respectivamente.

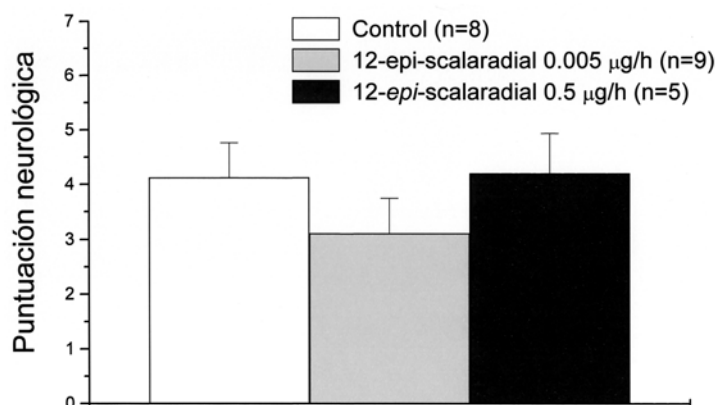


Figura 4.24 Valoración neurológica de los animales de los grupos control y tratados con 12-*epi*-scalaradial (0.005 y 0.5 $\mu\text{g/h}$) a los 3 días de supervivencia tras la isquemia focal transitoria. Los valores se expresan como la puntuación obtenida en el test neurológico, descrito en el apartado 3.3 de la sección de Material y Métodos, y representan la Media \pm Error Estándar de la Media (EEM) a partir de “n” experimentos.

El tratamiento con 12-*epi*-scalaradial produjo un incremento en el tamaño de infarto respecto del grupo control, que pasó de representar el $21.0 \pm 4.1\%$ (Media \pm DEM) del hemisferio en el grupo control a un $22.0 \pm 10.9\%$ y un $28.54 \pm 2.61\%$ en

los grupos tratados con 0.005 y 0.5 $\mu\text{g/h}$ de 12-*epi*-scalaradial, respectivamente, tal y como se muestra en la **figura 4.25 izquierda**. El volumen de infarto en el grupo control fue de $145.9 \pm 24.7 \text{ mm}^3$ y de $164.8 \pm 86.8 \text{ mm}^3$ y $211.5 \pm 12.17 \text{ mm}^3$ (Media \pm DEM) en los grupos tratados con 0.005 y 0.5 $\mu\text{g/h}$, respectivamente. El volumen del hemisferio contralateral fue de $699.2 \pm 56.6 \text{ mm}^3$ en el grupo control y de $739.0 \pm 40.8 \text{ mm}^3$ y $745.18 \pm 66.0 \text{ mm}^3$ en los grupos tratados con 0.005 y 0.5 $\mu\text{g/h}$, respectivamente. Las secciones cerebrales del grupo tratado con 0.5 $\mu\text{g/h}$ de 12-*epi*-scalaradial mostraron una mayor área infartada respecto al grupo sin tratamiento, especialmente en las secciones 4 y 5 donde la diferencia alcanzó significación estadística (**figura 4.25 derecha**).

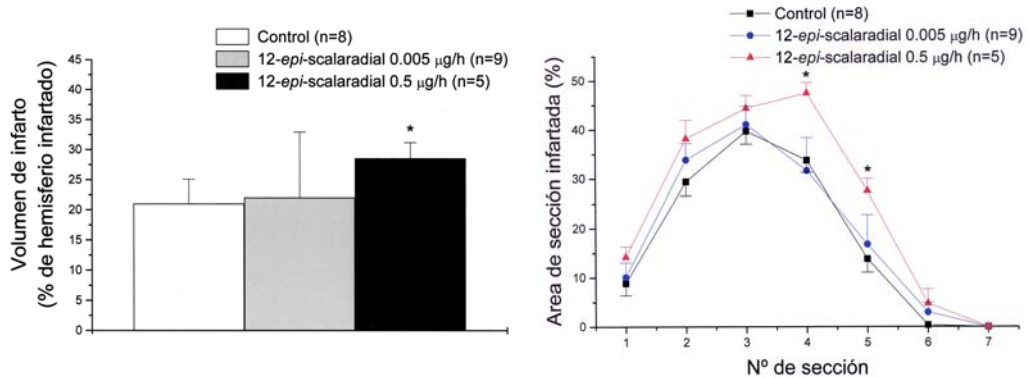


Figura 4.25: Representación gráfica del volumen de hemisferio infartado (izqda.) y la distribución por secciones del tejido infartado (dcha.) en los grupos control y tratados con 12-*epi*-scalaradial. Los valores se expresan como porcentaje infartado del hemisferio completo (izqda.) y de cada una de las 7 secciones en que se ha dividido el cerebro (dcha.), y representan la Media \pm Desviación Estándar de la Media (DEM) obtenidas en “n” experimentos.

* Significativamente diferente del grupo control, $p < 0.05$ (ANOVA para muestras independientes).

4.2.3.4- Evolución ponderal.

El peso medio inicial de las ratas sometidas a isquemia fue de $363.7 \pm 23.2 \text{ g}$ en el grupo control y $350.4 \pm 18.4 \text{ g}$ y $372.6 \pm 15.0 \text{ g}$ (Media \pm DEM) en los grupos tratados con 0.005 y 0.5 $\mu\text{g/h}$ de 12-*epi*-scalaradial, respectivamente. Tras el implante de las cánulas soporte para las sondas de registro de la perfusión cerebrocortical, las ratas (en ayunas) de los grupos control y tratados con ambas dosis de 12-*epi*-scalaradial perdieron entre un 4.7% y un 5.3% del peso inicial,

pesando inmediatamente antes de la inducción de la isquemia un $94.8 \pm 1.3\%$, un $94.7 \pm 1.0\%$ y un $94.8 \pm 0.8\%$ (Media \pm DEM), respectivamente. Al cabo de tres días de evolución, perdieron peso hasta alcanzar el $79.0 \pm 1.6\%$, el $80.8 \pm 3.5\%$ y el $78.7 \pm 1.7\%$ (Media \pm DEM), respectivamente, del peso inicial. No hubo diferencias en la pérdida de peso entre ambos grupos.

4.2.3.5- Determinación de MPO.

Se confirmó visualmente la infiltración leucocitaria en el hemisferio sometido a isquemia mediante la detección inmunohistoquímica del enzima MPO en secciones coronales de $10 \mu\text{m}$ de grosor de ambos hemisferios. Las células marcadas tras tres días de supervivencia aparecen con frecuencia asociadas a las paredes de los vasos sanguíneos y en el parénquima cerebral (**figura 4.26**). En el hemisferio contralateral tan solo aparece esporádicamente alguna célula marcada, así como en las regiones distales al infarto del hemisferio ipsilateral.

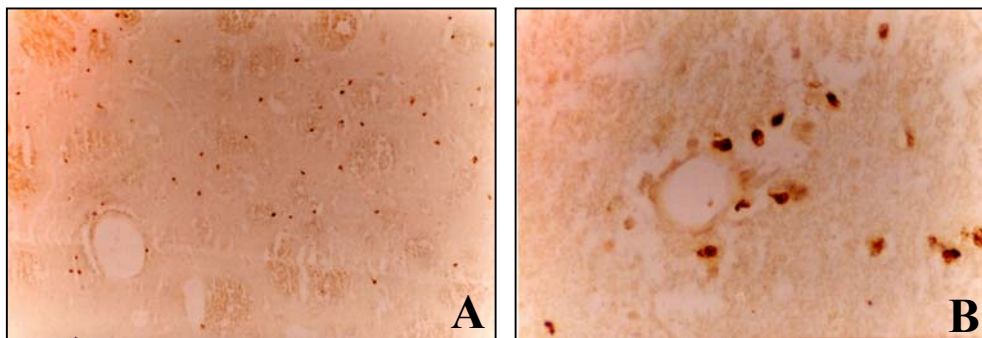


Figura 4.26: Microfotografías del hemisferio ipsilateral a la O/R-ACM tras un episodio isquémico transitorio de 90 minutos y 3 días de evolución. **A:** células inmunopositivas para MPO (de color marrón oscuro) en el estriado (100 aumentos). **B:** Detalle a mayor aumento de células inmunopositivas en las proximidades de un vaso sanguíneo (400 aumentos).

La actividad MPO por gramo de tejido determinada en animales sometidos a isquemia sin tratamiento (Media \pm DEM) fue de 0.28 ± 0.20 y 0.83 ± 0.27 unidades de actividad MPO por gramo de tejido (u.a. MPO/gr) en el hemisferio contralateral e ipsilateral a la isquemia, respectivamente, siendo significativa la diferencia entre ambos hemisferios. El tratamiento con $0.5 \mu\text{g/h}$ de 12-*epi*-scalaradial dio como resultado 0.02 ± 0.03 u.a. MPO/g y

1.65 ± 0.71 u.a. MPO/g, respectivamente, siendo muy significativa la diferencia entre ambos hemisferios. El tratamiento con 12-*epi*-scalaradial originó un incremento significativo de la actividad MPO en el hemisferio sometido a isquemia, tal y como se muestra en la **figura 4.27**.

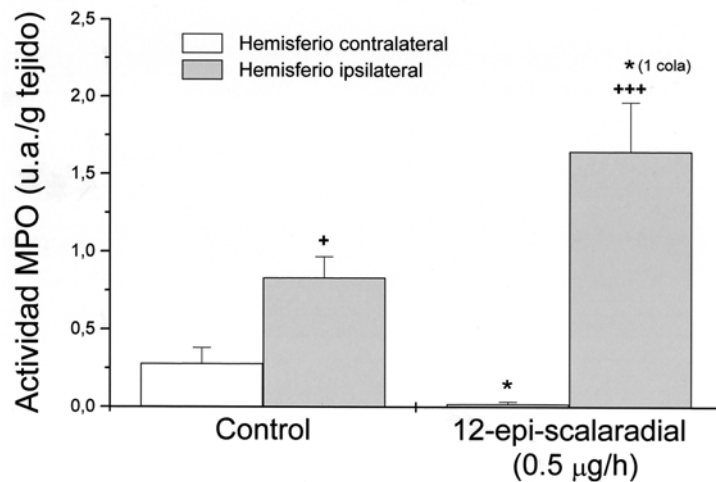


Figura 4.27: Efecto del tratamiento con 12-*epi*-scalaradial intracerebroventricular sobre la actividad MPO en el tejido cerebral sometido a isquemia focal transitoria. Los valores se expresan como unidades de actividad MPO (†) por peso de tejido cerebral, y se representan como Media ± Error Estándar de la Media (EEM) obtenidos a partir del grupo control (n=5) y tratado (12-*epi*-scalaradial, n=5).

+ y +++ Significativamente diferente del otro hemisferio, $p < 0.05$ y $p < 0.001$, respectivamente (test de la *t* para muestras independientes).

* Significativamente diferente del mismo hemisferio del grupo control, $p < 0.05$ (test de la *t* para muestras independientes).

(†) Una unidad de actividad MPO (u.a.MPO) se define como la cantidad de MPO que produce un incremento de 1.0 unidades de absorbancia en un minuto, medido a 470 nm y usando guaiacol como sustrato.

La **figura 4.28** muestra la relación existente entre la actividad MPO determinada en los hemisferios infartados de los grupos control y tratado, y el porcentaje de hemisferio infartado. Ambos grupos constituyen dos poblaciones independientes.

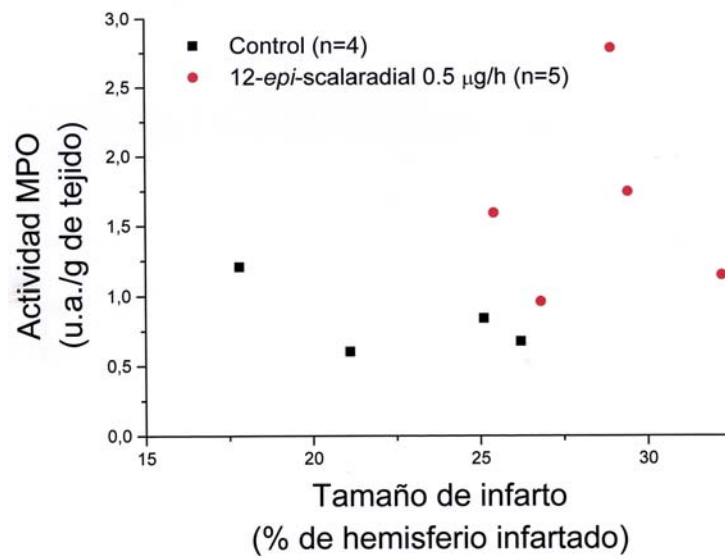


Figura 4.28: Relación entre la actividad MPO en el hemisferio ipsilateral a la agresión isquémica y el porcentaje de hemisferio infartado a los 3 días en los grupos control y tratado, sometidos a un protocolo de O/R-ACM de 90 min/3 d.

Discusión

5.1- MODELOS ANIMALES DE ICTUS: VENTAJAS Y LIMITACIONES.

A excepción de la aplicación de la terapia trombolítica dentro de las tres horas que siguen a la instauración del ictus en un grupo reducido de pacientes, actualmente no existe otro tratamiento eficaz del ictus. Por lo que respecta a los fármacos neuroprotectores, la probada eficacia de muchos de ellos en modelos animales no se ha visto confirmada en la clínica. De hecho, alrededor de 11.000 pacientes han participado en más de 40 ensayos clínicos, sin que en ninguno de ellos se haya obtenido evidencia alguna de su presunto efecto beneficioso (Goldstein, 2004). Las razones por las que ha fracasado el traslado del laboratorio a la clínica pueden ser las siguientes (de Leciñana y cols., 2001; Lestage y cols., 2002; Green y cols., 2003):

1. **Efectos adversos de los fármacos.** Muchas de las sustancias ensayadas no pueden emplearse en humanos a las concentraciones a las que se ha conseguido el efecto máximo en animales debido a los efectos adversos que presentan, como ataxia y sedación principalmente.
2. **Ventana terapéutica, pauta y duración del tratamiento.** La ventana terapéutica es el tiempo durante el cual la administración del fármaco muestra efectividad, y dependerá del curso temporal de los cambios bioquímicos a los que afecte el tratamiento. Muchos de estos cambios ocurren durante los primeros momentos tras la oclusión, y frecuentemente las terapias sólo son administradas a los pacientes transcurridas varias horas tras el inicio de los síntomas. La pauta de administración y la duración del tratamiento deben adecuarse al proceso bioquímico que se quiere afectar, y también deben tenerse en cuenta las diferencias en el metabolismo de los fármacos entre las distintas especies.
3. **Monoterapia.** El daño isquémico es un proceso multifactorial y muchas monoterapias pueden fallar debido a la redundancia de rutas que pueden conducir a la muerte celular. Debido al riesgo de interacciones entre fármacos y de los posibles efectos adversos debidos a sus diferentes cinéticas, es difícil que se aprueben ensayos clínicos que combinen distintas sustancias. Por ello, se hace necesario ensayar monoterapias que afecten a varios puntos de la cascada isquémica en lugar de terapias excesivamente específicas.

4. **Cuantificación de la protección.** Muchos fármacos ensayados clínicamente tienen efectos modestos en cuanto a neuroprotección, lo que ha sido cuestionado por varios autores que consideran precipitado su paso a ensayos clínicos, llevados a cabo en condiciones mucho menos controladas que en modelos animales. Además, el cerebro de rata tiene una proporción de materia blanca muy inferior al humano, siendo el daño en esta materia blanca un componente muy importante del daño isquémico en humanos.
5. **Modelo animal apropiado.** Existen muchas variaciones personales de los modelos principales, sin que ninguna pueda prevalecer claramente debido a la falta de eficacia de los fármacos en ensayos clínicos. Sin embargo, el modelo de oclusión de la ACM con reperfusión es el más aceptado en la actualidad. Los fármacos se han mostrado más efectivos en los casos de isquemia con reperfusión, probablemente debido a que pueden alcanzar la zona afectada o bien interferir en los procesos de daño originado por la propia reperfusión. En el paciente puede originarse o no la reperfusión espontánea tardía, limitándose así la eficacia de los distintos tratamientos, como por ejemplo tirilazad, que sí se han mostrado efectivos en modelos animales de oclusión transitoria. También es cierto que en la mayor parte de los estudios con modelos, éstos se han llevado a cabo con animales sanos y jóvenes, mientras que el sujeto de un estudio clínico suele ser un paciente de edad avanzada y frecuentemente con otras patologías concomitantes.

A causa de lo señalado en el último punto, se ha puesto en duda frecuentemente la capacidad de los modelos animales para predecir la eficacia clínica de los posibles agentes neuroprotectores. Sin embargo, los modelos experimentales continúan siendo necesarios. Los motivos prácticos por los que el uso de modelos animales es imprescindible para el estudio de la fisiopatología y tratamiento de la isquemia cerebral son los siguientes (Ginsberg y Busto, 1989; Ginsberg, 2003; Green y cols., 2003):

1. Los episodios isquémicos en humanos muestran una **gran diversidad** de manifestaciones, causas y localizaciones anatómicas, lo que dificulta el uso de métodos analíticos en estudios clínicos.

2. Para llevar a cabo investigaciones histopatológicas, bioquímicas y fisiológicas es imprescindible recurrir a **procedimientos invasivos** y al acceso directo al tejido cerebral.
3. Los eventos que tienen lugar en los **primeros momentos** de la agresión isquémica sólo pueden ser estudiados en animales de laboratorio.
4. Los modelos in vitro de cortes de tejido o de cultivos celulares carecen de vascularización, lo que impide el **control de la perfusión**, factor clave en todo el proceso isquémico.
5. Los modelos proporcionan evidencias de la **eficacia in vivo** de los presuntos fármacos neuroprotectores.
6. Las variables fisiológicas (glucemia, temperatura, presión arterial, etc.) que pueden afectar al daño isquémico y que muestran correlación con la clínica están controladas, condición indispensable para la **comparación de hipótesis**.

5.2- OCLUSIÓN DE LA ACM MEDIANTE LA TÉCNICA DEL FILAMENTO INTRALUMINAL.

