



UNIVERSITAT DE VALÈNCIA
PROGRAMA DE DOCTORADO EN FISIOLÒGIA

TESIS DOCTORAL

**EVALUACIÓN DEL POTENCIAL NEUROPROTECTOR DEL PÉPTIDO
ATRIAL NATRIURÉTICO (ANP) EN EL ICTUS ISQUÉMICO
ASOCIADO A LA DIABETES**

Presentada por:

Dña. Mikahela López Morales

Directores:

Dr. Francisco Javier Miranda Alonso

Dr. José María Centeno Guil

Dra. María Consuelo Burguete López

Valencia, mayo de 2017

D. **FRANCISCO JAVIER MIRANDA ALONSO**, Catedrático del Dpto. de Fisiología de la Universitat de València, D. **JOSÉ MARÍA CENTENGO GUIL**, Profesor Contratado Doctor del Dpto. de Fisiología de la Universitat de València, Dña. **MARÍA CONSUELO BURGUETE LÓPEZ**, Profesora Contratada Doctora del Dpto. de Fisiología de la Universitat de València.

CERTIFICAN:

Que la presente memoria, titulada **“Evaluación del potencial neuroprotector del péptido atrial natriurético (ANP) en el ictus isquémico asociado a la diabetes”**, corresponde al trabajo realizado bajo su dirección por Dña. **MIKAHELA ANDREA LÓPEZ MORALES**, para su presentación como Tesis Doctoral en el Programa de Doctorado en Fisiología de la Universitat de València.

Y para que conste firman el presente certificado en Valencia, a 24 de mayo de 2017.

Dr. Francisco J. Miranda Dr. José M Centeno Dra. M Consuelo Burguete

RESUMEN

El ictus es una de las primeras causas de muerte, discapacidad permanente y demencia en el mundo. Del total de ictus, el 85% son de tipo isquémico y el 15% restante son de tipo hemorrágico. Aparte de la prevención, el único tratamiento establecido para el ictus isquémico agudo consiste en disolver farmacológicamente o retirar mecánicamente el trombo que ocluye la arteria. La neuroprotección no ha conseguido salvar la brecha entre el laboratorio y la clínica, es por esto que la protección farmacológica del cerebro y la recuperación funcional, a través de la plasticidad neuronal inducida y la reparación, siguen siendo los objetivos centrales de la investigación en ictus. En la búsqueda de nuevas terapias y agentes neuroprotectores más efectivos para el tratamiento del ictus isquémico agudo, el sistema de los péptidos natriuréticos representa una fuerte alternativa.

El objetivo genérico del presente trabajo de investigación es evaluar a nivel preclínico el potencial neuroprotector del péptido atrial natriurético (ANP) en el ictus isquémico, los efectos vasoactivos del ANP en las arterias cerebrales y su posible alteración por la diabetes, utilizando modelos animales de ictus y diabetes.

El ANP redujo el daño cerebral isquémico provocado por un ictus en ratas. Cuando se administró localmente y de forma precoz tras un episodio de isquemia focal transitoria, el ANP mejoró el deterioro neurofuncional, redujo el volumen de infarto y disminuyó la muerte celular apoptótica. La disminución de la expresión de los receptores para el ANP (NPR-A y de NPR-C) puede tener un rol en la fisiopatología del ictus isquémico, pero no

hubo un efecto del ANP sobre la expresión de sus receptores en el tejido cerebral isquémico que contribuya a la neuroprotección inducida por el péptido. El ictus redujo de forma específica la expresión de los canales de K^+ sensibles a ATP (K_{ATP}) en el tejido cerebral isquémico, y la recuperación parcial de la expresión de estos canales por el ANP podría contribuir al efecto neuroprotector del péptido. El ictus reguló al alza en el tejido cerebral isquémico las vías de señalización PI3K/Akt y MAPK/ERK1/2 implicadas en la apoptosis. El ANP no modificó la vía PI3K/Akt, pero sí produjo una reducción en la expresión de p-ERK2 que, al atenuar la cascada apoptótica, podría contribuir a la neuroprotección. El ANP relajó de forma endotelio-dependiente la arteria basilar de conejo, probablemente por su interacción con los receptores NPR-A y NPR-C. El óxido nítrico (NO) media la relajación inducida por el ANP. Por otro lado, prostanoïdes vasoconstrictores como el tromboxano A_2 y vasodilatadores como la prostaciclina también modularon la respuesta relajante a ANP con una contribución neta vasoconstrictora. El flujo saliente de K^+ en el músculo liso estuvo implicado en la relajación, con los tres subtipos de canales de K^+ (K_V , BK_{Ca} y K_{ATP}) como efectores. La diabetes produjo un incremento en la sensibilidad de la arteria basilar a ANP. Esta mayor sensibilidad resulta de la reducción en la expresión del receptor NPR-C y de una mayor participación de los canales K_{ATP} y K_V . Además, la diabetes produjo una disminución en la liberación endotelial de NO y de prostaciclina.