En los modelos de **isquemia focal permanente**, revisados por Ginsberg y Busto (1989), son los animales genéticamente hipertensos (razas SHR y stroke-prone SHR) los más adecuados en cuanto a que desarrollan un mayor tamaño y una menor variabilidad del mismo. Sin embargo, las diferencias morfológicas y fisiológicas respecto a las cepas normotensas hacen que estas razas no sean las más adecuadas para el estudio de terapias neuroprotectoras debido a la posible diferencia en la respuesta a los tratamientos que pudieran mostrar. Dentro de los animales normotensos sometidos a OACM permanente, inducida también mediante variaciones del método de Tamura y cols. (1981), las más adecuadas son las ratas de la raza Fisher-344 ($106 \pm 21 \text{ mm}^3$, Media \pm DEM) y Sprague-Dawley ($99 \pm 33 \text{ mm}^3$), siendo las de la raza Wistar las de mayor variabilidad y menor tamaño de infarto ($62 \pm 30 \text{ mm}^3$). Sin embargo, estudios preliminares llevados a cabo en nuestro laboratorio han permitido seleccionar el modelo de **isquemia focal transitoria** por oclusión de la ACM durante 90 minutos y 3-7 días de reperusión, empleando la

técnica del filamento intraluminal, en ratas de la raza Wistar debido a su mayor homogeneidad en cuanto a tamaño de infarto y reproducibilidad respecto a la raza Sprague-Dawley. Una posible explicación de ello se encuentra en la elevada variabilidad anatómica de la ACM descrita en ratas Sprague-Dawley (Fox y cols., 1993). Nuestros resultados concuerdan con los publicados con anterioridad por Aspey y cols. (2000), que encuentran una homogeneidad similar en cuanto a tamaño de infarto entre las razas Wistar y Fischer-344 y claramente superior a las Sprague-Dawley, tras una isquemia de 2 h de duración y 70 h de reperfusión. Sin embargo, 2 h de oclusión de la ACM en nuestro laboratorio dieron como resultado una mortalidad postquirúrgica cercana al 40%, siendo nula según Aspey y cols. (2000). Reducir el tiempo de la isquemia a 90 min redujo la mortalidad postquirúrgica (25%) sin reducir el tamaño de infarto, aproximándola a la encontrada en la raza Sprague-Dawley (20%) en nuestro laboratorio. Además, dentro de las posibles fuentes de variación, algunos autores han llegado a indicar la existencia de diferencias en la respuesta a la isquemia dentro de la misma raza dependiendo del suministrador, e incluso entre diferentes envíos del mismo suministrador (Pulsinelli y Buchan, 1988), por lo que se hace imprescindible caracterizar previamente a la realización de cualquier estudio, el modelo que se pretende emplear.

El episodio de 90 min. de isquemia y 3 días de reperfusión inducido en las ratas de raza Wistar tuvo como resultado un infarto de $185.7 \pm 100.20 \text{ mm}^3$, lo que representa un $25.3\% \pm 13.8\%$ del volumen del hemisferio cerebral. Aspey y cols. (2000), sometiendo a ratas a un episodio de isquemia de 2 h seguido de 22 ó 70 h de reperfusión, han demostrado que el tiempo de reperfusión incrementa el tamaño del infarto ($151.7 \pm 50.3 \text{ mm}^3$ y $238.0 \pm 20.3 \text{ mm}^3$, respectivamente). Nuestros resultados sitúan el tamaño de infarto en un punto intermedio.

La localización de la sonda láser-Doppler permitió medir la perfusión cortical en el territorio de la ACM en un punto distal a su origen en el polígono de Willis. Se trata, por tanto, de una zona de “penumbra”, alejada de la región intensamente isquémica que constituirá el núcleo del infarto resultante. La oclusión intraluminal de la ACM originó un descenso de la PCC hasta alcanzar valores de media próximos al 40% de la perfusión control mientras duró la oclusión. El descenso de la PCC

ipsilateral fue significativo respecto a la PCC contralateral. La extensión de la lesión isquémica depende fundamentalmente de dos factores: el grado de reducción del FSC y de la duración del episodio isquémico (Hossmann, 1994a; Soriano y cols., 1997). Así, para un determinado período de tiempo de isquemia, el desarrollo y la extensión de la lesión es consecuencia del descenso de la PCC por debajo de un determinado umbral. Los valores de PCC obtenidos en nuestros experimentos concuerdan con lo observado en otros estudios de isquemia focal mediante la oclusión de la ACM, independientemente de la técnica empleada para la medición local de la perfusión (Tamura y cols., 1981; Nagasawa y Kogure, 1989; Dalkara y cols., 1994a; Soriano y cols., 1997).

La retirada del filamento intraluminal originó, por lo general, un rápido ascenso en los valores de PCC hasta alcanzar valores de perfusión superiores a los preisquémicos y a los existentes en el hemisferio contralateral, aunque también se dieron algunos casos en los que el incremento de PCC fue lento e incluso inexistente (fenómeno de “no reflujo”) durante el tiempo de monitorización. Nuestras observaciones están en concordancia con lo hallado en otros trabajos, donde también se ha observado la recuperación de la PCC tras la retirada del filamento ocluyente hasta niveles ligeramente inferiores (Iadecola y cols., 1996) o superiores (Soriano y cols., 1997) a los preisquémicos.

Las dos principales críticas que se le pueden hacer a la técnica del filamento intraluminal son la posibilidad de reperfusión prematura y la inducción de hemorragia subaracnoidea. Schmid-Elsaesser y cols. (1998) indicaron que la monitorización de la perfusión cortical permite tomar rápidamente las medidas oportunas para corregir el primero de los casos, sin que ello afecte al tamaño de infarto resultante, y descartar a los animales del estudio en el segundo. En nuestros experimentos, los casos de hemorragia subaracnoidea severa provocada por la perforación de la ACM al colocar o retirar el filamento ocluyente y comprobados postmortem, fueron esporádicos y se distinguían claramente debido a una caída brusca de la perfusión a niveles inferiores a los existentes durante la oclusión y un elevado incremento casi simultáneo de la presión arterial sistémica. Estos animales fueron descartados del estudio.

Se ha descrito con anterioridad que ciertos anestésicos inhalables, como el isoflurano, tienen efectos neuroprotectores a corto pero no a largo plazo (Kawaguchi y cols., 2000; Warner, 2000; Gelb y cols., 2001). Estos anestésicos volátiles provocan dilatación de las arteriolas (Inoue y cols., 2002) y, en concreto el halotano, incrementa la velocidad del flujo cerebral (Paut y cols., 2000). Además de posibles mejoras en la perfusión cerebral, los anestésicos generales pueden inhibir la generación de RLs disminuyendo el metabolismo oxidativo y previniendo cambios redox en la hemoglobina, así como la elevación de la concentración de glutamato extracelular (Wilson y Gelb, 2002). Observaciones hechas en nuestro laboratorio, utilizando halotano como agente anestésico, muestran un ligero incremento en la PCC ipsilateral en el área de la penumbra durante la fase de oclusión. En el presente estudio se ha observado que este incremento sucede también, y de forma más acusada, tanto en animales pseudo-isquémicos como en el hemisferio contralateral de aquellos sometidos a isquemia. Así, este incremento en la perfusión observado puede deberse, al menos en parte, al empleo de halotano como anestésico, aunque no puede descartarse que también se deba a la ligera acidificación e hipercapnia arteriales observadas durante la oclusión de la ACM, y que revierten a los valores control tras permitir la reperfusión. Sin embargo, esta vuelta del pH y pCO₂ a los valores existentes antes de la oclusión tras permitir la reperfusión no se ve reflejada en la PCC, al menos durante las primeras fases de la reperfusión. Estos cambios en las presiones parciales de los gases y pH podrían deberse, al menos en parte, a los efectos depresores de la anestesia sobre el sistema cardiorrespiratorio. Sin embargo, la monitorización de las presiones parciales de los gases y el pH en sangre, junto a la ventilación mecánica, permiten minimizar estos cambios manteniendo al animal siempre en condiciones óptimas de ventilación. Los cambios observados entre el grupo pseudo-isquémico y el isquémico (mayor acidificación, hipercapnia e hipoxia que el grupo pseudo-isquémico) durante la fase de oclusión tienen su origen, por tanto, en la propia isquemia.

En el caso de la PAS se observó un incremento ligero y transitorio tras la oclusión, así como un ligero descenso también transitorio tras la retirada del filamento. En ambos casos se recuperó la PAS hasta los valores previos a la oclusión

transcurridos unos minutos. No se han encontrado observaciones similares en la bibliografía existente, quizás debido a la generalizada falta de monitorización continua de estos parámetros hemodinámicos y metabólicos.

Para minimizar los efectos de las variaciones interanimales de glucosa en plasma, se mantuvo a los animales en ayunas durante 24 h previo a la inducción de la isquemia.

5.3- EVALUACIÓN DEL POTENCIAL NEUROPROTECTOR.

5.3.1- Inhibidor de iNOS: 1400W.

Está bien documentado que el NO se forma tanto durante como después de la isquemia, y que puede ejercer efectos tanto protectores como deletéreos dependiendo de factores tales como la isoforma de NOS implicada, el tipo celular que lo produce y el momento en que es producido. Así, inmediatamente tras el inicio de la isquemia, el NO liberado desde el endotelio por la activación de la isoforma eNOS es neuroprotector promoviendo fundamentalmente la vasodilatación. Sin embargo, tras la isquemia el NO producido por la sobreactivación de la isoforma neuronal (nNOS) y, de forma más tardía, el NO producido por la expresión de la isoforma inducible (iNOS), contribuyen al daño cerebral (revisado por Moro y cols., 2004). En este sentido, se ha demostrado la expresión tanto de mRNA como de la proteína iNOS tras la isquemia transitoria o permanente en roedores (Iadecola y cols., 1995a; Grandati y cols., 1997), en modelos *in vitro* de isquemia cerebral (Moro y cols., 1998; Cárdenas y cols., 2000b, 1998), y se ha confirmado su expresión en infartos cerebrales en humanos (Forster y cols., 1999). La iNOS es capaz de sintetizar NO en grandes cantidades y durante largos períodos de tiempo, lo que la hace probablemente la isoforma involucrada en los mecanismos de neurotoxicidad y daño cerebral tras la isquemia cerebral (revisado por Alderton y cols., 2001).

La inhibición de la síntesis de NO mediante inhibidores de la NOS ha sido una de las alternativas farmacológicas investigadas para el tratamiento de la isquemia cerebral. La administración de inhibidores no selectivos ha conducido a resultados diversos, tanto en modelos de isquemia permanente como transitoria (Nishikawa y cols., 1993; Ashwal y cols., 1994; Hamada y cols., 1995; Quast y cols., 1995), lo que

ha dirigido la búsqueda hacia el uso de inhibidores selectivos de las distintas isoformas de NOS (eNOS, nNOS e iNOS).

Por otra parte, la participación del glutamato en la fisiopatología de la isquemia cerebral está ampliamente documentada. En la fase temprana tras la interrupción del FSC, se produce un déficit de oxígeno y glucosa en el tejido cerebral que origina, a su vez, la disminución de los niveles de ATP (Madl y Burguesser, 1993). Como consecuencia se produce la inversión en el funcionamiento de los transportadores neuronales de glutamato (Jabaudon y cols., 2000; Rossi y cols., 2000) y éste se acumula en el espacio extracelular sobreactivando sus receptores, principalmente los del tipo NMDA (Choi y Rothman, 1990; Beal, 1992; Castillo y cols., 1996). Esta sobreactivación determina, a su vez, la progresión del accidente cerebrovascular isquémico y el subsiguiente deterioro neurológico (Castillo y cols., 1997; Dávalos y cols., 1997; Serena y cols., 2001). Sin embargo, tras la reperfusión algunos mecanismos son capaces de provocar también un descenso en los niveles de ATP, y con ello la subsiguiente liberación de glutamato. Por ejemplo, el NO es capaz de provocar el descenso de ATP a través de diversos mecanismos como la inhibición de la respiración mitocondrial, inhibición de la glicólisis a nivel de la gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa, y la activación de la poli-ADP ribosa polimerasa (Bolaños y Almeida, 1999; Cooper, 1999; Bal-Price y Brown, 2001; Brown y Borutaite, 2002; revisado por Stewart y Heales, 2003).

La hipótesis evaluada en el presente estudio es que el NO producido por la iNOS tras la isquemia origina el descenso en los niveles de ATP, lo cual, a su vez, provoca la liberación tardía de glutamato. Esta secuencia podría contribuir a la progresión del infarto. Para evaluar dicha hipótesis se ha utilizado el inhibidor de iNOS 1400W. En contraste con aminoguanidina, un inhibidor de la iNOS usado como neuroprotector en isquemia focal en ratas que también inactiva a las isoformas constitutivas de NOS (Iadecola y cols., 1995b; Wolff y Lubeskie, 1995; Iadecola y Ross, 1997), 1400W es un inhibidor irreversible (o reversible pero extremadamente lento en su liberación) de la iNOS. Más aún, la concentración fisiológica de L-arginina es capaz de revertir la débil inhibición que el 1400W puede ejercer sobre las

isoformas constitutivas (eNOS y nNOS) sin afectar a su efecto inhibitor sobre la actividad iNOS (Garvey y cols., 1997).

La administración crónica de 1400W por vía intracerebroventricular (1.5, 5 y 15 $\mu\text{g/h}$) ha resultado neurotóxica. Un 80% de los animales a los que se administró la dosis de 15 $\mu\text{g/kg}$ murieron tras el implante de la cánula de administración intracerebroventricular, mientras que un 83% de los de las dosis inferiores (en conjunto) lo hicieron tras la isquemia. El traumatismo cerebral que supone el implante de la cánula intracerebroventricular no parece ser la causa de este efecto deletéreo, ya que los animales control con infusión de solución salina fisiológica no presentaron tamaños de infarto e índice de mortalidad superiores a los de los animales sin el implante sometidos a isquemia (de hecho fueron ligeramente inferiores). 1400W deriva de bis-isotioureas, pero es mucho menos tóxico que ellas, tolerando bien infusiones intravenosas de 120 mg/kg/día en rata (Garvey y cols., 1997). Posiblemente, la administración intracerebroventricular directa de 1400W hace que se alcancen concentraciones locales muy elevadas del fármaco en el tejido cerebral, que pueden a inhibir a la isoforma endotelial de la NOS, pese a ser mucho menos afín como inhibidor de esta isoforma, y con ello agravar el infarto resultante tras la isquemia. Sin embargo, no deben descartarse otros mecanismos neurotóxicos desconocidos, como pone de manifiesto el hecho de que los animales que recibieron mayor dosis murieran a las pocas horas del implante de la cánula i.c.v., sin habérseles inducido la isquemia.

El resto de animales empleados en el presente estudio recibieron 2.5 mg/kg/h de 1400W intraperitonealmente. Esta dosis es equivalente a la usada en estudios previos (Parmentier y cols., 1999; Armengou y cols., 2003). Nuestros resultados muestran el efecto beneficioso de 1400W en términos de disminución tanto del volumen de infarto como del déficit neurofuncional, un efecto concomitante con la inhibición de la liberación de glutamato y la disminución de los niveles de ATP producidos por la isquemia.

La administración intraperitoneal de 1400W no provocó alteraciones en las variables hemodinámicas cerebrales y sistémicas (PCC y PAS). Otros autores han descrito que determinados inhibidores no selectivos de la NOS como N^o-nitro-L-

arginina metil éster (L-NAME), acetato de N^ω-metil-L-arginina (L-NMMA) y L-N⁵-(1-iminoetil) ornitina (L-NIO), provocan bradicardia, aumento de la PAS y disminuyen el diámetro de las arterias piales y del FSC de forma dosis-dependiente (Rees y cols., 1990; Prado y cols., 1992). Nuestros resultados son compatibles con el hecho de que 1400W no parece influir en la actividad de la isoenzima eNOS, la cual participa en la regulación del tono arterial. Los valores relativos de PCC durante las fases de isquemia y de reperfusión fueron prácticamente idénticos entre los grupos control y tratado con 1400W. La PAS tampoco varió entre ambos grupos, manteniéndose siempre entorno a los 100 mmHg de media.

Aunque la pérdida de peso fue ligeramente inferior en los animales tratados con 1400W que en el grupo control, lo que evidenciaría un mejor estado de los animales, las diferencias no llegaron a ser significativas.

En nuestro modelo de isquemia cerebral focal transitoria la iNOS se expresa a las 2-4 horas tras el inicio de la isquemia, alcanzando su máximo a las 12-24 horas. Estos datos concuerdan con los obtenidos previamente por otros investigadores (Iadecola y cols., 1995a). Nuestros resultados han puesto de manifiesto la expresión de iNOS tanto en corteza como en estriado. La expresión de iNOS en el estriado es menor y se encuentra retrasada en comparación con la de la corteza, probablemente debido a la menor y más tardía síntesis proteica general descrita en estudios previos realizados en ratas sometidas a 90 min de OACM y 72 h de reperfusión (Kokubo y cols., 2003). Abe y cols. (1988) pusieron de manifiesto que las diferencias entre ambas áreas no son debidas a diferencias en la perfusión durante las fases de isquemia y reperfusión, lo que pone de manifiesto una susceptibilidad a la isquemia distinta entre ambas áreas, mayor en el caso del estriado.

Como se ha comentado en párrafos anteriores, está bien documentado que NO, ONOO⁻ y determinados fármacos dadores de NO, pueden causar disminución de ATP a través de diversos mecanismos. Teniendo en cuenta que es un inhibidor específico de la iNOS, es probable que el 1400W ejerza su efecto neuroprotector inhibiendo la síntesis de NO y la subsiguiente depleción de ATP mediada por NO tras la isquemia. En este sentido, se ha observado que las estrategias que reducen o retrasan el descenso de ATP tienen efecto neuroprotector (Kass y Lipton, 1989;

Bickler y Buck, 1996; Riepe y cols., 1997; Cárdenas y cols., 2000a; Galeffi y cols., 2000; Moro y cols., 2000; De Cristóbal y cols., 2001, 2002; Largeron y cols., 2001; Hurtado y cols., 2003). En el presente trabajo se ha puesto de manifiesto que el tratamiento postisquémico con 1400W induce una recuperación parcial de los niveles de ATP tras el descenso tardío de este nucleótido originado por la isquemia. Este efecto sucede a las 4 h en la corteza y a las 6 en el estriado, de acuerdo con el transcurso temporal de la expresión de iNOS. Posiblemente, otros mecanismos distintos a la expresión de iNOS deben ser responsables del descenso aún más tardío del ATP cortical, ya que el 1400W no pudo contrarrestarlo.

Es bien conocido que el aminoácido excitador glutamato juega un papel predominante en la patogénesis del daño cerebral isquémico (Choi y Rothman, 1990; Beal, 1992; Castillo y cols., 1996). La liberación inicial de glutamato inducida por la isquemia severa ocurre rápidamente y es debida fundamentalmente al funcionamiento inverso de los transportadores neuronales de glutamato (Jabaudon y cols., 2000; Rossi y cols., 2000). Este funcionamiento inverso ocurre cuando los gradientes iónicos a través de la membrana plasmática se ven alterados debido al descenso en los niveles de ATP tras la isquemia (Madl y Burgesser, 1993; Santos y cols., 1996; de Cristóbal y cols., 2001). Adicionalmente, ha sido descrita una segunda y retrasada elevación de glutamato que posiblemente contribuye a la progresión del daño cerebral (Matsumoto y cols., 1996; Taguchi y cols., 1996; Mori y cols., 2004). De forma consistente con esto, hemos encontrado que el 1400W disminuye la elevación tardía de los niveles extracelulares de glutamato en el estriado tras la isquemia, determinados por microdiálisis, tal y como se esperaba según su efecto inhibitorio sobre la actividad iNOS. Pese a que no se midieron los niveles corticales de glutamato, se ha descrito una elevación secundaria a las 5 horas tras la isquemia focal transitoria en rata (Mori y cols., 2004), de acuerdo con el transcurso temporal de la expresión de iNOS y el descenso de ATP observados en el presente estudio. De acuerdo con esto, Hurtado y cols. (2003) han encontrado que las sustancias que son capaces de reducir el descenso en los niveles de ATP también inhiben el aumento en los niveles de extracelulares de glutamato. Resultados previos de otros investigadores muestran que los dadores de NO son capaces de inducir la

liberación de glutamato tanto en preparaciones *in vivo* como *in vitro* (Takita y cols., 1997; Trabace y Kendrick, 2000; Bal-Price y Brown, 2001). Por último, el hecho de que agentes que inhiben la síntesis astrocítica de la proteína S-100 β , inductora de la sobreexpresión de iNOS, son capaces también de disminuir el incremento tardío de los niveles extracelulares de glutamato (Mori y cols., 2004), aporta una evidencia más a favor de nuestra hipótesis.

En humanos, la presencia de concentraciones elevadas de metabolitos del NO en el LCR durante la primera hora del accidente cerebrovascular agudo predice la degeneración neurológica temprana (Castillo y cols., 2000). La sensibilidad de los métodos para la detección de los metabolitos de NO en el plasma no permite su determinación tras el accidente cerebrovascular, impidiendo su utilización como un marcador útil del daño cerebral mediado por NO. Sin embargo, recientemente se ha demostrado que los niveles plasmáticos de L-arginina, el sustrato para la generación de NO, descienden tras la isquemia en pacientes, obteniéndose correlación inversa con el tamaño de infarto de forma que son significativamente inferiores en pacientes que sufrirán deterioro neurológico temprano. Estos mismos resultados se han observado en ratas sometidas a isquemia focal permanente, siendo minimizados con la administración postisquémica de 1400W (Armengou y cols., 2003). En nuestro modelo de isquemia focal transitoria, la administración de 1400W también inhibe parcialmente el descenso de los niveles de L-arginina en plasma, lo que sugiere, por una parte, que dicho descenso se debe a la generación de NO tras la inducción de la actividad iNOS, y por otra que la determinación de los niveles de L-arginina en sangre puede ser útil para evaluar los efectos neurotóxicos de la generación de NO. Los datos existentes en la literatura indican que la administración de L-arginina puede tener un efecto neuroprotector cuando se realiza antes de las 2 h desde el inicio de la isquemia, pero incrementa el volumen de infarto si la administración se retrasa 24 h (Iadecola y cols., 1995b; Zhang y cols., 1995). Estos resultados apoyan nuestra hipótesis acerca del efecto deletéreo del NO producido de forma tardía.

La determinación de los niveles plasmáticos de L-glutamato muestra que los niveles de este aminoácido se encuentran aumentados en sangre, incluso a tiempos posteriores que en el tejido cerebral. La inhibición del incremento de los niveles

plasmáticos de glutamato con 1400W sugiere que dicho incremento procede de la liberación cerebral de glutamato inducida por la isquemia focal, posiblemente debido a la alteración de la BHE, y pone de manifiesto su posible utilidad como marcador para la detección temprana de aquellos pacientes con infarto agudo susceptibles de sufrir deterioro neurológico temprano tras el inicio de la isquemia. Los datos obtenidos en este estudio sugieren que la depleción de ATP mediada por iNOS puede ser uno de los mecanismos que contribuya al deterioro neurológico temprano, suceso que ocurre en un 20-40% de los accidentes cerebrovasculares agudos y que sufren de una peor prognosis, y en los cuales se ha demostrado una elevación mantenida de glutamato (Castillo y cols., 1997; Dávalos y cols., 1997; Serena y cols., 2001). Los datos obtenidos en este estudio muestran que el efecto protector de 1400W tanto en la depleción de ATP, elevación de los niveles cerebrales de glutamato, disminución de los niveles de L-arginina en sangre, así como de la elevación de los niveles de L-glutamato en sangre, es parcial. Una causa importante de la disminución tardía de ATP tras la isquemia parece ser, por lo tanto, el NO liberado por la iNOS. Sin embargo, no puede descartarse una contribución del NO sintetizado por la nNOS, isoforma constitutiva que también media el daño neuronal tras la isquemia cerebral (revisado por Moro y cols., 2004) y que no se inhibe con inhibidores selectivos de la iNOS. La inhibición selectiva de la nNOS neuronal provoca, en todos los trabajos consultados, disminución del volumen de infarto tras isquemia cerebral permanente o transitoria (Yoshida y cols., 1994; Nagafuji y cols., 1995; Zhang y cols., 1996; Escott y cols., 1998). Estos resultados concuerdan con el hecho de que en ratones carentes de esta isoforma, el tamaño del infarto tras isquemia cerebral permanente es menor que en ratones normales (Huang y cols., 1994; Hara y cols., 1996). Todas estas evidencias apoyan el interés de evaluar la eficacia terapéutica de la combinación de inhibidores selectivos para ambas isoformas (nNOS e iNOS), una estrategia que quizá pueda aumentar la protección celular frente al accidente cerebrovascular isquémico.

En resumen, nuestros datos indican que la oclusión transitoria de la ACM induce la expresión de iNOS en el cerebro y la sobreproducción tardía de NO, fenómeno que a su vez media la depleción de ATP y la liberación de glutamato. Esta

secuencia podría contribuir al desarrollo del infarto, lo que comportaría importantes implicaciones terapéuticas. El efecto neuroprotector de 1400W, junto con el conocido efecto protector del uso de oligonucleótidos antisentido frente al gen de la iNOS (Parmentier-Batteur y cols., 2001), así como los resultados obtenidos con ratones knockout deficientes para la iNOS (Iadecola y cols., 1997), confirman que la producción de NO a partir de la iNOS contribuye al daño producido por la isquemia cerebral y confirma la posible utilidad de la determinación de L-arginina y L-glutamato en plasma como marcadores del daño producido por la isquemia/reperfusión (Armengou y cols., 2003).

5.3.2- Antioxidante exógeno: Ebselén.

Está generalmente aceptado que determinados RLs y especies reactivas del oxígeno están implicados en la fisiopatología de la isquemia cerebral, especialmente tras la reperfusión espontánea o trombolítica. Esta afirmación se sustenta tanto en estudios en los que se ha medido directamente la producción de RLs en el tejido cerebral (Peters y cols., 1998; Mori y cols., 1999), como en estudios que han proporcionado evidencias indirectas basadas, por un lado en los efectos deletéreos que los RLs y las especies reactivas del oxígeno producen en las macromoléculas celulares, y por otro lado en el uso de animales transgénicos y knockout con niveles de enzimas prooxidantes y antioxidantes alterados (Oliver y cols., 1990; Polidori y cols., 1998; Chan, 2001). Tanto las moléculas secuestradoras de RLs (p. ej. ácido ascórbico, α -tocoferol, etc.), como las enzimas antioxidantes (p. ej. superóxido dismutasa, catalasa y glutatión peroxidasa) tienen funciones detoxificantes durante el funcionamiento celular normal (Matés, 2000). Sin embargo, la reoxigenación súbita durante la reperfusión postisquémica induce la sobreproducción de EROs y RLs, la inactivación de las enzimas antioxidantes y el consumo de los antioxidantes endógenos, lo que conduce al daño cerebral mediante el daño directo a las macromoléculas celulares (lípidos, proteínas, ácidos nucleicos), así como a la activación de rutas de transducción de señales características del estrés oxidativo (Chan, 2001).

Las terapias antioxidantes empleadas en el tratamiento de determinadas enfermedades neurológicas agudas y crónicas se basan en el uso de diferentes tipos de antioxidantes, bien de origen endógeno, bien exógenos (naturales) o bien sintéticos (Delanty y Dichter, 2000). Las principales limitaciones del empleo de enzimas antioxidantes endógenas son su gran tamaño, lo que restringe su permeabilidad celular, su corta vida media circulante, su antigenicidad y también su precio (Cuzzocrea y cols., 2001). Por el contrario, con el uso de antioxidantes no enzimáticos y de bajo peso molecular se puede lograr una buena penetración a través de la BHE (Gilgun-Sherki y cols., 2001).

La hipótesis evaluada en el presente estudio es que la isquemia cerebral transitoria es capaz de eliminar la actividad peroxidasa endógena, y con ella una de las principales defensas antioxidantes frente al daño producido por los RLs y EROs producidos durante la isquemia/reperfusión. Para evaluar dicha hipótesis se ha utilizado el compuesto mimético de la glutatión peroxidasa ebselén.

El ebselén es un compuesto selenoorgánico, lipofílico y de pequeño tamaño, con actividad mimética de la glutatión peroxidasa y capaz de reaccionar directamente con el ONOO⁻ y de inhibir a enzimas prooxidantes, entre otras actividades (Parnham y Sies, 2000). Estudios previos han puesto de manifiesto la eficacia neuroprotectora del ebselén, evaluada histológicamente 4 h tras isquemia focal transitoria (Dawson y cols., 1995), 24 h tras isquemia focal permanente (Takasago y cols., 1997), y 24 h tras un episodio de hipoxia/isquemia (Knollema y cols., 1996). Estos resultados motivaron al Japanese Ebselen Study Group a llevar a cabo ensayos clínicos que han mostrado efectos beneficiosos en el tratamiento del accidente cerebrovascular isquémico (Yamaguchi y cols., 1998) y en la oclusión aguda de la ACM (Ogawa y cols., 1999). Estudios posteriores en roedores y conejos han mostrado la eficacia neuroprotectora de una formulación intravenosa del ebselén tras isquemia cerebral focal (Imai y cols., 2001, 2003; Lapchak y Zivin, 2003), así como efectos antineuroapoptóticos tras una isquemia focal relativamente poco severa (30 min) (Namura y cols., 2001). Los tiempos de supervivencia de los animales establecidos en estos estudios han sido relativamente cortos (Dawson y cols., 1995; Takasago y cols., 1997; Imai y cols., 2001, 2003; Lapchak y Zivin, 2003), y las agresiones

isquémicas relativamente moderadas (Namura y cols., 2001). Evidencias obtenidas en cultivos neuronales parecen indicar la necesidad de las células de disponer de capacidad antioxidante durante los primeros momentos (24 h) tras la agresión que induce el estrés oxidativo y la neurotoxicidad mediada por glutamato (explantación e inicio del cultivo), mientras que los tratamientos prolongados con antioxidantes no alteran la supervivencia normal de las células (Perry y cols., 2004). En el presente estudio se ha combinado una isquemia más severa (2 h de oclusión) con un tiempo de reperfusión/supervivencia más prolongado (7 días) para ensayar el posible efecto neuroprotector mantenido del ebselén administrado en forma de bolo oral (10 y 100 mg/kg). Tras la isquemia se determinaron los niveles cerebrales de glutatión reducido (GSH) como marcador del estrés oxidativo, además de la actividad glutatión peroxidasa, niveles de selenio en plasma, volumen de infarto y estado neurológico de los animales.

En cuanto a los posibles efectos hemodinámicos de ebselén, se puso de manifiesto que durante la oclusión de la ACM la reducción de la PCC fue menor en los animales tratados con la dosis más alta de ebselén (100 mg/kg) que en los grupos control y tratado con la dosis más baja (10 mg/kg). De modo similar, la PCC durante la reperfusión fue mayor en el primero de estos tres grupos que en los dos restantes. La presión arterial, pese a ser ligeramente superior en los dos grupos tratados, se mantuvo siempre dentro de valores considerados como normotensos.

Aunque el ebselén ha sido propuesto como una sustancia segura en ensayos clínicos (Yamaguchi y cols., 1998), en el presente estudio se han monitorizado pH, pCO₂, pO₂ y glucemia en muestras de sangre arterial con el fin de registrar la aparición de posibles efectos indeseables. Se objetivaron ligeras alcalosis, hipocapnia, hiperoxia e hipoglicemia asociadas al tratamiento con ebselén. Estos efectos son aparentemente beneficiosos, por oposición a los efectos deletéreos descritos para situaciones de acidosis, hipercapnia, hipoxia e hiperglicemia. Sin embargo, considerados en conjunto no parece probable que la magnitud de los cambios metabólicos inducidos por el tratamiento con ebselén tenga relevancia patológica, tal y como han descrito otros autores (Knollema y cols., 1996; Takasago

y cols., 1997; Imai y cols, 2001). De hecho, estas variaciones no han contribuido a mejorar o empeorar el resultado de la isquemia en el presente estudio.

El resultado más relevante obtenido es que el ebselén no fue capaz de reducir el tamaño de infarto resultante cuando se siguió el protocolo establecido. El ebselén se administró 1 h antes de la inducción de la isquemia en base a las referencias bibliográficas sobre la efectividad a corto plazo (hasta 24 h) de tratamientos monodosis similares (Dawson y cols., 1995; Knollema y cols, 1996; Kondoh y cols., 1999; Lapchak y Zivin, 2003). La administración oral en ratas después de un periodo de ayuno de 24 h permite, teóricamente, que el ebselén sea absorbido a nivel intestinal y atraviese la BHE para alcanzar el tejido cerebral en el momento de máximo estrés oxidativo tras el inicio de la reperfusión. Puesto que el ebselén es un compuesto selenoorgánico, sus niveles plasmáticos se estimaron midiendo los niveles plasmáticos de selenio. Rápidamente tras la administración (1 h), los niveles plasmáticos de selenio aumentaron significativamente por encima de los niveles endógenos. Suponiendo que el selenio basal, principalmente asociado a proteínas plasmáticas (selenoproteína, glutatión peroxidasa y albúmina) (Ducros y cols., 2000) permanece constante, el incremento de selenio plasmático se debe con toda probabilidad a la absorción del ebselén. Restado el nivel basal de selenio, las concentraciones plasmáticas estimadas de ebselén para la dosis mayor (100 mg/kg) alcanzaron valores de 4-5 μM , valores indicados como neuroprotectores tanto en isquemia miocárdica (Hoshida y cols, 1994) como cerebral (Takasago y cols., 1997). Por lo tanto, tras la administración oral del ebselén, éste es rápidamente absorbido en el tracto gastrointestinal y alcanza niveles potencialmente terapéuticos en plasma durante la isquemia e inicio de la reperfusión (hasta 24 h tras la administración). Pese a que no hemos medido el ebselén en el tejido cerebral se ha descrito que, debido a su pequeño peso molecular y lipofilia, el ebselén penetra a través de la BHE y alcanza en el cerebro un 21% de los niveles plasmáticos al cabo de 1 h de haber sido administrado (Imai y cols., 2001). Respecto a su farmacocinética, el ebselén sufre una apertura del anillo isoselenazol con facilidad para formar un selenosulfuro que puede ser metilado, glucuronidado o hidroxilado, y así favorecer su solubilidad y excreción. En cualquier caso, el átomo de selenio no está biodisponible, por lo que

no entra en el pool corporal de selenio y es metabolizado y excretado, lo que explicaría su falta de toxicidad (Parnham y Sies, 2000).

El estrés oxidativo puede cuantificarse directamente midiendo la producción de EROs y RLs, o indirectamente midiendo, por ejemplo, el daño producido en las macromoléculas biológicas o el consumo de los antioxidantes endógenos de bajo peso molecular. El glutatión reducido (GSH) es el sustrato que la glutatión peroxidasa emplea para inactivar EROs (Matés, 2000). Esto está en línea con el mecanismo de acción del ebselén, cuya principal actividad es la de mimético de la glutatión peroxidasa y que por lo tanto también utiliza al GSH para secuestrar a estas EROS y RLs (Parnham y Sies, 2000). Por lo tanto, el ebselén debe ser capaz de reemplazar a la actividad glutatión peroxidasa endógena, que es rápidamente inactivada por un exceso de producción de EROS y RLs (Pigeolet y Remacle, 1991; Asahi y cols., 1997). Respecto a la penetración del ebselén en el parénquima cerebral, la actividad glutatión peroxidasa en el tejido cerebral aumentó un 20% en el grupo tratado con la dosis mayor respecto a los grupos control y tratado con la dosis inferior. No obstante esta diferencia no llegó a ser significativa. No existe, por tanto, diferencia estadística entre el grupo control y los tratados. En el presente estudio los niveles de GSH no resultaron alterados por la isquemia, pero se redujeron significativamente durante la reperusión postisquémica. El tratamiento con ebselén no modificó este descenso. Esto indica que, en nuestro modelo de isquemia transitoria, el estrés oxidativo detectable se desarrolla solamente cuando se produce la reoxigenación del tejido isquémico. La falta de efecto como neuroprotector del ebselén parece ser debida a su escasa penetración en el tejido cerebral, siendo entonces incapaz de controlar el aumento de la producción de EROs y sobrepasando éstas la capacidad de las células de utilización y regeneración del GSH.

El tamaño de infarto, medido a los 7 días tras la isquemia-reperusión, no fue modificado significativamente por la administración de ebselén. El modelo utilizado originó una mortalidad postquirúrgica media del 30% entre las 12 y 48 h de iniciada la reperusión (alcanzando el 40% de los animales operados a los 7 días), y produjo un infarto cuyo volumen fue superior al 25% del hemisferio afectado. Por tanto, aunque parece existir una tendencia hacia la reducción del tamaño de infarto, el

posible efecto neuroprotector del ebselén, al menos a dosis únicas elevadas, no se pone de manifiesto en condiciones de isquemia severa y tiempos de supervivencia prolongados, ya que las diferencias no llegan a ser significativas.

El daño cerebral final tras la isquemia no sólo depende del daño directo que ejercen las EROs y RLs sobre las macromoléculas celulares. Rutas de transducción específicas, incluyendo mecanismos genómicos, son activadas por el estrés oxidativo (Chan, 2001). Estos mecanismos incluyen a la mitocondria, enzimas de reparación del ADN, factores de transcripción y, junto con otros mecanismos retardados como la inducción de iNOS y la inflamación, escapan al tratamiento inicial con ebselén y pueden contribuir a la progresión tardía del infarto. A la vista de los resultados del presente trabajo y de la bibliografía existente, debería investigarse la administración de dosis repetidas de ebselén a lo largo de todo el tiempo de reperfusión, así como su uso en combinación con otros tratamientos, antioxidantes o no (Schmid-Elsaesser y cols., 1999a,b). La capacidad de una nueva formulación intravenosa de ebselén, bien sola (Imai y cols, 2003), bien en combinación con la terapia trombolítica (Lapchak y Zivin, 2003) para mantener la neuroprotección a largo plazo, debería estudiarse en modelos experimentales y extenderse posteriormente a ensayos clínicos. Esta aproximación podría mejorar los resultados beneficiosos descritos para el ebselén en los ensayos clínicos (Ogawa y cols., 1999; Yamaguchi y cols., 1998), que están restringidos a una administración a corto plazo y parecen ser menos consistentes en el caso de los pacientes con oclusión de la ACM en comparación con otros que sufren accidentes cerebrovasculares isquémicos menos severos.