Tanto el efecto antiapoptótico del ANP en el tejido cerebral como su efecto relajante en las arterias cerebrales contribuirían a la

neuroprotección que reduce el daño cerebral isquémico provocado por el ictus. No obstante, la diabetes es una comorbilidad frecuente en el ictus, y sus efectos tanto sobre la reactividad cerebrovascular, así como eventualmente sobre la capacidad antiapoptótica del ANP deben tenerse en cuenta.

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

4-AP	4-aminopiridina
AA	ácido araquidónico
ACM	arteria cerebral media
AGEs	productos finales de glucosilación avanzada
Akt	proteína quinasa B
ANP	péptido atrial natriurético
ATP	trifosfato de adenosina
BK _{Ca}	canales de potasio activados por calcio
BNP	péptido natriurético tipo B
Ca ²⁺	calcio
cAMP	AMP cíclico
cGMP	GMP cíclico
CNP	péptido natriurético tipo C
COX	ciclooxigenasa
EDH	hiperpolarización dependiente de endotelio
EDHF	factor hiperpolarizante derivado del endotelio
EEM	error estándar de la media
eNOS	óxido nítrico sintasa endotelial
ERK	kinasa regulada por señales extracelulares
EROs	especies reactivas de oxígeno
GC	guanilato ciclasa
H ₂ O ₂	peróxido de hidrogeno
ICAM-1	moléculas de adhesión intracelular 1

ICV	intracerebroventricular
IFT	isquemia focal transitoria
iNOS	óxido nítrico sintasa inducible
K ⁺	potasio
K _{ATP}	canales de potasio sensibles a ATP
K _V	canales de potasio dependientes de voltaje
LDF	fluximetría láser Doppler
LDL	lipoproteínas de baja densidad
L-NOArg	<i>N</i> ^G -nitro-L-arginina
NF-κB	factor nuclear kappa-B
NO	óxido nítrico
NOS	óxido nítrico sintasa
NPR-A	receptor del péptido natriurético tipo A
NPR-B	receptor del péptido natriurético tipo B
NPR-C	receptor del péptido natriurético tipo C
O ₂ ⁻	anión superóxido
ONOO ⁻	peroxinitrito
p-Akt	proteína quinasa B fosforilada
PAS	presión arterial sistémica
PBS	tampón fosfato salino
PC	perfusión cerebrocortical
p-ERK	kinasa regulada por señales extracelulares fosforilada
pGC	guanilato ciclasa particulada
PGI ₂	prostaciclina
PKA	proteína kinasa A

PKC	proteína kinasa C
PKG	proteína kinasa dependiente de cGMP
RL	radicales libres
sGC	guanilato ciclasa soluble
TIA	accidente isquémico transitorio
TXA ₂	tromboxano A ₂
UTP	uridina trifosfato
VCAM-1	moléculas de adhesión vascular 1

Índice

Introducción.....	1
1. Ictus: definición y tipos.....	3
2. Etiología del ictus isquémico	4
3. Fisiopatología del ictus isquémico: mecanismos de muerte celular.....	4
3.1. Eventos temporales y espaciales después de un ictus	4
3.2. Mecanismos de muerte celular	6
3.2.1. Excitotoxicidad	6
3.2.2. Estrés oxidativo.....	8
3.2.3. Apoptosis	10
3.2.4. Vías de supervivencia.....	13
4. Epidemiología y carga del ictus: morbimortalidad, discapacidad y demencia	16
5. Tratamiento del ictus: prevención, recanalización, neuroprotección y rehabilitación.....	17
6. Reactividad vascular y diabetes.....	20
6.1. Regulación del tono vascular	22
6.1.1. Óxido nítrico (NO)	23
6.1.2. Prostanoides	27
6.1.3. Factor hiperpolarizante derivado del endotelio (EDHF).....	32
6.1.4. Canales de K ⁺ y tono vascular	34
6.2. Complicaciones vasculares de la diabetes.....	35
6.3. Alteraciones cerebrovasculares de la diabetes e ictus.....	45

7. El sistema de péptidos natriuréticos en el ictus: ANP como opción terapéutica	46
7.1. El sistema de péptidos natriuréticos: péptidos, receptores y aplicación clínica.....	46
7.2. Péptidos natriuréticos y diabetes.....	51
7.3. Péptidos natriuréticos en el sistema nervioso central: funciones y potencial neuroprotector	52
7.4. Péptido atrial natriurético en el ictus: biomarcador y herramienta terapéutica	52
7.5. Efectos vasoactivos del ANP: circulación cerebral	54
Objetivos	57
Material y métodos	61
1. Animales de experimentación	63
2. Ictus isquémico en rata	63
2.1. Oclusión transitoria de la arteria cerebral media mediante la técnica del filamento intraluminal.....	63
2.2. Evaluación del daño cerebral isquémico.....	69
2.2.1. Valoración neurofuncional	69
2.2.2. Evaluación del volumen de infarto cerebral	70
3. Reactividad vascular en arteria basilar de conejo aislada	72
3.1. Obtención y montaje de los segmentos arteriales	72
3.2. Registro de la tensión isométrica	72
4. Diabetes experimental en conejo	74

5. TUNEL (“Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling”)	75
6. Caspasa-3 activada	76
7. Western blot (WB).....	77
8. Elisa (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay).....	78
9. Protocolos experimentales.....	79
9.1. Efectos del ANP en el ictus isquémico	79
9.1.1. Grupos experimentales y tratamientos.....	80
9.1.2. Efectos sobre el daño cerebral	81
9.1.3. Efectos sobre la apoptosis	81
9.1.4. Efectos sobre la expresión de receptores NPR, canales de K ⁺ y vías de señalización apoptótica	82
9.2. Efectos del ANP en arteria basilar	83
9.2.1. Grupos experimentales.....	83
9.2.2. Efectos vasoactivos	84
9.2.3. Efectos sobre la liberación de prostanoïdes.....	85
9.2.4. Efectos sobre la expresión de receptores NPR y canales de K ⁺	86
9.2.5. Fármacos y soluciones	86
10. Análisis estadístico de los resultados.....	87
Resultados	89
1 Efectos protectores del anp en el ictus isquémico.....	91
1.1. Hemodinámica, gases arteriales y glucemia durante la isquemia focal transitoria en ratas, previos al tratamiento.....	91

1.2. El tratamiento agudo con ANP intracerebroventricular tras la isquemia focal transitoria redujo el daño cerebral isquémico.....	93
1.3. El ANP disminuyó la apoptosis mediada por caspasa-3 en el cerebro isquémico	96
1.4. El ANP no modificó la expresión de los receptores NPR-A y NPR-C reducida por la isquemia	100
1.5. La isquemia y el ANP modificaron la expresión de los subtipos de canales de K ⁺	101
1.6. El ANP moduló la vía de señalización MAPK/ERK, pero no la vía PI3K/Akt, ambas sobreexpresadas por la isquemia	104
2. Efectos relajantes del ANP en arteria basilar.....	106
2.1. El ANP produjo relajación dependiente de endotelio de la arteria basilar de conejo	106
2.2. El NO y los prostanoïdes están implicados en la relajación inducida por ANP.....	109
2.3. El flujo de K ⁺ a través de diferentes subtipos de canales de K ⁺ media la relajación de la arteria basilar de conejo inducida por ANP	111
2.4. La diabetes incrementa la sensibilidad de la arteria basilar de conejo a ANP mediante la modificación de los mecanismos de relajación	115
Discusión	127
1 Modelos animales de ictus isquémico y diabetes.....	129
1.1. Ictus isquémico.....	129
1.2. Diabetes.....	132

2. Efecto del anp sobre el daño cerebral isquémico en el ictus.....	134
2.1. Efecto antiapoptótico del ANP en el cerebro isquémico.....	135
2.2. Papel de los receptores cerebrales para el ANP en la neuroprotección	136
2.3. Intervención de los canales de K ⁺ cerebrales en la neuroprotección inducida por ANP	137
2.4. Efecto modulador del ANP sobre vías de señalización de apoptosis en el cerebro isquémico.....	138
3. Efecto relajante del ANP en la arteria basilar.....	139
3.1. Endotelio-dependencia de la relajación inducida por ANP	141
3.2. Papel del óxido nítrico y los prostanoides en la relajación inducida por ANP	142
3.3. Flujo de K ⁺ y canales implicados en la relajación inducida por el ANP	144
4. Efectos de la diabetes en la relajación inducida por ANP y sus mecanismos.....	145
5. Limitaciones del estudio y directrices futuras.....	149
Conclusiones	151
Bibliografía.....	155