Aunque la administración de ebselén resultó en una menor pérdida de peso y una menor mortalidad en los animales tratados, las diferencias con el grupo control no llegaron a ser significativas. La mayor duración de la isquemia (2 h) y reperfusión (7 días) empleadas en este grupo de experimentos tuvo como consecuencia una mayor pérdida de peso en los animales sin tratamiento ($73.6 \pm 11.1\%$ del peso inicial) frente a la sufrida por los animales del grupo utilizado para la caracterización del modelo (90 min de isquemia y 3 días de reperfusión; $85.2 \pm 4.7\%$ del peso inicial), que es revertida totalmente con la mayor dosis de ebselén ($86.5 \pm 9.8\%$ del peso inicial).

En conclusión, la administración de ebselén en dosis única no reduce significativamente el tamaño de infarto resultante de una isquemia severa en ratas, en contraste con estudios previos llevados a cabo con isquemias menos severas y tiempos de supervivencia más cortos, pese a observarse una ligera preservación de la perfusión intraisquémica.

5.3.3- Inhibidor de sPLA₂s: 12-*epi*-scalaradial.

En condiciones fisiológicas, las PLA₂s están implicadas en el recambio de fosfolípidos, mantenimiento y remodelado de la membrana, así como en procesos de exocitosis, detoxificación de peróxidos fosfolipídicos, y en la liberación de neurotransmisores. Los productos de las reacciones catalizadas por las PLA₂s pueden actuar como mensajeros secundarios por sí mismos, o ser metabolizados en eicosanoides, PAF y ácido lisofosfatídico, moléculas bioactivas con múltiples funciones. En condiciones patológicas, la estimulación de la actividad PLA₂ y la consiguiente degradación de los fosfolípidos de membrana puede ser deletérea para las neuronas de tres formas distintas (revisado por Farooqui y cols., 1997b): 1) por un lado se acumulan ácidos grasos libres, lisofosfolípidos y PAF, en detrimento de los fosfolípidos esenciales de membrana. Los ácidos grasos libres pueden producir el desacoplamiento de la fosforilación oxidativa y cambios en la permeabilidad de la membrana celular regulando los canales iónicos (Keyser y Alger, 1990); los lisofosfolípidos pueden actuar como detergentes sobre la membrana a elevadas concentraciones; PAF es un factor proagregante y media la adhesión y agregación de leucocitos, iniciando la respuesta inflamatoria en la superficie endotelial. 2) Por otro lado, la acumulación de ácidos grasos libres, entre los que se encuentra el AA, puede iniciar una cascada incontrolada de producción de AA, capaz de modular directamente la actividad de canales iónicos, de numerosos enzimas y transportadores e incluso la expresión de ciertos genes. Así mismo, actúa como sustrato para la producción de eicosanoides y prepara el escenario para la producción de RLs y con ello el daño por peroxidación de lípidos de membrana y proteínas. 3) Por último, la entrada masiva de Ca²⁺ debida a la degradación de los fosfolípidos de membrana provoca la activación continua de la proteinquinasa C (PKC) y su

traslocación del citosol a la membrana plasmática. Estos fenómenos pueden ser, al menos en parte, causa del daño neuronal observado en la isquemia-reperfusión.

Uno de los puntos que más interés suscita actualmente es la contribución de los diferentes tipos de PLA₂s al daño provocado por la inflamación. Según las evidencias experimentales existentes, parece bastante bien establecido que las isoformas citosólicas de actividad inducible (cPLA₂s dependientes de Ca²⁺) contribuyen, al menos en parte, a la progresión del infarto cerebral (Sapirstein y Bonventre, 2000; Arai y cols., 2001) y de otras enfermedades neurodegenerativas (Klivenyi y cols., 1998). Sin embargo, el papel que juegan las isoformas de secreción (sPLA₂s) en la neurodegeneración y muerte celular está menos definido. Tradicionalmente se ha asociado un papel relevante a la sPLA₂ IIA en los procesos inflamatorios debido a que los niveles locales y sistémicos de esta isoforma se encuentran elevados en esas condiciones (Aarsman y cols., 2000; Nevalainen y cols., 2000). También se ha demostrado la existencia de una comunicación cruzada entre sPLA₂ II y cPLA₂: la unión de sPLA₂ II a la membrana celular a través de receptores de superficie induce la transducción de señales que activan a la cPLA₂ dependiente de Ca²⁺ (Fonteh y cols., 2000), posiblemente a través de la ruta de señalización PKC/Raf-1/MAPK (Huwiler y cols., 1997); a su vez, la activación de la cPLA₂ altera la composición de la membrana aumentando la susceptibilidad de ésta por la sPLA₂ II, siendo capaz también de inducir la expresión de sPLA₂ II (Kuwata y cols., 2000). Estas evidencias parecen indicar una implicación causal directa de las sPLA₂s en la neurodegeneración. La hipótesis que se ha evaluado en el presente estudio es que las sPLA₂s participan en el desarrollo del daño cerebral isquémico, y que por lo tanto su inhibición tiene efectos neuroprotectores. En el presente estudio se ha seguido un protocolo distinto a los descritos en la bibliografía (Estévez y Phillis, 1997; Yagami y cols., 2002a,b): 1) el inhibidor utilizado ha sido 12-*epi*-scylaradial, inhibidor específico de las sPLA₂s que no ha sido empleado con anterioridad en la isquemia cerebral; 2) el inhibidor se ha liberado directamente en el compartimento cerebroespinal para evitar la posible restricción a atravesar las BHE y barrera sangre-CSF; y 3) se ha empleado un modelo de isquemia transitoria en lugar de permanente,

que permite que se produzca el daño cerebral por reperfusión del territorio isquémico.

Desde su introducción a principios de los '90, el scalaradial o su análogo 12-*epi*-scalaradial se han utilizado ampliamente como herramientas farmacológicas para investigar la implicación de las sPLA₂s en diferentes procesos fisiológicos y fisiopatológicos. En un estudio reciente, Thwin y colaboradores (2003) han confirmado que 12-*epi*-scalaradial inhibe de forma potente y selectiva la actividad catalítica de varias fuentes de sPLA₂ pero no de cPLA₂. A la concentración utilizada por estos investigadores (10 μM), 12-*epi*-scalaradial mostró una inhibición de la actividad cPLA₂ inferior al 20%, y una inhibición de alrededor del 80% de la actividad sPLA₂. Por otra parte, el efecto prolongado (hasta 3 días) tras una única dosis administrada intracerebroventricularmente en un modelo de alodinia en rata, sugiere una elevada vida media del inhibidor (Yeo y cols., 2004). En el presente estudio se ha optado por la administración intracerebroventricular a tasas de 0.005 y 0.5 μg/h, lo que supone una dosis total, a las 72 h tras la isquemia, de 0.48 y 48 μg, respectivamente (0.10 y 10 μg liberados en el momento de iniciar la isquemia). En el modelo de alodinia citado anteriormente la dosis única utilizada fue de 4.3 μg. Por lo tanto, parece razonable asumir que se ha alcanzado una concentración basal del inhibidor en LCR con anterioridad a la isquemia, lo suficientemente elevada para inhibir prácticamente en su totalidad la actividad sPLA₂. No hemos medido la actividad sPLA₂ ya que dicha actividad se sobre-expresa alrededor de las 16 h tras la reperfusión (véase la revisión de Sun y cols., 2004), mucho antes del periodo de reperfusión de 3 días establecido en nuestro protocolo experimental.

Nuestros resultados ponen de manifiesto que la administración crónica intracerebroventricular de 12-*epi*-scalaradial previa a la inducción de la isquemia, no sólo no confiere neuroprotección sino que, a la dosis más alta investigada, influye negativamente incrementando el volumen de infarto. La administración de 12-*epi*-scalaradial no tiene efecto sobre la hemodinámica cerebral y/o sistémica por lo que no parece ser la causa de este efecto deletéreo, en tanto en cuanto la PCC y el resto de parámetros hemodinámicos (PAS) y metabólicos (pO₂, pCO₂, pH y glucemia) no mostraron diferencias significativas entre los tres grupos de animales. La

administración intracerebroventricular de 12-*epi*-scleradiol no afectó al estado neurológico de los animales, así como a la evolución ponderal o a la mortalidad, no encontrándose diferencias con el grupo control en ningún caso. Nuestros resultados también ponen de manifiesto que 12-*epi*-scleradiol incrementó la actividad MPO en el hemisferio ipsilateral al lugar de administración, lo cual podría explicar la influencia negativa del inhibidor sobre el daño cerebral isquémico. Por lo tanto, nuestros resultados no confirman la hipótesis planteada sino que, más bien al contrario, sugieren que las sPLA₂s podrían tener un efecto neuroprotector en la isquemia cerebral, y por lo tanto su inhibición exacerbaría el daño cerebral.

Nuestros resultados contrastan con los obtenidos previamente en otras investigaciones en las que se han empleado una serie de sustancias presuntamente inhibitoras de la actividad PLA₂. La administración de **heparina** (4 mg/kg) redujo el tamaño de infarto en un modelo de isquemia cerebral transitoria en rata (Yanaka y cols., 1996). El tratamiento con **EPC-K1** (diéster fosfato de las vitaminas C y E), inhibidor de la peroxidación lipídica y de la actividad PLA₂ (Kuribayashi y cols., 1992), redujo los déficits funcionales y el daño cerebral tanto tras un episodio de isquemia global (Block y cols., 1995) como focal transitoria (Kato y cols., 2003) en ratas. El tratamiento intracerebroventricular con **lipocortinas**, proteínas inhibitoras endógenas de las actividades sPLA₂ y cPLA₂ dependientes de Ca²⁺, redujo el edema y tamaño de infarto tras 2 h de isquemia en ratas (Relton y cols., 1991). La **quinacrina**, administrada sistémicamente durante la reperusión en ratas sometidas a 2 h de oclusión de la ACM, mejoró la resolución del *ictus* disminuyendo la puntuación neurológica y el volumen de infarto estriatal (Estevez y Phillis, 1997). Sin embargo, la quinacrina exhibe un espectro más amplio de acciones farmacológicas beneficiosas tales como, por ejemplo, el descenso de la expresión de la COX-2 tras O/R-ACM en ratas (Miettinen y cols., 1997), y el bloqueo de los canales de Ca²⁺ en miocitos ventriculares aislados de rata (Xiao y cols., 2000). Por último, el **indoxam** es un derivado de la indolizina que actúa como un inhibidor específico y potente de sPLA₂ (Yokota y cols., 1999). Cuando se administró por vía intravenosa durante un periodo de 24 h desde 1 h antes ó 2 h después de la oclusión foto-trombótica permanente de la ACM, el indoxam atenuó el infarto en el cortex

dorso-lateral pero no en el estriado. Este efecto neuroprotector también se ha puesto de manifiesto en neuronas corticales en las que se indujo apoptosis mediante la aplicación de sPLA₂-IIA (Yagami y cols., 2002b).

La causa de la falta de efecto beneficioso del tratamiento con 12-*epi*-scleradiol es desconocida en la actualidad, aunque algunas posibilidades pueden ser discutidas. Por un lado, en los últimos años se ha puesto de manifiesto que algunas actividades de las sPLA₂s son independientes de su actividad catalítica, y está bien documentada la su unión a receptores de membrana (revisado por Lazdunski, 1999; Hanasaki y Arita, 2002). La sola unión de ciertas isoformas de las sPLA₂s a receptores de membrana es suficiente para desencadenar la cascada de transducción de señales que conduce a la neurodegeneración. Granata y cols. (2005) han puesto de manifiesto recientemente que las sPLA₂s son capaces de inducir la secreción de TNF- α e IL-6 independientemente de su actividad catalítica en macrófagos, por interacción con receptores de membrana. Además, Yokota y cols (1999), utilizando ratones knock-out para sPLA₂ IIA han puesto de manifiesto que la producción de citoquinas pro-inflamatorias durante el shock endotóxico es independiente de sPLA₂ IIA y que el indoxam impide la unión de sPLA₂ IB, su ligando natural, a los receptores de membrana, inhibiendo con ello la liberación de sustancias pro-inflamatorias.

Por otro lado, otras líneas de evidencia sugieren que la actividad catalítica de las sPLA₂s podría desempeñar un papel beneficioso en procesos inflamatorios, y por lo tanto su inhibición podría resultar perjudicial impidiendo la liberación de los factores antiapoptóticos y antineurodegenerativos que liberan isoformas como la sPLA₂ IIA. Zhang y cols. (1999) han sugerido que el grupo sPLA₂ IIA, acumulado en los puntos de inflamación, no sólo no resulta neurotóxico sino que incluso protege a las células de una muerte inducida por factores pro-inflamatorios y que el uso de 12-*epi*-scleradiol en cultivo de fibroblastos de riñón priva a las células de esta protección. Blondeau y cols. (2002) han puesto de manifiesto que algunos lisofosfolípidos, en concreto lisofosfatidil colina y lisofosfatidil inositol, previenen la muerte neuronal tanto en modelos de isquemia cerebral global y transitoria, como en modelos de excitotoxicidad en cultivos primarios de células granulares del cerebelo.

Así, la incapacidad para impedir la unión de ciertas isoformas de sPLA₂s (como por ejemplo la IB) y la inhibición de la actividad catalítica de otras (como por ejemplo la IIA) conducirían a un mayor tamaño de infarto por exacerbación de la respuesta inflamatoria, como se ha puesto de manifiesto la determinación de la actividad MPO en el tejido cerebral

Por último, otras evidencias sugieren que las sPLA₂ IIA podrían ser irrelevantes para el desarrollo del daño inflamatorio tras la isquemia-reperusión. Ratones mutantes para este gen (sobrexpresión o knock-out) no desarrollan respuestas inflamatorias diferentes a la cepa salvaje (Grass y cols., 1996). En un modelo de inflamación en ratones knockout para esta isoforma, la respuesta a la inflamación (en artritis) es similar a la de la cepa salvaje (Kennedy y cols., 1995). Además, en un modelo de corazón aislado, De Windt y cols. (2001) no encuentran diferencias en los niveles de ATP, liberación de enzimas, acumulación de ácidos grasos y recuperación funcional tras un episodio de isquemia-reperusión entre el miocardio de ratones knock-out para sPLA₂ IIA y el de la cepa salvaje.

Las evidencias presentadas hasta ahora parecen indicar que los distintos tipos de isoformas de sPLA₂ pueden tener implicaciones distintas en los procesos de inflamación asociados a la isquemia-reperusión. Así, mientras que la sPLA₂ IIA no parece tener implicaciones patológicas e incluso podría contribuir a la síntesis de sustancias antiapoptóticas, otras isoformas de secreción, como la IB, sí podrían estar implicadas en la neurodegeneración, presumiblemente interaccionando con receptores de membrana contribuyendo así a la activación de rutas de señalización deletéreas para la célula. Entre estas rutas puede estar, entre otras, la activación de las cPLA₂ dependientes de Ca²⁺. La principal crítica a esta hipótesis es que la expresión de la isoforma IB es baja en el cerebro, aunque la redundancia de vías de activación de las cPLA₂ dependientes de calcio puede ser la causa de que sea mucho más efectiva la inhibición directa de estas isoformas citosólicas con el uso de los inhibidores de la actividad PLA₂ poco específicos de las sPLA₂ comentados anteriormente (heparina, quinacrina, EPC-K1, lipocortinas, etc.) para el tratamiento de la inflamación. Por lo tanto, es necesario el desarrollo de inhibidores específicos y

altamente selectivos de cada isoforma de secreción para determinar su implicación concreta en la fisiopatología de la isquemia cerebral.

Conclusiones

1.- El registro continuo de la PCC mediante fluximetría láser-Doppler en ratas Wistar, permite monitorizar con la máxima precisión y de manera continua y simultánea al transcurso de la cirugía el perfil hemodinámico cerebrocortical durante la isquemia cerebral focal transitoria. Bajo las condiciones establecidas en nuestro laboratorio, y aplicando la “técnica del filamento intraluminal” para ocluir la ACM, este perfil se caracteriza por el descenso brusco y acusado de la perfusión en el córtex dorsal cuando el filamento alcanza el origen de la ACM, y del incremento de dicha perfusión cuando se retira el filamento tras un intervalo isquémico de 90 min. La monitorización de PAS y de los parámetros metabólicos pO_2 , pCO_2 , pH y glucemia arteriales, permite controlar el estado de los animales durante la cirugía, minimizando las variaciones interanimales que pudieran afectar al desarrollo y progresión del infarto, contribuyendo así a la homogeneidad y reproducibilidad del mismo.

2.- La inhibición de la isoforma inducible del enzima NOS (iNOS) mediante 1400W, redujo el volumen de infarto y el deterioro neurológico inducidos por la isquemia. Este efecto beneficioso se debe, al menos en parte, a la inhibición del descenso tardío en los niveles de ATP, responsable a su vez de la liberación tardía de glutamato, aminoácido excitador cuya acumulación en el espacio extracelular constituye uno de los fenómenos principales en la fisiopatología de la isquemia cerebral. Los resultados apoyan la inhibición de iNOS como estrategia con potencial terapéutico en el daño cerebral de origen isquémico.

3.- La potenciación de la actividad glutatión peroxidasa mediante la administración del mimético seleno-orgánico de dicho enzima, ebselén, no tuvo efectos significativos sobre el volumen de infarto y el deterioro neurológico inducidos por la isquemia. La ausencia de efecto beneficioso se manifestó a pesar de que la perfusión cerebro-cortical resultó mejorada con la dosis más alta de ebselén. La ineficacia como neuroprotector del ebselén podría ser debida a su escasa penetración en el tejido cerebral, y por lo tanto a su incapacidad para controlar el aumento de la

producción de EROs y RLs, la cual sobrepasaría la capacidad de las células para utilizar y regenerar el glutatión reducido.

4.- La inhibición de las isoformas de secreción de las fosfolipasas A₂ mediante 12-*epi*-scylaradial resultó deletérea para el tejido cerebral en términos de incremento de volumen de infarto. Este efecto perjudicial podría deberse, al menos en parte, a la potenciación de la respuesta inflamatoria, y apunta hacia el posible papel neuroprotector de al menos algunas isoformas de las fosfolipasas A₂ de secreción en la isquemia cerebral.

Bibliografia

6- BIBLIOGRAFÍA.

Aarsman AJ, Neys FW, van der Helm HA, Kuypers FA, van den Bosch H (2000). Sera of patients suffering inflammatory diseases contain group IIA but not group V phospholipase A₂. *Biochim Biophys Acta* 1502:257-63.

Abe K, Araki T, Kogure K (1988). Recovery from edema and of protein synthesis differs between the cortex and caudate following transient focal cerebral ischemia in rats. *J Neurochem* 51:1470-6.

Abumiya T, Lucero J, Heo JH, Tagaya M, Koziol JA, Copeland BR, del Zoppo GJ (1999). Activated microvessels express vascular endothelial growth factor and integrin $\alpha_v\beta_3$ during focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 9:1038-50.

Adams JD, Odunze JN (1991). Oxygen free radicals and Parkinson's disease. *Free Radic Biol Med* 10:161-9.