Introducción

1. ICTUS: DEFINICIÓN Y TIPOS

El ictus se define como un trastorno neurológico originado por la disminución brusca del aporte sanguíneo cerebral. La definición tradicional de ictus es clínica y se basa en el inicio repentino de la pérdida de funciones neurológicas focales debido a un infarto o a una hemorragia en una parte relevante del cerebro, retina o medula espinal. El ictus se distingue de un accidente isquémico transitorio (TIA) si los síntomas persisten por más de 24 horas (u ocurre la muerte del paciente). Una definición actualizada de ictus sería un episodio agudo de disfunción focal del cerebro, retina o medula espinal que dura más de 24 horas, o de cualquier duración si los estudios de imagen o la autopsia muestran un infarto focal o una hemorragia relevante para los síntomas. En esta definición se incluye la hemorragia subaracnoidea. Un TIA ha sido redefinido como disfunción focal de menos de 24 horas de duración sin evidencia de infarto en las imágenes (Sacco et al., 2013).

Los síndromes clínicos de ictus isquémico incluyen el síndrome de circulación anterior total, síndrome de circulación anterior parcial, síndrome lacunar, y síndrome de circulación posterior (Bamford et al., 1991). Los subtipos patológicos comprenden el ictus isquémico (infarto cerebral, retinal y medular) y el ictus hemorrágico (hemorragia intracerebral y subaracnoidea). En general del total de ictus el 85% son de tipo isquémico, provocados por el estrechamiento gradual o por la obstrucción de una de las grandes arterias cerebrales, y el 15% restante son de tipo hemorrágico, provocados por la ruptura de un vaso sanguíneo

cerebral (Manea et al., 2015), aunque la proporción de subtipos patológicos y etiológicos de ictus varían entre poblaciones de diferente edad, raza, origen étnico y nacionalidad. De los ictus isquémicos, el 65% ocurren en el territorio de la arteria cerebral media (ACM).

2. ETIOLOGÍA DEL ICTUS ISQUÉMICO

Etiológicamente, el ictus isquémico es causado por un émbolo cardiaco, un émbolo arterio-arterial y por enfermedad de pequeños vasos. Los subtipos etiológicos de ictus isquémico están clasificados de acuerdo a la clasificación TOAST (Adams et al., 1993), el sistema fenotípico ASCOD (A: aterosclerosis; S: enfermedad de pequeños vasos; C: patología cardiaca; O: otra causa; D: disección) (Amarenco et al., 2013), y el sistema de clasificación causal (Ay et al., 2007). Un tercio de los ictus permanecen con causa indeterminada, es decir, son criptogénicos, para los cuales se ha definido un subgrupo llamado ictus embólico de causa indeterminada (Hart et al., 2014).

3. FISIOPATOLOGÍA DEL ICTUS ISQUÉMICO: MECANISMOS DE MUERTE CELULAR

3.1. Eventos temporales y espaciales después de un ictus

El ictus isquémico se caracteriza por complejos eventos espaciales y temporales que evolucionan durante horas e incluso días. En el centro del territorio isquémico, también llamado *core*, el déficit de flujo sanguíneo, los bajos niveles de ATP y de reservas energéticas, el trastorno iónico y el

fallo metabólico son severos, y la muerte celular progresa en minutos. Sin embargo, en las zonas periféricas del territorio en que está comprometido el flujo sanguíneo, llamado *penumbra isquémica*, el daño es más leve debido a la perfusión residual de los vasos sanguíneos colaterales (Figura 1). Durante las etapas iniciales de la isquemia, la penumbra podría comprender de un tercio a la mitad del volumen de la lesión. En esta zona las células mueren más lentamente y, a medida que la penumbra colapsa, la lesión se expande en el tiempo (Ginsberg et al., 1999). En la zona de penumbra se reclutan mecanismos activos de muerte celular, que si se seleccionan como diana proporcionarían un enfoque terapéutico prometedor. Respecto al core, salvar las células que están muriendo rápidamente no podría ser posible sin la pronta reperfundición del tejido. De hecho, una vez que el tejido se daña más allá de un punto crítico la muerte celular parece inevitable, a pesar de la restauración del flujo sanguíneo y de los niveles de ATP (Lo et al., 2003).

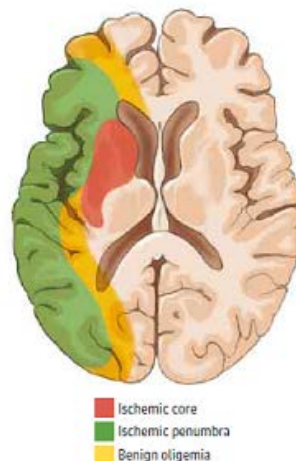


Figura 1. Representación esquemática de las regiones cerebrales hipoperfundidas tras oclusión de la arteria cerebral media. Tomado de Prabhakaran et al., 2015.

3.2. Mecanismos de muerte celular

Hay al menos tres mecanismos fundamentales que conducen a la muerte celular durante el daño cerebral isquémico: excitotoxicidad y alteración del balance iónico, estrés oxidativo/nitrosativo, y muerte celular apoptótica. Estos mecanismos presentan características superpuestas y redundantes, median la lesión dentro de las neuronas, glía y elementos vasculares y, a nivel subcelular, tienen impacto en la función de la mitocondria, núcleo, membranas celulares, retículo endoplasmático y lisosomas. Los cuerpos celulares, sus procesos y terminaciones sinápticas están en riesgo, y la muerte celular podría producirse mediante mecanismos que promueven la ruptura, lisis, fagocitosis o involución y encogimiento (Lo et al., 2003).

3.2.1. Excitotoxicidad

La isquemia cerebral conduce a la pérdida de reservas energéticas y las células se vuelven incapaces de mantener gradientes iónicos normales (Xing et al., 2012; Terasaki et al., 2014; George et al., 2015). Este desequilibrio iónico imposibilita a las células a recaptar potasio (K^+) y comienzan a experimentar repetidas despolarizaciones anóxicas que promueven una entrada masiva de calcio (Ca^{2+}) aumentando su concentración intracelular ($[Ca^{2+}]_i$). Estas despolarizaciones, además, producen la liberación masiva del neurotransmisor excitatorio glutamato a la hendidura sináptica, el cual estimula principalmente a los receptores NMDA y origina un aumento del flujo intracelular de Ca^{2+} a través de estos receptores (Figura 2) (Lai et al., 2014; Terasaki et al., 2014; George et al.,

2015). Otra consecuencia del desequilibrio iónico es la disfunción de los transportadores que recaptan el glutamato, e incluso su reversión, lo que contribuye a una mayor cantidad de este neurotransmisor en la hendidura sináptica y a la sobreactivación de sus receptores, elevándose aún más la $[Ca^{2+}]_i$. El efecto tóxico del glutamato sobre las células recibe el nombre de excitotoxicidad (Lai et al., 2014; Terasaki et al., 2014; George et al., 2015). La sobrecarga de Ca^{2+} desencadena disfunción mitocondrial, estrés oxidativo y activa procesos catabólicos mediados por proteasas, fosfolipasas y nucleasas en las neuronas, que finalmente derivan en muerte o daño celular (Xing et al., 2012; Terasaki et al., 2014; George et al., 2015). Adicionalmente, los receptores de glutamato promueven una entrada excesiva de sodio y agua a la célula, con el consiguiente edema, hinchazón y reducción del espacio extracelular (Xing et al., 2012).

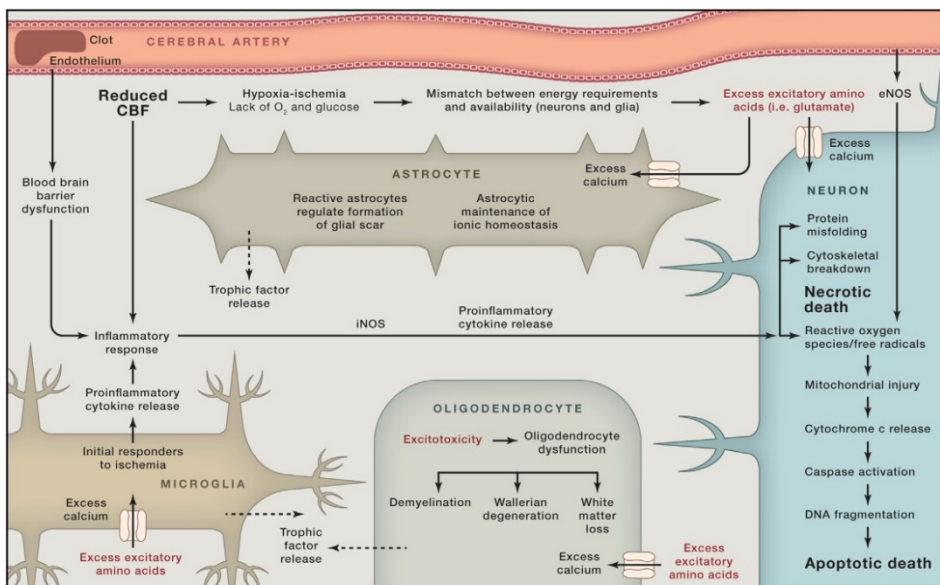


Figura 2. Eventos fisiopatológicos tras la isquemia cerebral. Tomado de George et al., 2015.