Akiba S, Sato T (2004). Cellular function of calcium-independent phospholipase A₂. *Biol Pharm Bull* 27:1174-8.

Akins PT, Lin PK, Hsu CY (1996). Immediate early gene expression in response to cerebral ischemia. *Stroke* 27:1682-7.

Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG (2001). Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem J* 357:593-615.

Alegría A, Barberá R, Clemente G, Farré R, García MJ, Lagarda MJ (1996). Selenium and glutathione peroxidase reference values in whole blood and plasma of a reference population living in Valencia, Spain. *J Trace Elem Med Biol* 10:223-8.

Ames A, Wright RL, Kowada M, Thurston JM and Majno G (1968). Cerebral ischemia. II. The no-reflow phenomenon. *Am J Pathol* 52:437-53.

Andrus PK, Fleck TJ, Oostveen JA, Hall ED (1997). Neuroprotective effects of the novel brain-penetrating pyrrolopyrimidine antioxidants U-101033E and U-104067F against post-ischemic degeneration of nigrostriatal neurons. *J Neurosci Res* 47:650-4.

Arai K, Ikegaya Y, Nakatani Y, Kudo I, Nishiyama N, Matsuki N (2001). Phospholipase A₂ mediates ischemic injury in the hippocampus: a regional difference of neuronal vulnerability. *Eur J Neurosci* 13:2319-23.

Armengou A, Hurtado O, Leira R, Obón M, Pascual C, Moro MA, Lizasoain I, Castillo J, Dávalos A (2003). L-Arginine levels in blood as a marker of nitric oxide-mediated brain damage in acute stroke: A clinical and experimental study. *J Cereb Blood Flow Metab* 23: 978-84.

Asahi M, Fujii J, Suzuki K, Seo HG, Kuzuya T, Hori M, Tada M, Fujii S, Taniguchi N (1995). Inactivation of glutathione peroxidase by nitric oxide. Implication for cytotoxicity. *J Biol Chem* 270:21035-9.

Asahi M, Fujii J, Takao T, Kuzuya T, Hori M, Shimonishi Y, Taniguchi N (1997). The oxidation of selenocysteine is involved in the inactivation of glutathione peroxidase by nitric oxide donor. *J Biol Chem* 272:19152-7.

Aschner JL, Lum H, Fletcher PW, Malik AB (1997). Bradykinin- and thrombin-induced increases in endothelial permeability occur independently of phospholipase C but require protein kinase C activation. *J Cell Physiol* 173:387-96.

Ashwal S, Cole DJ, Osborne TN, Pearce WJ (1994). Dual effects of L-NAME during transient focal cerebral ischemia in spontaneously hypertensive rats. *Am J Physiol* 267:H276-H284.

Aspey BS, Taylor FL, Terruli M y Harrison MJG (2000). Temporary middle cerebral artery occlusion in the rat: consistent protocol for a model of stroke and reperfusion. *Neuropathol Appl Neurobiol* 26:232-234.

Back T, Kohno K, Hossmann K-A (1994). Cortical negative DC deflections following middle cerebral artery occlusion and KCl-induced spreading depression: effect on blood flow, tissue oxygenation, and electroencephalogram. *J Cereb Blood Flow Metab* 14:12-9.

Back T, Zao W, Ginsberg MD (1995). Three-dimensional image-analysis of brain glucose metabolism/blood flow uncoupling and its electrophysiological correlates in the ischemic penumbra following middle cerebral artery occlusion. *J Cereb Blood Flow Metab* 15: 566-77.

Bal-Price A, Brown GC (2001). Inflammatory neurodegeneration mediated by nitric oxide from activated glia-inhibiting neuronal respiration, causing glutamate release and excitotoxicity. *J Neurosci* 21:6480-91.

Balestrino M, Lensman M, Parodi M, Perrazo L, Rebaudo R, Melani R, Polenov S, Cupello, A (2002). Role of creatine and phosphocreatine in neuronal protection from anoxic and ischemic damage. *Amino Acids* 23:221-9.

Banati RB, Gehramann J, Shubert P, Kreutzberg GW (1993). Citotoxicity of microglia. *Glia* 7:111-8.

Barnette MS, Rush J, Marshall LA, Foley JJ, Schmidt DB, Sarau HM (1994). Effects of scylaradial, a novel inhibitor of 14 kDa phospholipase A₂, on human neutrophil function. *Biochem Pharmacol* 47:1661-7.

Barone FC, Hillegass LM, Price WJ, White RF, Lee EV, Feuerstein GZ, Sarau HM, Clark RK, Griswold DE (1991). Polymorphonuclear leukocyte infiltration into

cerebral focal ischemic tissue: myeloperoxidase activity assay and histologic verification. *J Neurosci Res* 29:336-45.

Beal MF (1992). Mechanisms of excitotoxicity in neurologic diseases. *FASEB J* 6: 3338-44.

Beckman JS, Carson M, Smith CD, Koppenol WH (1993). ALS, SOD and peroxynitrite. *Nature* 364:584 (letter).

Bederson JB, Pitts LH, Germano SM, Nishimura MN, Davis RL, Bartkowski HM (1986). Evaluation of 3,3,5-triphenyltetrazolium chloride as a stain for detection and quantification of experimental cerebral infarction in rats. *Stroke* 186:1304-8.

Beltran B, Mathur A, Duchen M, Erusalimsky JD, Moncada S (2000). The effect of nitric oxide on cell respiration: a key to understanding its role in cell survival or death. *Proc Natl Acad Sci USA* 26:14602-7.

Benveniste H, Drejer J, Schousboe A, Diemer MH (1984). Elevation of the extracellular concentrations of glutamate and aspartate in rat hippocampus during transient cerebral ischemia monitored by intracerebral microdialysis. *J Neurochem* 43:1369-74.

Bickler PE, Buck LT (1996). Effects of fructose-1,6-bisphosphate on glutamate release and ATP loss from rat brain slices during hypoxia. *J Neurochem* 67:1463-8.

Block F, Kunkel M, Sontag KH (1995). Posttreatment with EPC-K1, an inhibitor of lipid peroxidation and of phospholipase A₂ activity, reduces functional deficits after global ischemia in rats. *Brain Res Bull* 36:257-60.

- Blondeau N, Lauritzen I, Widmann C, Lazdunski M, Heurteaux C (2002). A potent protective role of lysophospholipids against global cerebral ischemia and glutamate excitotoxicity in neuronal cultures. *J Cereb Blood Flow Metab* 22:821-34.
- Bohme GA, Bon C, Lemaire M, Reibaud M, Piot O, Stutzmann JM, Doble A, Blauchard JC (1993). Altered synaptic plasticity and memory formation in nitric-oxide synthase inhibitor-treated rats. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:9191-4.
- Bolaños JP, Almeida A (1999). Roles of nitric oxide in brain hypoxia-ischemia. *Biochim Biophys Acta* 1411:415-36.
- Boveris A, Chance B (1973). The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. *Biochem J* 134:707-16.
- Bowry VW, Ingold KU, Stocker R (1992). Vitamin E in human low-density lipoprotein. When and how this antioxidant becomes a pro-oxidant. *Biochem J* 288:341-4.
- Brown Jr RH (1996). Superoxide dismutase and familial lateral sclerosis: new insights into mechanisms and treatments. *Ann Neurol* 39:145-6.
- Brown GC, Borutaite V (2002). Nitric oxide inhibition of mitochondrial respiration and its role in cell death. *Free Rad Biol Med* 33:1440-50.
- Buée L, Hof PR, Delacourte A (1997). Brain microvascular changes in Alzheimer's disease and other dementias. *Ann N Y Acad Sci* 826:7-24.
- Cárdenas A, De Alba J, Moro MA, Leza JC, Lorenzo P, Lizasoain I (1998). Protective effect of N-3-(aminomethyl benzyl) acetamidine, an inducible nitric oxide synthase inhibitor, in brain slices exposed to oxygen-glucose deprivation. *Eur J Pharmacol* 354:161-5.

Cárdenas A, Hurtado O, Leza JC, Lorenzo P, Bartrons R, Lizasoain I, Moro MA (2000a). Fructose-1,6-biphosphate inhibits the expression of inducible nitric oxide synthase caused by oxygen-glucose deprivation through the inhibition of glutamate release in rat forebrain slices. *Naunyn-Schmiedebergs Arch Pharmacol* 362:208-12.

Cárdenas A, Moro MA, Hurtado O, Leza JC, Lorenzo P, Boscá L, Bodelon OG, Lizasoain I (2000b). Implication of glutamate in the expression of inducible nitric oxide synthase after oxygen and glucose deprivation in rat forebrain slices. *J Neurochem* 74:2041-8.

Castillo J, Dávalos A, Naveiro J, Noya M (1996). Neuroexcitatory amino acids and their relationship to infarct size and neurological deficit in ischemic stroke. *Stroke* 27: 1060-5.

Castillo J, Dávalos A, Noya M (1997). Progression of ischemic stroke and excitotoxic amino acids. *Lancet* 349:79-83.

Castillo J, Rama R, Dávalos A (2000). Nitric oxide-related brain damage in acute ischemic stroke. *Stroke* 31:852-7.

Cerchiari EL, Hoel TM, Safar P, Sclabassi RJ (1987). Protective effects of combined superoxide dismutase and deferoxamine on recovery of cerebral blood flow and function after cardiac arrest in dogs. *Stroke* 18:869-78.

Chan PH, Chu L, Chen SF, Carlson EJ, Epstein CJ (1990). Reduced neurotoxicity in transgenic mice overexpressing human copper-zinc superoxide dismutase. *Stroke* 21:80-2.

Chan, PH (2001). Reactive oxygen radicals in signaling and damage in the ischemic brain. *J Cereb Blood Flow Metab* 21: 2-14.

Chiarugi A, Moskowitz MA (2003). Poly(ADP-ribose) polymerase-1 activity promotes NF- κ B-driven transcription and microglial activation: implication for neurodegenerative disorders. *J Neurochem* 85:306-17.

Choi DW (1993). Nitric oxide: foe or friend to the injured brain??. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:9741-3.

Choi DW, Rothman SM (1990). The role of glutamate neurotoxicity in hypoxic-ischemic neuronal death. *Annu Rev Neurosci* 13: 171-82.

Choi YB, Tenneti L, Le DA, Ortiz J, Bai G, Chen HS, Lipton SA (2000). Molecular basis of NMDA receptor-coupled ion channel modulation by S-nitrosilation. *Nat Neurosci* 3:15-21.

Cimino F, Esposito F, Ammendola R, Russo T (1997). Gene regulation by reactive oxygen species. *Curr Top Cell Regul* 35:123-47.

Clemens JA (2000). Cerebral ischemia: gene activation, neuronal injury, and the protective role of antioxidants. *Free Radic Biol Med* 28:1526-31.

Contestabile A (2000). Roles of NMDA receptor activity and nitric oxide production in brain development. *Brain Res Brain Res Rev* 32:476-509.

Cooper CE (1999). Nitric oxide and iron proteins. *Biochim Biophys Acta* 1411:290-309.

Corbett D, Nurse S (1998). The problem of assessing effective neuroprotection in experimental cerebral ischemia. *Prog Neurobiol* 54:531-48.

Cotgreave IA, Duddy SK, Kass GE, Thompson D, Moldens P (1989). Studies on the anti-inflammatory activity of ebselen: ebselen interferes with granulocyte oxidative bursts by dual inhibition of NADPH oxidase and protein kinase C?. *Biochem Pharmacol* 38:649-56.

Cuzzocrea S, Riley DP, Caputi AP, Salvemini D (2001). Antioxidant therapy: a new pharmacological approach in shock, inflammation, and ischemia/reperfusion injury. *Pharmacol Rev* 53:135-59.

Dalkara T, Morikawa E, Panahian N, Moskowitz MA (1994a). Blood flow-dependent functional recovery in a rat model of focal cerebral ischemia. *Am J Physiol* 267: H678-H683.

Dalkara T, Yoshida T, Irikura K, Moskowitz MA (1994b). Dual role of nitric oxide in focal cerebral ischemia. *Neuropharmacology* 33:1447-52.

Dávalos A, Castillo J, Serena J, Noya M (1997). Duration of glutamate release after acute ischemic stroke. *Stroke* 28:708-10.

Dawson DA, Masayasu D, Graham DI, Macrae IM (1995). The neuroprotective efficacy of ebselen (a glutathione peroxidase mimic) on brain damage induced by transient focal cerebral ischaemia in the rat. *Neurosci Lett* 185:65-9.

Dawson VL, Kizushi V, Huang PL, Snyder SH, Dawson TM (1996). Resistance to neurotoxicity in cortical cultures from neuronal nitric oxide synthase-deficient mice. *J Neurosci* 16:2479-87.

De Carvalho MS, Jacobs RS (1991). Two-step inactivation of bee venom phospholipase A2 by scalaradial. *Biochem Pharmacol* 42:1621-6.

De Cristóbal J, Moro MA, Dávalos A, Castillo J, Leza JC, Camarero J, Colado MI, Lorenzo P, Lizasoain I (2001). Neuroprotective effect of aspirin by inhibition of glutamate release after permanent focal cerebral ischaemia in rats. *J Neurochem* 79:456-459.

De Cristóbal J, Cárdenas A, Lizasoain I, Leza JC, Fernandez-Tomé P, Lorenzo P, Moro MA. (2002). Inhibition of glutamate release via recovery of ATP levels accounts for a neuroprotective effect of aspirin in rat cortical neurons exposed to oxygen-glucose deprivation. *Stroke* 33: 261-267.

de Leciñana MA, Díez-Tejedor E, Carceller F, Roda JM (2001). Cerebral ischemia: from animal studies to clinical practice. Should the methods be reviewed?. *Cerebrovasc Dis* 11(suppl. 1):20-30.

De Windt LJ, Willems J, Roemen TH, Coumans WA, Reneman RS, Van Der Vusse GJ, Van Bilsen M (2001). Ischemic-reperfused isolated working mouse hearts: membrane damage and type IIA phospholipase A₂. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 280:H2572-80.

DeCoster MA, Lambeau G, Lazdunski M, Bazan NG (2002). Secreted phospholipase A₂ potentiates glutamate-induced calcium increase and cell death in primary neuronal cultures. *J Neurosci Res* 67:634-45.

del Zoppo GJ, Schmid-Schönbein GW, Mori E, Copeland BR, Chang C-M (1991). Polymorphonuclear leukocytes occlude capillaries following middle cerebral artery occlusion and reperfusion in baboons. *Stroke* 22:1276-84.

del Zoppo GJ (1994). Microvascular changes during cerebral ischaemia and reperfusion. *Cerebrovasc Brain Metab Rev* 6:47-96.

del Zoppo GJ, Mabuchi T (2003). Cerebral microvessels responses to focal ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 23:879-94.

Delanty N, Dichter MA (2000). Antioxidant therapy in neurologic disease. *Arch Neurol* 57:1265-70.

Deshpande SS, Irani K (2002). Oxidant signalling in carcinogenesis: a commentary. *Hum Exp Toxicol* 21:63-4.

Dhillon HS, Carman HM, Zang D, Scheff SW, Prasad MR (1999). Severity of experimental brain injury on lactate and free fatty acid accumulation and Evans blue extravasation in the rat cortex and hippocampus. *J Neurotrauma* 16:455-69.

Dimon-Gadal S, Gerbaud P, Keryer G, Anderson W, Evain-Brion D, Raynaud F (1998). In vitro effects of oxygen-derived free radicals on type I and type II cAMP-dependent protein kinases. *J Bio. Chem* 273:22833-40.

Dinerman JL, Dawson TM, Schell MJ, Snowman A, Snyder SH (1994). Endothelial nitric oxide synthase localized to hippocampal pyramidal cells: Implications for synaptic plasticity. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:4214-8.

Ding-Zhou L, Marchand-Verrecchia C, Croci N, Plotkine M, Margail I (2002). L-NAME reduces infarction, neurological deficit and blood-brain barrier disruption following cerebral ischemia in mice. *Eur J Pharmacol* 457:137-146.

Dorman PJ, Counsell CE, Sandercock AG (1996). Recently developed neuroprotective therapies for acute stroke. A qualitative systematic review of clinical trials. *CNS Drugs* 5:457-74.

Drapier JC, Bouton C (1996). Modulation by nitric oxide of metalloprotein regulatory activities. *Bioessays* 18:549-56.

Du J, Gebicki JM (2002). DNA degradation and protein peroxidation in cells exposed to hydroxyl free radicals. *Redox Rep* 7:329-31.

Ducros V, Ferry M, Faure P, Belin N, Renversez JC, Ruffieux D, Favier A (2000). Distribution of selenium in plasma of fresh women: relation to age and selenium status. *Clin Chem* 46:731-3.

Ekholm A, Katsura K, Kristian T, Liu M, Folbergrova J, Siesjö BK (1993). Coupling of cellular energy state and ion homeostasis during recovery following brain ischemia. *Brain Res* 604:185-91.

Elfering SL, Sarkela TM, Giulivi C (2002). Biochemistry of mitochondrial nitric-oxide synthase. *J Biol Chem* 277:38079-86.

Escott KJ, Beech JS, Haga KK, Williams SCR, Meldrum BS, Bath PMW (1998). Cerebroprotective effect of the nitric oxide synthase inhibitors, 1-(2-trifluoromethylphenyl)imidazole and 7-nitroindazole, after transient focal cerebral ischemia in the rat. *J Cereb Blood Flow Metab* 18:281-7.

Estevez AY, Phillis JW (1997). The phospholipase A₂ inhibitor, quinacrine, reduces infarct size in rats after transient middle cerebral artery occlusion. *Brain Res* 752:203-8.

Evans PH (1993). Free radicals in brain metabolism and pathology. *Br Med Bull* 49:577-87.

Faraci FM, Brian JE Jr (1994). Nitric oxide and the cerebral circulation. *Stroke* 25:692-703.

Farooqui AA, Yang HC, Horrocks L (1997a). Involvement of phospholipase A₂ in neurodegeneration. *Neurochem Int* 30:517-22.

Farooqui AA, Yang HC, Rosenberger TA, Horrocks LA (1997b). Phospholipase A₂ and its role in brain tissue. *J Neurochem* 69:889-901.

Fedorova TN, Boldyrev AA, Gannushkina IV (1999). Lipid peroxidation in experimental ischemia of the brain. *Biochemistry (Mosc)* 64:75-9.

Fitzpatrick FA, Soberman R (2001). Regulated formation of eicosanoids. *J Clin Invest* 107:1347-51.

Folbergrova J, Minamisawa H, Ekholm A (1990). Phosphorilase alpha and labile metabolites during anoxia: correlation to membrane fluxes of K⁺ and Ca²⁺. *J Neurochem* 55:1690-6.

Fonteh AN, Atsumi G, LaPorte T, Chilton FH (2000). Secretory phospholipase A₂ receptor-mediated activation of cytosolic phospholipase A₂ in murine bone-marrow-derived mast cells. *J Immunol* 165:2773-2782.

Forster C, Clark HB, Ross ME, Iadecola C (1999). Inducible nitric oxide synthase expression in human cerebral infarcts. *Acta Neuropathol (Berl)* 97:215-20.

Fox G, Gallacher D, Shevde S, Loftus J, Swayne G (1993). Anatomic variation of the middle cerebral artery in the Sprague-Dawley rat. *Stroke* 24:2087-93.

Francis JW, Ren J, Warren L, Brown RH, Finklestein SP (1997). Postischemic infusion of Cu/Zn superoxide dismutase or SOD:Tet451 reduces cerebral infarction following focal ischemia/reperfusion in rats. *Exp Neurol* 146:435-43.

Fujii J, Taniguchi N (1999). Down regulation of superoxide dismutases and glutathione peroxidase by reactive oxygen and nitrogen species. *Free Radic Res* 31:301-8.

Fukuyama N, Takizawa S, Ishida H, Hoshiai K, Shinohara Y, Nakazawa H (1998). Peroxynitrite formation in focal cerebral ischemia-reperfusion in rats occurs predominantly in the periinfarct region. *J Cereb Blood Flow Metab* 18:123-9.

Galeffi F, Sinnar S, Schwartz-Bloom R (2000). Diazepam promotes ATP recovery and prevents cytochrome c release in hippocampal slices. *J Neurochem* 75:1242-9.

Garbán HJ, Bonavida B (2001). Nitric oxide inhibits the transcription repressor Yin-Yang 1 binding activity at the silencer region of the Fas promoter: a pivotal role for nitric oxide in the up-regulation of Fas gene expression in human tumor cells. *J Immunol* 167:75-81.

García JH (1984). Experimental ischemic stroke: a review. *Stroke* 1:5-14

Garvey EP, Oplinger JA, Tanoury GJ, Sherman PA, Fowler M, Marshall S, Harmon MF, Paith JE, Furfine ES (1994). Potent and selective inhibition of human nitric oxide synthases. Inhibition by non-amino acid isothioureas. *J Biol Chem* 269:26669-76.

Garvey EP, Oplinger JA, Furfine ES, Kiff RJ, Lazslo F, Whittle BJR, Knowles RG (1997). 1400W is a slow, tight binding, and highly selective inhibitor of inducible nitric-oxide synthase in vitro and in vivo. *J Biol Chem* 272:4959-63.

Gelb AW, Wilson JX, Cechetto DF (2001). Anesthetics and cerebral ischemia: should we continue to dream the impossible dream?. *Can J Anaesth* 8:727-31.

Gewaltig MT, Kojda G (2002). Vasoprotection by nitric oxide: mechanisms and therapeutic potential. *Cardiovasc Res* 55:250-60.

Gilgun-Sherki Y, Melamed E, Offen D (2001). Oxidative stress induced-neurodegenerative diseases: the need for antioxidants that penetrate the blood brain barrier. *Neuropharmacology* 40:959-75.

Ginsberg C, Busto R (1989). Rodent models of cerebral ischemia. *Stroke* 20:1627-1642.

Ginsberg MD (1996). The validity of rodent brain-ischemia models is self-evident. *Arch Neurol* 53:1065-7.

Ginsberg MD, Belayev L, Zhao W, Back T, Dietrich WD, Busto R (1996). The pathophysiological significance of metabolism/blood flow uncoupling in acute ischemic and traumatic brain injury. En: *Pharmacology of Cerebral Ischemia*. Kriegelstein J (Ec.). Medpharm Scientific, Stuttgart, Germany, pags. 245-58.

Ginsberg MD (1997). The new language of cerebral ischemia. *AJNR Am J Neuroradiol* 18:1435-45.

Ginsberg MD (2003). Adventures in the pathophysiology of brain ischemia: penumbra, gene expression, neuroprotection. The 2002 Thomas Willis Lecture. *Stroke* 34:214-23.

Giulivi C, Poderoso JJ, Boveris A (1998). Production of nitric oxide by mitochondria. *J Biol Chem* 273:11038-43.

Glaser KB, Sung ML, Hartman DA, Lock YW, Bauer J, Walter T, Carlson RP (1995). Cellular and topical in vivo inflammatory murine models in the evaluation of inhibitors of phospholipase A₂. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol* 8:300-8.

Goldstein LB (2004). Neuroprotective therapy for acute ischaemic stroke: down, but not out. *The Lancet* 363:414-5.

Granata F, Petraroli A, Boilard E, Bezzine S, Bollinger J, Del Vecchio L, Gelb MH, Lambeau G, Marone G, Triggiani M (2005). Activation of cytokine production by secreted phospholipase A₂ in human lung macrophages expressing the M-type receptor. *J Immunol* 174:464-74.

Grandati M, Verrecchia C, Revaud ML, Allix M, Boulu RG, Plotkine M (1997). Calcium-independent NO-synthase activity and nitrites/nitrates production in transient focal cerebral ischaemia in mice. *Br J Pharmacol* 122: 625-30.

Grass DS, Felkner RH, Chiang MY, Wallace RE, Nevalainen TJ, Bennet CF, Swanson ME (1996). Expression of human II PLA₂ in transgenic mice results in epidermal hyperplasia in the absence of inflammatory infiltrate. *J Clin Invest* 97:2161-2.

Green AR, Cross AJ (1997). Techniques for examining neuroprotective drugs in vivo. *Int Rev Neurobiol* 40:47-68.

Green AR, Odergren T, Ashwood T (2003). Animal models of stroke: do they have value for discovering neuroprotective agents? *Trends Pharmacol Sci* 24:402-8

Greenlund LJS, Deckwerth TL, Johnson EM (1995). Superoxide dismutase delays neuronal apoptosis: a role o reactive oxygen species in programmed neuronal death. *Neuron* 14:303-15.

Hacke W, Kaste M, Fieschi C, Toni D, Lesaffre E, von Kummer R, Boysen G, Bluhmki E, Hoxter G, Mahagne MH (1995). Intravenous thrombolysis with

recombinant tissue plasminogen activator for acute hemispheric stroke: the European Cooperative Acute Stroke Study (ECASS). *JAMA* 274:1017-25

Hall ED, Yonkers PA (1988). Attenuation of post-ischemic cerebral hypo-perfusion by the 21-aminosteroid U74006F. *Stroke* 10:340-4.

Hamada J, Greenberg JH, Croul S, Dawson TM, Reivich M (1995). Effects of central inhibition on nitric oxide synthase on focal cerebral ischemia in rats. *J Cereb Blood Flow Metab* 15:779-86.

Hamaguchi K, Kuwata H, Yoshihara K, Masuda S, Shimbara S, Oh-ishi S, Murakami M, Kudo I (2003). Induction of distinct sets of secretory phospholipase A₂ in rodents during inflammation. *Biochim Biophys Acta* 1635:37-47.

Hamann GF, Okada Y, del Zoppo GJ (1996). Hemorrhagic transformation and microvascular integrity during focal cerebral ischemia/reperfusion. *J Cereb Blood Flow Metab* 16:1373-8.

Hammer RB, Parker Jr WD, Bennet Jr JP (1993). NMDA receptor increase OH radicals in vivo by using nitric oxide synthase and protein kinase C. *Neuroreport* 5:72-4.

Hanasaki K, Arita H (2002). Phospholipase A₂ receptor: a regulator of biological functions of secretory phospholipase A₂. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 68-69: 71-82.

Handa Y, Kaneko M, Takeuchi H, Tsuchida A, Kobayashi H, Kubota T (2000). Effect of an antioxidant, Ebselen, on development of chronic cerebral vasospasm after subarachnoid hemorrhage in primates. *Surg Neurol* 53:323-9.

Hara H, Huang PL, Panahian N, Fishman MC, Moskowitz MA (1996). Reduced brain edema and infarction volume in mice lacking the neuronal isoform of nitric oxide synthase after transient MCA occlusion. *J Cereb Blood Flow Metab* 16:605-11.

Harris RJ, Symon L, Branston NM, Bayhan M (1981). Changes in extracellular calcium activity in cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 1:203-9.

Hattori R, Inoue R, Sase K, Eizawa H, Kosuga K, Aoyama T, Masayasu H, Kawai C, Sasayama S, Yui Y (1994). Preferential inhibition of inducible nitric oxide synthase by ebselen. *Eur J Pharmacol* 267:R1-R2.

Heinzel B, John M, Klatt P, Böhme E, Mayer B (1992). Ca²⁺/calmodulin-dependent formation of hydrogen peroxide by brain nitric oxide synthase. *Biochem J* 281:627-30.

Heo JH, Lucero J, Abumiya T, Koziol JA, Copeland BR, del Zopo GJ (1999). Matrix metalloproteinases increase very early during experimental focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 19:624-33.

Hill HD, Straka JG (1988). Protein determination using bicinchoninic acid in the presence of sulfhydryl reagents. *Anal Biochem* 170:203-8.

Holscher C, Rose SP (1994). Inhibitors of phospholipase A₂ produce amnesia for a passive avoidance task in the chick. *Behav Neural Biol* 61:225-32.

Hoshida S, Kuzuya T, Nishida M, Yamashita M, Hori M, Kamada T, Tada M (1994). Ebselen protects against ischemia-reperfusion injury in a canine model of myocardial infarction. *Am J Physiol* 267:H2342-7.

Hosomi N, Lucero J, Heo JH, Koziol JA, Copeland BR, del Zopo GH (2001). Rapid differential endogenous plasminogen activator expression after acute middle cerebral artery occlusion. *Stroke* 32:1341-8.

Hossmann K-A (1982). Treatment of experimental cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 2:275-97.

Hossmann K-A (1994a). Viability thresholds and the penumbra of focal ischemia. *Ann Neurol* 36:557-65.

Hossmann K-A (1994b). Glutamate-mediated injury in focal cerebral ischemia: the excitotoxin hypothesis revised. *Brain Pathol* 4:23-6.

Hoyt KR, Tang LH, Aizenman E, Reynolds IJ (1992). Nitric oxide modulates NMDA-induced increases in intracellular Ca²⁺ in cultured rat forebrain neurons. *Brain Res* 592:310-6.

Huang Z, Huang PL, Panahian N, Dalkara T, Finishman MC, Moskowitz MA (1994). Effects of cerebral ischemia in mice deficient in neuronal nitric oxide synthase. *Science* 265:1883-5.

Hurtado O, De Cristobal J, Sánchez V, Lizasoain I, Cárdenas A, Pereira MP, Colado MI, Leza JC, Lorenzo P, Moro MA (2003). Inhibition of glutamate release by delaying ATP fall accounts for neuroprotective effects of antioxidants in experimental stroke. *FASEB J* 17:2082-84.

Huwiler A, Staudt G, Kramer RM, Pfeilschifter J (1997). Cross-talk between secretory phospholipase A₂ and cytosolic phospholipase A₂ in rat renal mesangial cells. *Biochim Biophys Acta* 1348:257-72.

Iadecola C, Beitz AJ, Renno W, Xu X, Mayer B, Zhang F (1993). Nitric oxide synthase-containing neural processes on large cerebral arteries and cerebral microvessels. *Brain Res* 606:148-55.

Iadecola C, Zhang F, Xu S, Casey R, Ross ME (1995a). Inducible nitric oxide synthase gene expression in brain following cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 15:378-84.

Iadecola C, Zhang F, Xu X (1995b). Inhibition of inducible nitric oxide synthase ameliorates cerebral ischemic damage. *Am J Physiol* 268:R286-92.

Iadecola C, Zhang F, Casey R, Clark JB, Ross E (1996). Inducible nitric oxide synthase gene expression in vascular cells after transient focal cerebral ischemia. *Stroke* 27:1373-80.

Iadecola C, Zhang F, Casey R, Nagayama M, Ross ME (1997). Delayed reduction of ischemic brain injury and neurological deficits in mice lacking the inducible nitric oxide synthase gene. *J Neurosci* 17:9157-64.

Iadecola C, Ross ME (1997). Molecular pathology of cerebral ischemia: delayed gene expression and strategies for neuroprotection. *Ann N Y Acad Sci* 835:203-17.

Ichikawa S, Omura K, Katayama T, Okamura N, Ohtsuka T, Ishibashi S, Masayasu H (1987). Inhibition of superoxide anion production in guinea pig polymorphonuclear leukocytes by a seleno-organic compound, ebselen. *Journal Pharmacobio-Dynamics* 10:595-7.

Imai H, Masayasu H, Dewar D, Graham DI, Macrae IM (2001). Ebselen protects both gray and white matter in a rodent model of focal cerebral ischemia. *Stroke* 32:2149-56.

Imai H, Graham DI, Masayasu H, Macrae IM (2003). Antioxidant ebselen reduces oxidative damage in focal cerebral ischemia. *Free Radic Biol Med* 34:56-63.

Inoue N, Hirata K, Yamada M, Hamamori Y, Matsuda Y, Akita H, Yokoyama M (1992). Lysophosphatidylcholine inhibits bradykinin-induced phosphoinositide hydrolysis and calcium transients in cultured bovine aortic endothelial cells. *Circ Res* 71: 1410-21.

Inoue S, Kawaguchi M, Kurehara K, Sakamoto T, Kishi K, Einaga T, Kitaguchi K, Furuya H (2002). Mild hypothermia can enhance pial arteriolar vasodilation induced by isoflurane and sevoflurane in cats. *Crit Care Med* 30:1863-9.

Jabaudon D, Scanziani M, Gähwiler BH, Gerber U (2000). Acute decrease in net glutamate uptake during energy deprivation. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:5610-5.

Jenkins LW, Povlishock JT, Lewelt W, Miller JD, Becker DP (1981). The role of postischemic recirculation in the development of ischemic neuronal injury following complete cerebral ischemia. *Acta Neuropathol (Berl)* 55:205-20.

Kader A, Frazzini UI, Solomon RA, Trifiletti RR (1993). Nitric oxide production during focal cerebral ischemia in rats. *Stroke* 24:1709-16.

Kalyvas A, David S (2004). Cytosolic phospholipase A_2 plays a key role in the pathogenesis of múltiple sclerosis-like disease. *Neuron* 41: 323-35.

Kamii H, Kinouchi H, Chen SF, Sharp FR, Epstein CJ, Chan PH (1995). SOD-1 transgenic mice: an application to the study of ischemic brain injury. In: *Membrane-Linked Diseases*. Ohmishi ST (Ed.). CRC Press, Boca Raton. 4:423-31.

Kass IS, Lipton P (1989). Protection of hippocampal slices from young rats against anoxic transmission damage is due to better maintenance of ATP. *J Physiol* 413:1-11.

Kato N, Yanaka K, Nagase S, Hirayama A, Nose T (2003). The antioxidant EPC-K1 ameliorates brain injury by inhibiting lipid peroxidation in a rat model of transient focal cerebral ischaemia. *Acta Neurochir* 145:489-93.

Katsura K, Rodriguez de Turco EB, Folbergrova J, Bazan NG, Siesjö BK (1993). Coupling among energy failure, loss of ion homeostasis, and phospholipase A₂ and C activation during ischemia. *J Neurochem* 61:1677-84.

Katzman R, Clasen R, Klatzo I, Meyer JS, Pappius HM, Waltz AG (1977). Report of Joint Committee for Stroke Resources. IV. Brain edema in stroke. *Stroke* 8:512-40.

Kawaguchi M, Kimbro JR, Drummond JC, Cole DJ, Kelly PJ, Patel PM (2000). Isoflurane delays but does not prevent cerebral infarction in rats subjected to focal ischemia. *Anesthesiology* 92:1335-42.

Kedziora J, Bartosz G (1988). Down's syndrome: a pathology involving the lack of balance of reactive oxygen species. *Free Radic Biol Med* 4:317-30.

Kennedy BP, Payette P, Mudgett J, Vadas P, Pruzanski W, Kwan M, Tang C, Rancourt DE, Cromlish WA (1995). A natural disruption of the secretory group II Phospholipase A₂ gene in inbred mouse strains. *J Biol Chem* 270: 22378-85.

Keyser DO, Alger BE (1990). Arachidonic acid modulates hippocampal calcium current via protein kinase C and oxygen radicals. *Neuron* 5:545-53.

Kleihues P, Hossmann K-A (1971). Protein synthesis in the cat brain after prolonged cerebral ischemia. *Brain Res* 35:409-18.

Kleihues P, Kobayashi K, Siesjo BK (1974). Purine nucleotide metabolism in the cat brain after one hour of complete ischemia. *J Neurochem* 23:417-25.

Klivenyi P, Beal MF, Ferrante RJ, Andreassen OA, Wermer M, Chin MR, Bonventre JV (1998). Mice deficient in group IV cytosolic phospholipase A₂ are resistant to MPTP neurotoxicity. *J Neurochem* 71:2634-7.

Knollema S, Elting JW, Dijkhuizen RM, Nicolay K, Korf J, Ter Horst GJ (1996). Ebselen (PZ-51) protects the caudate putamen against hypoxia/ischemia induced neuronal damage. *Neurosci Res Commun* 19:47-56.

Kobayashi M, Lust WD, Passonneau JV, (1977). Concentrations of energy metabolites and cyclic nucleotides during and after bilateral ischemia in the gerbil cerebral cortex. *J Neurochem* 29:53-9.

Kokubo Y, Liu J, Rajdev S, Kayama T, Sharp FR, Weinstein PR (2003). Differential cerebral protein synthesis and heat shock protein 70 expression in the core and penumbra of rat brain after transient focal ischemia. *Neurosurgery* 53:186-90.

Kolb JP, Roman V, Mentz F, Zhao H, Rouillard D, Dugas N, Dugas B, Sigaux F (2001). Contribution of nitric oxide to the apoptotic process in human B cell chronic lymphocytic leukaemia. *Leuk Lymphoma* 40:243-57.

Kolko M, Bruhn T, Christensen T, Lazdunski M, Lambeau G, Bazan NG, Diemer NH (1999). Secretory phospholipase A₂ potentiates glutamate-induced rat striatal neuronal cell death in vivo. *Neurosci Lett* 274: 167-70.

Kolko M, de Turco EB, Diemer NH, Bazan NG (2002). Secretory phospholipase A₂-mediated neuronal cell death involves glutamate ionotropic receptors. *Neuroreport* 13:1963-6.

Kondoh S, Nagasawa S, Kawanishi M, Yamaguchi K, Kajimoto S, Ohta T (1999). Effects of ebselen on cerebral ischemia and reperfusion evaluated by microdialysis. *Neurol Res* 21:682-6.

Kovacic P, Jacintho JD (2001). Mechanisms of carcinogénesis: focus on oxidative stress and electron transfer. *Curr Med Chem* 8:773-96.

Kubes P, Suzuki M, Granger D (1991). Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:4651-5.

Kuribayashi Y, Yoshida K, Sakaue T, Okumura A (1992). In vitro studies on the influence of L-ascorbic acid 2-[3,4-dihydro-2,5,7,8-tetramethyl-2-(4,8,12-trimethyltridecyl)-2H-1-benzopyran-6yl-hydrogen phosphate] potassium salt on lipid peroxidation and phospholipase A₂ activity. *Arzneimittelforschung* 42:1072-4.