3.2.2. Estrés oxidativo

En condiciones normales existe producción de radicales libres (RL) y especies reactivas de oxígeno (EROs) en las células, que son eliminados mediante mecanismos enzimáticos (superóxido dismutasa, catalasa, glutatión peroxidasa) y no enzimáticos (glutatión, ácido ascórbico y α -tocoferol). La alteración del balance entre la producción y eliminación de RL y EROs, en favor de la producción, se conoce como estrés oxidativo y es nocivo para las células (Pradeep et al., 2012). El cerebro en particular es vulnerable al estrés oxidativo debido a su alta actividad metabólica oxidativa y a la relativamente baja capacidad antioxidante (Candelario et al., 2009; Pradeep et al., 2012; Xing et al., 2012). El estrés oxidativo se ha asociado a la fisiopatología de muchas enfermedades neurológicas, incluyendo el ictus isquémico y otras enfermedades neurodegenerativas (Chan et al., 2001; Terasaki et al., 2014). Luego de la isquemia, especialmente después de la reoxigenación del tejido tras la reperusión, se genera una cantidad excesiva de radicales libres (Terasaki et al., 2014) provenientes de diferentes fuentes entre las que se incluye el metabolismo oxidativo mitocondrial, metabolismo del ácido araquidónico, y la acción de las enzimas NADPH oxidasa, óxido nítrico sintasa (NOS) y xantina oxidasa (Candelario et al., 2009).

La sobrecarga de Ca^{2+} intracelular produce una acumulación de este ion dentro de la mitocondria, se altera el potencial de membrana mitocondrial, se abren los poros de permeabilidad mitocondrial y se inician cascadas de muerte celular. Además, la mitocondria sintetiza RL como

anión superóxido (O_2^-) y peróxido de hidrogeno (H_2O_2) (Candelario et al., 2009; Lai et al., 2014; Xing et al., 2012; George et al., 2015).

De especial importancia es la enzima prooxidante óxido nítrico sintasa (NOS), la cual usa L-arginina y oxígeno para producir óxido nítrico (NO). Existen tres isoformas de NOS; neuronal (nNOS), endotelial (eNOS), e inducible (iNOS). La nNOS y eNOS son isoformas que se encuentran de forma constitutiva en las neuronas y células endoteliales, respectivamente; y la iNOS es la isoforma inducible que se expresa en la microglía, astrocitos, neutrófilos y células endoteliales. La actividad de la nNOS y la eNOS es dependiente de calcio, mientras que la actividad de la iNOS no lo es. Se ha demostrado que durante y tras la isquemia se produce un aumento de NO. El NO producido por la eNOS se sabe que es neuroprotector por sus efectos vasodilatadores y se cree que tiene la capacidad de aumentar el flujo sanguíneo en la zona de penumbra (Chan et al., 2001), mientras que el NO producido por la iNOS y nNOS contribuye al daño cerebral isquémico debido a su capacidad de reaccionar con el O_2^- para formar peroxinitrito ($ONOO^-$), el cual es uno de los oxidantes más potentes y es responsable de daño celular (Terasaki et al., 2014; George et al., 2015).

Otras enzimas prooxidantes como las ciclooxigenasas (COX-1, COX-2), xantina deshidrogenasa, xantina oxidasa y NADPH oxidasa generan O_2^- como principal oxidante en varios tipos celulares del parénquima cerebral, el cual tiene la capacidad de reaccionar con NO y formar peroxinitrito. Las enzimas mieloperoxidasa y monoamino oxidasa generan ácido hipocloroso ($HOCl$) y peróxido de hidrógeno, respectivamente, como principales oxidantes en los leucocitos y células parenquimales.

Los radicales libres y especies reactivas de oxígeno producen, finalmente, daño oxidativo de macromoléculas celulares entre los que se incluye, peroxidación lipídica, oxidación de proteínas y oxidación del ADN, que derivan en muerte celular y contribuyen al daño cerebral isquémico (Chan et al., 2001).