Kuwata H, Yamamoto S, Miyazaki Y, Shimbara S, Nakatani Y, Suzuki H, Ueda N, Yamamoto S, Murakami M, Kudo I (2000). Studies on a mechanism by which cytosolic phospholipase A₂ regulates the expression and function of type IIA secretory phospholipase A₂. *J Immunol* 165:4024-31.

Kuzin B, Regulski M, Stasiv Y, Scheiner V, Tully T, Enikolopov G (2000). Nitric oxide interacts with the retinoblastoma pathway to control eye development in *Drosophila*. *Curr Biol* 10:459-62.

Lambeau G, Lazdunski M (1999). Receptors for a growing family of secreted phospholipases A₂. *Trends Pharmacol Sci* 20: 162-70.

Lander HM, Ogiste JS, Pearce SF, Levi R, Novogrodsky A (1995). Nitric oxide-stimulated guanine nucleotide exchange on p21ras. *J Biol Chem* 270:7017-20.

Lander HM (1997). An essential role for free radicals and derived species in signal transduction. *FASEB J* 11:118-24.

Lapchak PA, Zivin JA (2003). Ebselen, a seleno-organic antioxidant, is neuroprotective after embolic strokes in rabbits. Synergism with low-dose tissue plasminogen activator. *Stroke* 34:2013-8.

Largerón M, Mesples B, Gressens P, Cecchelli R, Spedding M, Le Ridant A, Fleury MB (2001). The neuroprotective activity of 8-alkylamino-1,4-benzoxazine antioxidants. *Eur J Pharmacol* 424:189-94.

Lauritzen I, Heurteaux C, Lazdunski M (1994). Expression of group II phospholipase A₂ in rat brain after severe forebrain ischemia and in endotoxic shock. *Brain Res* 651:353-6.

Lawrence RA, Burk RF (1976). Glutathione peroxidase activity in selenium-deficient rat liver. *Biochem Biophys Res Commun* 71:952-8.

Lefer AM, Lefer DJ (1996). The role of nitric oxide and cell adhesion molecules on the microcirculation in ischemia-reperfusion. *Cardiovasc Res* 32:743-51.

Lestage P, Lockhart B, Roger A (2002). In vivo exploration of cerebral ischemia: use of neuroprotective agents in animal studies. *Thérapie* 57:554-63.

Li J, Billiar TR, Talanian RV, Kim YM (1997). Nitric oxide reversibly inhibits seven members of the caspase family via S-nitrosylation. *Biochem Biophys Res Commun* 240:419-24.

Linares E, Giorgio S, Mortara RA, Santos CX, Yamada A, Augusto O (2001). Role of peroxynitrite in macrophage microbicidal mechanisms in vivo revealed by protein nitration and hydroxylation. *Free Radic Biol Med* 30:1234-42.

Lipton P (1999). Ischemic cell death in brain neurons. *Physiol Rev* 79:1431-568.

Ljunggren B, Norberg K, Siesjö BK (1974). Influence of tissue acidosis upon restitution of brain energy metabolism following total ischemia. *Brain Res* 77:173-86.

Lowenstein CJ, Snyder SH (1992). Nitric oxide, a novel biologic messenger. *Cell* 70:705-7.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951). Protein measurement with the phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265-75.

Luo D, Knezevich S, Vincent SR (1993). N-Methyl-D-Aspartate induced nitric oxide release: an in vivo microdialysis study. *Neuroscience* 57:897-900.

Macrae IM, Robinson MJ, Graham DI, Reid JL, McCulloch J (1993). Endothelin-1-induced reductions in cerebral blood flow: dose dependency, time course and neuropathological consequences. *J Cereb Blood Flow Metab* 13:276-84.

Madl JE, Burgesser K (1993). Adenosine triphosphate depletion reverses sodium-dependent, neuronal uptake of glutamate in rat hippocampal slices. *J Neurosci* 13:4429-44.

Maiorino A, Roveri A, Coassin M, Ursini F (1988). Kinetic mechanism and substrate specificity of glutathione peroxidase activity of ebselen (PZ51). *Biochem Pharmacol* 37:2267-71.

Malinski T, Bailey F, Zhang ZG, Choop M (1993). Nitric oxide measured by a porphyrinic microsensor in rat brain after transient middle cerebral artery occlusion. *J Cereb Blood Flow Metab* 13:355-8.

Markesbery WR (1997). Oxidative stress hypothesis in Alzheimer's disease. *Free Radic Biol Med* 23:134-47.

Marshall LA, Winkler JD, Griswold DE, Bolognese B, Roshak A, Sung CM, Webb EF, Jacobs R (1994). Effects of scolaradial, a type II phospholipase A₂ inhibitor, on human neutrophil arachidonic acid mobilization and lipid mediator formation. *J Pharmacol Exp Ther* 268:709-17.

Marti HJ, Bernaudin M, Bellail A, Schoeh H, Euler M, Petit E, Risau W (2000). Hypoxia-induced vascular endothelial growth factor expression precedes neovascularization after cerebral ischemia. *Am J Pathol* 156:965-76.

Masuda S, Murakami M, Komiyama K, Ishihara M, Ishikawa Y, Ishii T, Kudo I (2005). Various secretory phospholipase A₂ enzymes are expressed in rheumatoid arthritis and augment prostaglandin production in cultured synovial cells. *FEBS J* 272:655-72.

Masumoto H, Sies H (1996). The reaction of ebselen with peroxynitrite". *Chem Res Toxicol* 9:262-7.

Matés JM (2000). Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology. *Toxicology* 153:83-104.

Matsumoto K, Lo EH, Pierce AR, Halpern EF, Newcomb R (1996). Secondary elevation of extracellular neurotransmitter amino acids in the reperfusion phase following focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 16:114-24.

Matsuo Y, Onodera H, Shiga Y, Nakamura M, Ninomiya M, Kihara T, Kogure K (1994). Correlation between myeloperoxidase-quantified neutrophil accumulation

and ischemic brain injury in the rat. Effects of neutrophil depletion. *Stroke* 25:1469-75.

Matthews RT, Yang L, Browne S, Baik M, Beal MF (1998). Coenzyme Q₁₀ administration increases brain mitochondrial concentrations and exerts neuroprotective effects. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:8892-7.

McAuley MA (1995). Rodent models of focal ischemia. *Cerebrovasc Brain Metab Rev* 7:153-80.

McCord JM, Gao B, Leff J, Flores SC (1994). Neutrophil-generated free radicals: possible mechanisms of injury in adult respiratory distress syndrome. *Environ Health Perspect* 102 suppl. 10:57-60.

Meffert MK, Calakos NC, Scheller RH, Schulman H (1996). Nitric oxide modulates synaptic vesicle docking fusion reactions. *Neuron* 16:1229-36.

Meng W, Tobin RR, Busija DW (1995). Glutamate-induced cerebral vasodilation is mediated by nitric oxide through N-methyl-D-aspartate receptors. *Stroke* 26:857-63.

Mies G, Ishimaru S, Xie Y, Seo K, Hossmann KA (1991). Ischemic thresholds of cerebral protein synthesis and energy state following middle cerebral artery occlusion in rat. *J Cereb Blood Flow Metab* 11:753-61.

Miettinen S, Fusco FR, Yrjänheikki J, Keinänen R, Hirvonen T, Roivainen R, Närhi M, Hökfelt T, Koistinaho J (1997). Spreading depression and focal brain ischemia induce cyclooxygenase-2 in cortical neurons through N-methyl-D-aspartic acid-receptor and phospholipase A₂. *Neurobiology* 94:6500-5.

Molloy GY, Rattray M, Williams RJ (1998). Genes encoding multiple forms of phospholipase A₂ are expressed in rat brain. *Neurosci Lett* 258:139-42.

Moncada S, Palmer RMJ, Higgs EA (1991). Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol Rev* 43:109-42.

Mori T, Asano T, Matsui T, Muramatsu H, Ueda M, Kamiya T, Katayama Y, Abe T (1999). Intraluminal increase of superoxide anion following transient focal cerebral ischemia in rats. *Brain Res* 816:350-7.

Mori T, Tateishi N, Kagamiishi Y, Shimoda T, Satoh S, Ono S, Hatsube N, Asano T (2004). Attenuation of a delayed increase in the extracellular glutamate level in the peri-infarct area following focal cerebral ischemia by a novel agent ONO-2506. *Neurochem Int* 45:381-7.

Morikawa E, Moskowitz MA, Huang Z, Yoshida T, Irikura K, Dalkara T (1994). L-arginine infusion promotes nitric oxide-dependent vasodilation, increases regional cerebral blood flow, and reduces infarction volume in the rat. *Stroke* 25:429-35.

Moro MA, De Alba J, Leza JC, Lorenzo P, Fernández AP, Ventura MI, Boscá L, Rodrigo J, Lizasoain I (1998). Neuronal expresión of inducible nitric oxide synthase after oxygen and glucose deprivation in rat forebrain slices. *Eur J Neurosci* 10:445-56.

Moro MA, De Alba J, Cárdenas A, De Cristóbal J, Leza JC, Lizasoain I, Díaz-Guerra MJM, Boscá L, Lorenzo P (2000). Mechanisms of the neuroprotective effect of aspirin after oxygen and glucose deprivation in rat forebrain slices. *Neuropharmacology* 39:1309-18.

Moro MA, Cárdenas A, Hurtado O, Leza JC, Lizasoain I (2004). Role of nitric oxide after brain ischemia. *Cell Calcium* 36:265-75.

Morris, BJ (1995). Stimulation of immediate early gene expression in striatal neurons by nitric oxide. *J Biol Chem* 270:24740-4.

Müller A, Cadenas E, Graf P, Sies H (1984). A novel biologically active seleno-organic compound – I, glutathione peroxidase-like activity in vitro and antioxidant capacity of PZ51 (Ebselen). *Biochem Pharmacol* 33:3235-9.

Murphy S (2000). Production of nitric oxide by glial cells: regulation and potential roles in the CNS. *Glia* 29:1-14.

Nagafuji T, Sugiyama M, Muto A, Makino T, Miyauchi T, Nabata H (1995). The neuroprotective effects of a potent and selective inhibitor of type I NOS (L-MIN) in a rat model of focal cerebral ischaemia. *NeuroReport* 6:1541-5.

Nagasawa H, Kogure K (1989). Correlation between cerebral blood flow and histologic changes in a new rat model of middle cerebral artery occlusion. *Stroke* 20:1037-43.

Namiki A, Brogi E, Kearney M, Kim EA, Wu T, Couffinhal T, Varicovski L, Isner JM (1995). Hypoxia induces vascular endothelial growth factor in cultured human endothelial cells. *J Biol Chem* 270:31189-95.

Namura S, Nagata I, Takami S, Masayasu H, Kikuchi H (2001). Ebselen reduces cytochrome c release from mitochondria and subsequent DNA fragmentation after transient focal cerebral ischemia in mice. *Stroke* 32:1906-11.

Nevalainen TJ, Haapamaki MM, Gronroos JM (2000). Roles of secretory phospholipase A₂ in inflammatory diseases and trauma. *Biochim Biophys Acta* 1488:83-90.

Niessen HWM, Krijnen PAJ, Visser CA, Meijer CJLM, Hack CE (2003). Type II secretory phospholipase A₂ in cardiovascular disease: a mediator in atherosclerosis and ischemic damage to cardiomyocytes? *Cardiovasc Res* 60:68-77.

NINDS rt-PA stroke study group (1995). Tissue plasminogen activator for acute ischemic stroke. *N Engl J Med* 333:1581-7.

Nishikawa T, Kirsch JR, Koehler RC, Bredt DS, Snyder SH, Traystman RJ (1993). Effect of nitric oxide synthase inhibition on cerebral blood flow and injury volume during focal ischemia in cats. *Stroke* 24:1717-24.

O'Regan MH, Smith-Barbour M, Perkins LM, Phillis JW (1995). A possible role for phospholipases in the release of neurotransmitter amino acids from ischemic rat cerebral cortex. *Neurosci Lett* 185: 191-4.

Ogawa A, Yoshimoto T, Kikuchi H, Sano K, Saito I, Yamaguchi T, Yasuhara H, for the Ebselen Study Group (1999). Ebselen in acute middle cerebral artery occlusion: a placebo-controlled, double-blind clinical trial. *Cerebrovasc Dis* 9:112-8.

Ohkuma S, Narihara H, Katsura M, Hasegawa T, Kuriyama K (1995). Nitric oxide-induced [³H]GABA release from cerebral cortical neurons is mediated by peroxynitrite. *J Neurochem* 65:1109-14.

Ohkuma S, Katsura M (2001). Nitric oxide and peroxynitrite as factors to stimulate neurotransmitter release in the CNS. *Prog Neurobiol* 64:97-108.

Okada Y, Copeland BR, Fitridge R, Koziol JA, del Zoppo GJ (1994). Fibrin contributes to microvascular obstructions and parenchymal changes during early focal cerebral ischemia and reperfusion. *Stroke* 25:1847-54.

Oliver CN (1987). Inactivation of enzymes and oxidative modification of proteins by stimulated neutrophils. *Arch Biochem Biophys* 253:62-72.

Oliver CN, Starke-Reed PE, Stadtman ER, Liu GJ, Carney JM, Floyd RA (1990). Oxidative damage to brain proteins, loss of glutamine synthetase activity, and production of free radicals during ischemia/reperfusion-induced injury to gerbil brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 87:5144-7.

Opdenakker G, Van den Steen PE, Dubois B, Nelissen I, Van Coillie E, Masure S, Proost P, van Damme J (2001). Gelatinase B functions as regulator and effector in leukocyte biology. *J Leukoc Biol* 69:851-9.

Palmer HJ, Paulson KE (1997). Reactive oxygen species and antioxidants in signal transduction and gene expression. *Nutr Rev* 55:353-61.

Parmentier, S, Bohme, GA, Lerouet D, Damour D, Stutzmann JM, Margail L, Plotkine M (1999). Selective inhibition of inducible nitric oxide synthase prevents ischemic brain injury. *Br J Pharmacol* 127:546-52.

Parmentier-Batteur S, Bohme GA, Lerouet D, Zhou-Ding L, Beray V, Margail I, Plotkine M (2001). Antisense oligodeoxynucleotide to inducible nitric oxide synthase protects against transient focal cerebral ischemia-induced brain injury. *J Cereb Blood Flow Metab* 21:15-21.

Parnham M, Sies H (2000). Ebselen: prospective therapy for cerebral ischemia. *Expert Opin Investig Drugs* 9:607-19.

Paut O, Lazzell VA, Bissonnette B (2000). The effect of low concentrations of halothane on the cerebrovascular circulation in young children. *Anaesthesia* 55:528-31.

Payá M, Terencio MC, Ferrándiz ML, Alcaraz MJ (1996). Involvement of secretory phospholipase A₂ activity in the zymosan rat air pouch model of inflammation. *Br J Pharmacol* 117:1773-9.

Perry SW, Norman JP, Litzburg A, Gelbard H (2004). Antioxidants are required during the early critical period, but not later, for neuronal survival. *J Neurosci Res* 78:485-92.

Peters O, Back T, Lindauer U, Busch C, Megow D, Dreier J, Dirnagl U (1998). Increased formation of reactive oxygen species after permanent and reversible middle cerebral artery occlusion in the rat. *J Cereb Blood Flow Metab* 18:196-205.

Peunova N, Enikolopov G (1993). Amplification of calcium-induced gene transcription by nitric oxide in neuronal cells. *Nature* 364:450-3.

Peunova N, Enikolopov G (1995). Nitric oxide triggers a switch to growth arrest during differentiation of neuronal cells. *Nature* 375:68-73.

Phillis JW, O'Regan MH (1996). Mechanisms of glutamate and aspartate release in the ischemic rat cerebral cortex. *Brain Res* 730:150-64.

Phillis JW, O'Regan MH (2003). Characterization of modes of release of amino acids in the ischemic/reperfused rat cerebral cortex. *Neurochem Int* 43:461-7.

Phillis JW, O'Regan MH (2004). A potentially critical role of phospholipases in central nervous system ischemic, traumatic and neurodegenerative disorders. *Brain Res Rev* 44:13-47.

Pieper AA, Verna A, Zhang J, Snyder SH (1999). Poli (ADP-ribose) polymerase, nitric oxide and cell death. *Trends Pharmacol Sci* 20:171-81.

Pigeolet E, Remacle J (1991). Susceptibility of glutathione peroxidase to proteolysis after oxidative alteration by peroxides and hydroxyl radicals. *Free Radic Biol Med* 11:191-5.

Pilitsis JG, Diaz FG, O'Regan MH, Phillis JW (2002). Differential effects of phospholipase inhibitors on free fatty acid efflux in rat cerebral cortex during ischemia-reperfusion injury. *Brain Res* 951:96-106.

Pilz RB, Suhasini M, Idriss S, Meinkoth JL, Boss GR (1995). Nitric oxide and cGMP analogs activate transcription from AP-1-responsive promoters in mammalian cells. *FASEB J* 9:552-8.

Polidori MC, Frei B, Cherubini A, Nelles G, Rordorf G, Keaney Jr JF, Schwamm L, Mecocci P, Koroshetz WJ, Beal MF (1998). Increased plasma levels of lipid hydroperoxides in patients with ischemic stroke. *Free Radic Biol Med* 25:561-7.

Potts BC, Faulkner DJ, Jacobs RS (1992). Phospholipase A₂ inhibitors from marine organisms. *J Nat Prod* 55:1701-17.

Prado R, Watson BD, Kuluz J, Deitrich D (1992). Endothelium derived nitric oxide synthase inhibition. Effects on cerebral blood flow, pial artery diameter and vascular morphology in rats. *Stroke* 23:1118-24.

Prast H, Tran MH, Fischer H, Philippu A (1998). Nitric oxide-induced release of acetylcholine in the nucleus accumbens: role of cyclic GMP, glutamate, and GABA. *J Neurochem* 71:266-73.

Pulsinelli WA, Buchan AM (1988). The four-vessel occlusion rat model: method for complete occlusion of vertebral arteries and control of collateral circulation. *Stroke* 19: 913-914.

Purves MJ (1972). *The physiology of the cerebral circulation*. Cambridge University Press, Cambridge, England, pags. 1-420.

Quast MJ, Wei J, Huang NC (1995). Nitric oxide synthase inhibitor N^G-nitro-L-arginine methyl ester decreases ischemic damage in reversible focal cerebral ischemia in hyperglycemic rats. *Brain Res* 677:204-12.

Rabin M, Ferguson-Smith A, Hart CP, Ruddle F (1986). Cognate homeo-box loci mapped on homologous human and mouse chromosomes. *Proc Natl Acad Sci USA* 83:9104-8.

Racek J, Holecek V, Sedláček D, Panzner P (2001). Free radicals in immunology and infectious diseases. *Epidemiol Mikrobiol Imunol* 50:87-91.