3.2.3. Apoptosis

En el core isquémico la muerte celular ocurre por necrosis debido a que los niveles de ATP disminuyen rápidamente tras la isquemia severa (Nicotera et al., 2000) y se caracteriza por pérdida de la integridad de la membrana y pérdida de los organelos. En la zona de penumbra, la muerte celular ocurre por apoptosis más que por necrosis, aunque “aponecrosis” describe con mayor acierto la patología. El tipo celular, la edad celular y la localización en el cerebro dejan a las células más o menos resistentes a la apoptosis o a la necrosis.

La apoptosis es un modo de muerte celular programada que incluye la eliminación de las células que no se van a necesitar o que serán perjudiciales para un tejido u organismo. Es un proceso complejo, dependiente de energía que incluye una compleja cascada de eventos que unen el estímulo inicial con la muerte de la célula. Existen al menos dos vías que llevan a apoptosis, extrínseca e intrínseca o mitocondrial. En ambas vías la señalización culmina en la activación de una familia de proteasas con un centro activo de cisteína llamadas caspasas, que se expresan constitutivamente en las células cerebrales adultas y especialmente en las del recién nacido, particularmente en neuronas

(Figura 3) (Elmore, 2007). Las caspasas son escindidas y activadas en forma secuencial y actúan en una cascada proteolítica para dismantelar y remover la célula apoptótica (Yuan et al., 2000).

La mitocondria tiene un papel importante en la apoptosis. Ante estímulos deletéreos puede formar poros en su membrana externa por donde escapan determinadas proteínas proapoptóticas como el citocromo C. Esta proteína, junto a otras, forma el apoptosoma responsable en último término de la activación de la caspasa-3, punto de confluencia entre ambas vías y considerada la más importante de las caspasas efectoras (Doyle et al., 2008). Esta caspasa activa por una parte a endonucleasas citoplasmáticas que degradan el material nuclear, y por otra a proteasas que degradan las proteínas citoesqueléticas y nucleares. Específicamente la caspasa-3 activa a la endonucleasa CAD e induce la reorganización del citoesqueleto y desintegración de la célula en cuerpos apoptóticos. El último componente de la apoptosis es la fagocitosis de las células apoptóticas. El sello de esta fase es la asimetría de los fosfolípidos y la externalización de la fosfatidilserina a la superficie de las células apoptóticas y sus fragmentos. La aparición de la fosfatidilserina en la cara externa de las células apoptóticas facilita el reconocimiento fagocítico no inflamatorio, permitiendo su temprana absorción y eliminación (Elmore, 2007).

Cabe destacar el papel de las proteínas de la familia Bcl-2 en la apoptosis: mientras que miembros de esta familia como Bak, Bad, Bim o Bid son proapoptóticas porque promueven la formación de poros en la membrana mitocondrial por donde escapan las proteínas proapoptóticas,

otros como Bcl-2, Bcl-XL o Bcl-w tienen la acción opuesta: impiden la formación de poros y por tanto tienen un papel antiapoptótico (Christophe y Nicolas, 2006).

A pesar de que la isquemia y el agotamiento del ATP provocan edema agudo de las células, los desequilibrios iónicos pueden desencadenar encogimiento de la célula y muerte celular apoptótica bajo ciertas condiciones (Yu y Choi, 2000). Por otra parte, el flujo de salida de K^+ a través de los canales NMDA induce a reducción de los cuerpos celulares, aumento de la actividad de caspasas y aumento de la apoptosis en neuronas en cultivo, cuando la concentración extracelular de sodio y calcio está disminuida (Yu et al., 1999). Por lo tanto, existen vínculos entre la excitotoxicidad mediada por glutamato y programas apoptóticos, que podrían proporcionar múltiples dianas para la terapia combinada en el ictus.