Radi R, Beckman JS, Bush KM, Freeman BA (1991). Peroxynitrite oxidation of sulfhidrils. The cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *J Biol Chem* 266:4244-50.

Radomski MW, Palmer RMJ, Moncada S (1987). The role of nitric oxide and cGMP in platelet adhesion to vascular endothelium. *Biochem Biophys Res Commun* 148:1482-9.

RANTTAS Investigators, The (1996). A randomized tirilazad mesilate in patients with acute stroke (RANTTAS). *Stroke* 27:1453-8.

Reed DJ, Babson JR, Beatty PW, Brodie AE, Ellis WW, Potter DW (1980). High-performance liquid chromatography analysis of nanomole levels of glutathione, glutathione disulfide, and related tilos and disulfides. *Anal Biochem* 106:55-62.

- Rees DD, Palmer RMJ, Schulz R, Hodson HF, Moncada S (1990). Characterization of three inhibitors of endothelial nitric oxide synthase in vitro and in vivo. *Br J Pharmacol* 101:746-52.
- Rehncrona S, Westerberg E, Akesson B, Siesjö BK (1982). Brain cortical fatty acids and phospholipids during and following complete and severe incomplete ischemia. *J Neurochem* 38:84-93.
- Relton JK, Strijbos PJ, O'Shaughnessy CT, Carey F, Forder RA, Tilders FJ, Rothwell NJ (1991). Lipocortin-1 is an endogenous inhibitor of ischemic damage in the rat brain. *J Exp Med* 174:305-10.
- Riepe MW, Phys D, Kasischke K, Raupach A (1997). Acetylsalicylic acid increases tolerance against hypoxic and chemical hypoxia. *Stroke* 28:2006-11.
- Risau W, Esser S, Engelhardt B (1998). Differentiation of blood-brain barrier endothelial cells. *Pathol Biol (Paris)* 46:171-5.
- Rossi DJ, Oshima T, Attwell D (2000). Glutamate release in severe brain ischaemia is mainly by reversed uptake. *Nature* 403:316-21
- Safayhi H, Tiegs G, Wendel A (1985). A novel biologically active seleno-organic compound – V. Inhibition by Ebselen (PZ51) of rat peritoneal neutrophil lipooxygenase. *Biochem Pharmacol* 34:2691-4.
- Saito I, Asano T, Sano K, Takakura K, Abe H, Yoshimoto T, Kikuchi H, Ohta T, Ishibashi S (1998). Neuroprotective effect of an antioxidant, ebselen, in patients with delayed neurological deficits after aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *Neurosurgery* 42:269-77.

Salom JB, Orti M, Centeno JM, Torregrosa G, Alborch E (2000). Reduction of infarct size by the NO donors sodium nitroprusside and spermine/NO after transient focal cerebral ischemia in rats. *Brain Res* 865:149-56.

Salvi A, Carrupt P, Tillement J, Testa B (2001). Structural damage to proteins caused by free radicals: assessment, protection by antioxidants, and influence of protein binding. *Biochem Pharmacol* 61:1237-42.

Samson FE, Nelson SR (2000). The aging brain, metals and oxygen free radicals. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 46:699-707.

Santos MS, Moreno AJ, Carvalho AP (1996). Relationships between ATP depletion, membrane potential, and the release of neurotransmitters in rat nerve terminals. An in vitro study under conditions that mimic anoxia, hypoglycemia, and ischemia. *Stroke* 27:941-50.

Sapirstein A, Bonventre JV (2000). Specific physiological roles of cytosolic phospholipase A2 as defined by gene knockouts. *Biochim Biophys Acta* 1488:139-48.

Schmid-Elsaesser R, Zausinger S, Hungerhuber E, Plesnila N, Baethmann A, Reulen H-J (1997). Superior neuroprotective efficacy of a novel antioxidant (U-101033E) with improved blood-brain barrier permeability in focal cerebral ischemia. *Stroke* 28:2018-24.

Schmid-Elsaesser R, Zausinger S, Hungerhuber E, Baethmann A, Reulen H-J (1998). A critical reevaluation of the intraluminal thread model of focal cerebral ischemia. Evidence of inadvertent premature reperfusion and subarachnoid hemorrhage in rats by laser-Doppler flowmetry. *Stroke* 29: 2162-70

Schmid-Elsaesser R, Hungerhuber E, Zausinger S, Baethmann A, Reulen H-J (1999a). Neuroprotective efficacy of combination therapy with two different antioxidants in rats subjected to transient focal ischemia. *Brain Res* 816:471-9.

Schmid-Elsaesser R, Zausinger S, Hungerhuber E, Baethmann A, Reulen HJ (1999b). Neuroprotective efficacy of combination therapy with tirilazad and magnesium in rats subjected to transient focal cerebral ischemia. *Neurosurgery* 44:163-71.

Schuman EM, Madison DV (1991). A requirement for the intercellular messenger nitric oxide in long term potentiation. *Science* 254:1503-6.

Serena J, Leira R, Castillo J, Pumar JM, Castellanos M, Dávalos A (2001). Neurological deterioration in acute lacunar infarctions. The role of excitatory and inhibitory neurotransmitters. *Stroke* 32: 1154-61.

Sharonov BP, Churilova IV (1992). Inactivation and oxidative modification of CuZn superoxide dismutase by stimulated neutrophils: the appearance of new catalytically active structures. *Biochem Biophys Res Commun* 189:1129-35.

Shaw CA, Bains JS (2002). Synergistic versus antagonistic actions of glutamate and glutathione: the role of excitotoxicity and oxidative stress in neuronal disease. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 48:127-36.

Shigeno T, Teasdale GM, McCulloch J, Graham DI (1985). Recirculation model following MCA occlusion in rats. Cerebral blood flow, cerebrovascular permeability and brain edema. *J Neurosurg* 63:272-7.

Shohami E, Rosenthal J, Lavy S (1982). The effect of incomplete cerebral ischemia on prostaglandin levels in rat brain. *Stroke* 13:494-9.

Shohami E, Beit-Yannai E, Horowitz M, Kohen R (1997). Oxidative stress in closed head injury: brain antioxidant capacity as indicator of functional outcome. *J Cereb Blood Flow Metab* 17:1007-19.

Siesjö BK, Ljunggren B (1973). Cerebral energy reserves after prolonged hypoxia and ischemia. *Arch Neurol* 29:400-7.

Siesjö BK (1981). Cell damage in the brain: a speculative synthesis. *J Cereb Blood Flow Metab* 3:170-82.

Siesjö BK (1990). Calcium in the brain under physiological and pathological conditions. *Eur Neurol* 30: 3-9.

Six DA, Dennis EA (2000). The expanding superfamily of phospholipase A₂ enzymes: classification and characterization. *Biochim Biophys Acta* 1488:1-19.

Soriano MA, Sanz O, Ferrer I, Planas AM (1997). Cortical infarct volume is dependent on the ischemic reduction of perifocal cerebral blood flow in a three-vessel intraluminal MCA occlusion/reperfusion model in the rat. *Brain Res* 747:273-8.

Stewart TL, Michel AD, Black MD, Humphrey PPA (1996). Evidence that nitric oxide causes calcium-independent release of [³H]dopamine from rat striatum in vitro. *J Neurochem* 66:131-7.

Stewart VC, Heales SJR (2003). Nitric oxide-induced mitochondrial dysfunction: implications for neurodegeneration. *Free Rad Biol Med* 34:287-303.

Stoian I, Oros A, Moldoveanu E (1996). Apoptosis and free radicals. *Biochem Mol Med* 59:93-7.

Sun GY, Xu J, Jensen MD, Simonyi A (2004). Phospholipase A₂ in the central nervous system: implications for neurodegenerative diseases. *J Lipid Res* 45:205-13.

Symon L, Pasztor E, Branston NM (1974). The distribution and density of reduced cerebral blood flow following acute middle cerebral artery occlusion: an experimental study by the technique of hydrogen clearance in baboons. *Stroke* 5:255-64.

Szabó C (1996). Physiological and pathophysiological roles of nitric oxide in the central nervous system. *Brain Res Bull* 41:131-41.

Taguchi J, Graf R, Rosner G, Heiss WD (1996). Prolonged transient ischemia results in impaired CBF recovery and secondary glutamate accumulation in cats. *J Cereb Blood Flow Metab* 16:271-9.

Takasago T, Peters EE, Graham DI, Masayasu H, Macrae IM (1997). Neuroprotective efficacy of ebselen, an anti-oxidant with anti-inflammatory actions, in a rodent model of permanent middle cerebral artery occlusion. *Br J Pharmacol* 122:1251-6.

Takeda Y, Jacewicz M, Takeda Y, Nowak TS Jr, Pulsinelli WA (1993). DC-potential and energy metabolites in the focal ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 13:S450.

Takita M, Kaneko H, Suzuki SS, Akamatsu M (1997). Lasting effect of NO on glutamate release in rat striatum revealed by continuous brain dialysis. *Neuroreport* 8:567-70.

Tamura A, Graham DI, McCulloch J, Teasdale GM (1981). Focal cerebral ischemia in the rat: Description of technique and early neuropathological consequences following middle cerebral artery occlusion. *J Cereb Blood Flow Metab* 1:53-60.

Tanaka K, Shirai T, Nagata E, Dembo T, Fukuuchi Y (1997). Immunohistochemical detection of nitrotyrosine in postischemic cerebral cortex in gerbil. *Neurosci Lett* 235:85-8.

Temiz C, Tun K, Caglar-Ugur H, Dempsey RJ, Egemen N (2003). L-arginine in focal cerebral ischemia. *Neurol Res* 25:465-70.

Terada LS, Leff JA, Guidot DM, Willingham IR, Repine JE (1991). Inactivation of xanthine oxidase by hydrogen peroxide involves site-directed hydroxyl radical formation. *Free Radic Biol Med* 10:61-8.

Thommesen L, Sjursen W, Gåsvik K, Hanssen W, Brekke OL, Skattebøl L, Holmeide AK, Espevik T, Johansen B, Laegreid A (1998). Selective inhibitors of cytosolic or secretory phospholipase A₂ block TNF-induced activation of transcription factor nuclear factor-kappa B and expression of ICAM-1. *J Immunol* 161:3421-30.

Thwin MM, Ong WY, Fong CW, Sato K, Kodama K, Farooqui AA, Gopalakrishnakone P (2003). Secretory phospholipase A₂ activity in the normal and kainate-injected rat brain, and inhibition by a peptide derived from python serum. *Exp Brain Res* 150: 427-433.

Till GO, Friedl HP, Ward PA (1991). Lung injury and complement activation: Role of neutrophils and xanthine oxidase. *Free Radic Biol Med* 10:379-86.

Tominaga T, Sato S, Ohnishi T, Onishi ST (1993). Potentiation of nitric oxide formation following bilateral carotid occlusion and focal cerebral ischemia in the rat: in vivo detection of the nitric oxide radical by electron paramagnetic resonance spin trapping. *Brain Res* 614:342-6.

Trabace L, Kendrick KM (2000). Nitric oxide can differentially modulate striatal neurotransmitter concentrations via soluble guanylate cyclase and peroxynitrite formation. *J Neurochem* 75:1664-74.

Tsutsumi K, Shibata S, Inoue M, Mori K (1986). Experimental cerebral infarction in the dog. Ultrastructural study of microvessels in subacute cerebral infarction. *Neurol Med Chir (Tokyo)* 27:73-7.

Utepbergenov DI, Mertsch K, Sporbert A, Tenz K, Paul M, Haseloff RF, Blasig IE (1998). Nitric oxide protects blood-brain barrier in vitro from hypoxia reoxygenation-mediated injury. *FEBS Lett* 424:197-201.

Vadas P, Stefanski E, Pruzanski W (1985). Characterization of extracellular phospholipase A₂ in rheumatoid synovial fluid. *Life Sci* 36:579-87.

Varner JA, Brooks PC, Cheresch DA (1995). The integrin $\alpha_v\beta_3$: angiogenesis and apoptosis. *Cell Adhes Commun* 3:367-74.

Wallin C, Weber SG, Sandberg M (1999). Glutathione efflux induced by NMDA and kainate: implications in neurotoxicity. *J Neurochem* 73:1566-72.

Warner DS (2000). Isoflurane neuroprotection. A passing fantasy, again?. *Anesthesiology* 92:1226-8.

Wei S, Ong WY, Thwin MM, Fong CW, Farooqui AA, Gopalakrishnakone P, Hong W (2003). Group IIA secretory phospholipase A₂ stimulates exocytosis and neurotransmitter release in pheochromocytoma-12 cells and cultured rat hippocampal neurons. *Neuroscience* 121: 891-8.

Weitzberg E, Lundberg JO (1998). Nonenzymatic nitric oxide production in humans. *Nitric Oxide: Biology and Chemistry* 2:1-7.

White AA, Crawford KM, Patt CS, Lad PJ (1976). Activation of soluble guanylate cyclase from rat lung by incubation or by hydrogen peroxide. *J Biol Chem* 251:7304-12.

Willmot MR, Bath PMW (2003). The potential of nitric oxide therapeutics in stroke. *Expert Opin Investig Drugs* 12:455-70.

Wilson JX, Gelb AW (2002). Free radicals, antioxidants, and neurologic injury: possible relationship to cerebral protection by anesthetics. *J Neurosurg Anesthesiol* 14:66-79.

Wink DA, Hanbauer I, Krishna MC, Degraff W, Gamson J, Mitchell JB (1993). Nitric oxide protects against cellular damage and cytotoxicity from reactive oxygen species. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:9813-7.

Winkler JD, Bolognese BJ, Roshak AK, Sung CM, Marshall LA (1997). Evidence that 85 kDa phospholipase A₂ is not linked to CoA-independent transacylase-mediated production of platelet-activating factor in human monocytes. *Biochim Biophys Acta* 1346:173-84.

Wolff DJ, Lubeskie A (1995). Aminoguanidine is an isoform-selective, mechanism-based inactivator of nitric oxide synthase. *Arch Biochem Biophys* 316:290-301.

Wolf MJ, Izumi Y, Zorumski CF, Gross RW (1995). Long-term potentiation requires activation of calcium-independent phospholipase A₂. *FEBS Lett* 377:358-62.

Xiao YF, Zeind AJ, Kaushik V, Perreault-Micale CL, Morgan JP (2000). Mechanism of suppression of cardiac L-type Ca²⁺ currents by the phospholipase A₂ inhibitor mepacrine. *Eur J Pharmacol* 399:107-16.

Yagami T, Ueda K, Asakura K, Hata S, Kuroda T, Sakaeda T, Takasu N, Tanaka K, Gamba T, Hori Y (2002a). Human group IIA secretory phospholipase A₂ induces neuronal cell death via apoptosis. *Mol Pharmacol* 61:114-26.

Yagami T, Ueda K, Asakura K, Hayasaki-Kajiwara Y, Nakazato H, Sakaeda T, Hata S, Kuroda T, Takasu N, Hori Y (2002b). Group IB secretory phospholipase A₂ induces neuronal cell death via apoptosis. *J Neurochem* 81:449-61.

Yamaguchi T, Sano K, Takakura K, Saito I, Shinohara Y, Asano T, Yasuhara H (1998). Ebselen in acute ischemic stroke. A placebo-controlled, double-blind clinical trial. *Stroke* 29:12-7.

Yanaka K, Spellman SR, McCarthy JB, Low WC, Camarata PJ (1996). Reduction of brain injury using heparin to inhibit leukocyte accumulation in a rat model of transient focal cerebral ischemia. II. Dose-response effect and the therapeutic window. *J Neurosurg* 85:1108-12.

Yang G, Chan PH, Chen J, Carlson E, Chen SF, Weinstein P, Epstein CJ, Kamii H (1994). Human copper-zinc superoxide dismutase transgenic mice are highly resistant to reperfusion injury after focal cerebral ischemia. *Stroke* 25:165-70

Yao H, Ginsberg MD, Eveleth DD, LaManna JC, Watson BD, Alonso OF, Loor JY, Foreman JH, Busto R (1995). Local cerebral glucose utilization and cytoskeletal proteolysis as indices of evolving focal ischemic injury in core and penumbra. *J Cereb Blood Flow Metab* 15:398-408.

Yeo JF, Ong WY, Ling SF, Farooqui AA (2004). Intracerebroventricular injection of phospholipases A₂ inhibitors modulates allodynia after facial carrageenan injection in mice. *Pain* 112: 148-155.

Yokota Y, Hanasaki K, Ono T, Nakazato H, Kobayashi T, Arita H (1999). Suppression of murine endotoxic shock by sPLA₂ inhibitor, indoxam, through group IIA sPLA₂-independent mechanisms. *Biochim Biophys Acta* 1438:213-22.

Yoshida T, Limmroth V, Irikura K, Moskowitz MA (1994). The NOS inhibitor, 7-nitroindazole, decreases focal infarct volume but not the response to acetylcholine in pial vessels. *J Cereb Blood Flow Metab* 14:924-9.

Zea Longa E, Weinstein PR, Carlson S, Cummings R (1989). Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *Stroke* 20:84-91.

Zhang J, Snyder SH (1992). Nitric oxide stimulates auto ADP-ribosylation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:9382-5.

Zhang J, Dawson VL, Dawson TM, Snyder SH (1994a). Nitric oxide activation of poly (ADP-ribose) synthetase in neurotoxicity. *Science* 263:687-9.

Zhang WW, Ma KC, Andersen O, Sourander P, Tolleson PO, Olsson Y (1994b). The microvascular changes in cases of hereditary multi-infarct disease of the brain. *Acta Neuropathol (Berl)* 87:317-24.

Zhang F, Xu S, Iadecola C (1995). Time dependence of effect of nitric oxide synthase inhibition on cerebral ischemic damage. *J Cereb Blood Flow Metab* 15:595-601.

Zhang ZG, Reif D, MacDonald J, Tang WX, Kamp DK, Gentile RJ, Shakespeare WC, Murray RJ, Chopp M (1996). ARL 17477, a potent and selective neuronal NOS inhibitor decreases infarct volume after transient middle cerebral artery occlusion in rats. *J Cereb Blood Flow Metab* 16:599-604.

Zhang Y, Lemasters J, Herman B (1999). Secretory group IIA phospholipase A₂ generates anti-apoptotic survival signals in kidney fibroblasts. *J Biol Chem* 274: 27726-33.

Zhang ZG, Zhang L, Jiang Q, Zhang R, Davies K, Powers G, Bruggen N, Chopp M (2000). VEGF enhances angiogenesis and promotes blood-brain barrier leakage in the ischemic brain. *J Clin Invest* 106:829-38.

Zukin RS, Jover T, Yokota H, Calderone A, Simionescu M, Lau CG (2004). Molecular and Cellular Mechanisms of Ischemia-induced neuronal death. En: *Stroke: Pathophysiology, Diagnosis, and Management*. Mohr JP, Choi DW, Grotta JC, Weir B, Wolf PA (Eds.), Churchill-Livingstone, Philadelphia, pags. 829-854.