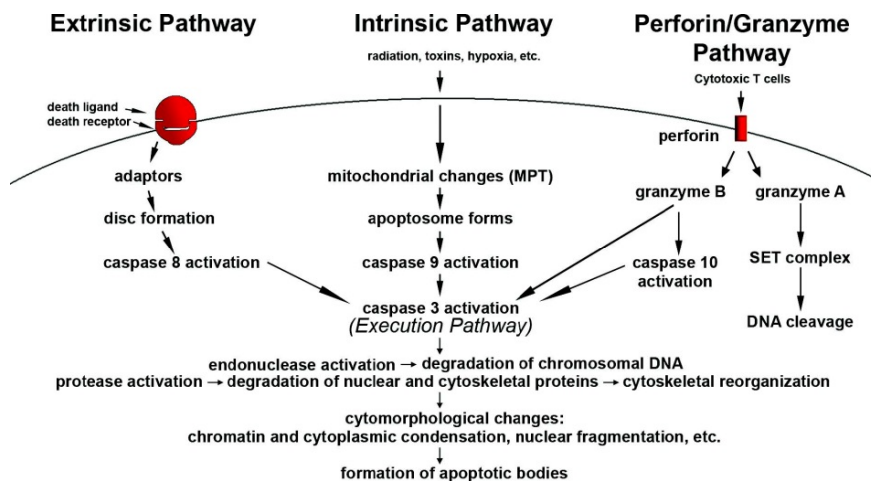


Figura 3. Confluencia de las vías apoptóticas extrínseca e intrínseca en vía de ejecución (activación de la caspasa-3). Tomado de Elmore, 2007.

3.2.4. Vías de supervivencia

3.2.4.1. Vía de fosfatidilinositol 3 kinasa (PI3K/Akt)

La vía de señalización de la fosfatidilinositol-3-kinasa (PI3K) está involucrada en varias funciones celulares como proliferación celular, crecimiento, diferenciación, motilidad, supervivencia y tráfico intracelular (Koh y Lo, 2015). Es crucial en numerosos aspectos celulares involucrados en la supervivencia celular y es necesaria para la supervivencia de neuronas y células madres neurales endógenas (Pinzón et al., 2009; Koh y Lo, 2015). Esta vía es estimulada fisiológicamente como consecuencia de muchos factores de crecimiento y factores reguladores y finalmente conduce a la activación de la proteína kinasa B (Akt). La Akt fosforilada (p-Akt) por PI3K inactiva varios factores proapoptóticos como BAD y procaspasa-9, entre otros. Por otra parte, Akt activa factores de transcripción que aumentan la expresión de genes antiapoptóticos como CREB (proteína de unión a elementos de respuesta a AMP cíclico), NF-KB e HIF-1 α . Otro efecto de Akt para favorecer la supervivencia celular es la inactivación del gen supresor de tumor p53 a través de la fosforilación de MDM2 que se une a p53 en el núcleo celular, impidiendo su actividad como factor de transcripción de genes proapoptóticos (Figura 4) (Pinzón et al., 2009).

Esta vía es afectada por la isquemia, por lo que se ha intentado modular para el tratamiento del infarto cerebral y para prevenir la apoptosis provocada por ictus isquémico. Se ha descrito por una parte que la isquemia/reperfusión inhibe esta vía e induce apoptosis, aunque por otra parte se ha descrito que esta vía se activa tras la isquemia y contribuye a la supervivencia neuronal (Sawe et al., 2008; Koh y Lo, 2015). Esta

discrepancia se puede atribuir a diferencias en el tiempo en que se ha medido tras la isquemia/reperfusión, en la duración de la isquemia o en el uso de diferentes tipos celulares (Koh y Lo, 2015).

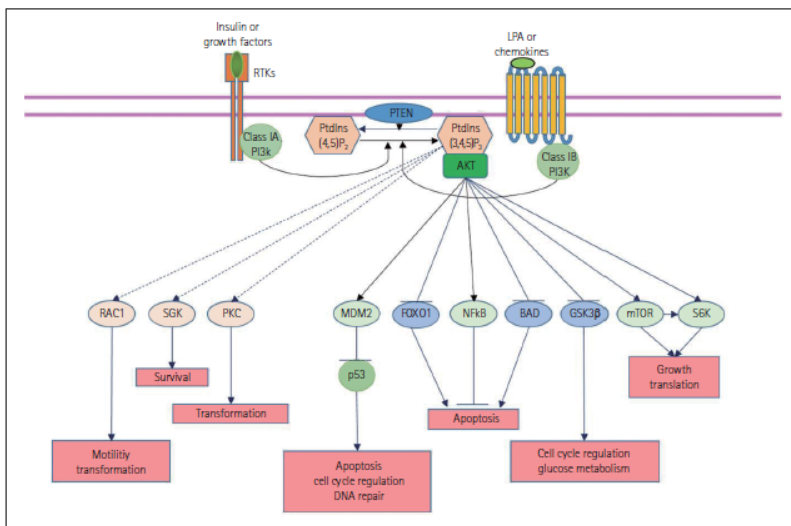


Figura 4. Vía fosfatidilinositol-3-quinasa (PI3K) en las células. Tomado de Koh y Lo, 2015.

3.2.4.2. Vía de proteínas kinasas activadas por mitógenos (MAPK/ERK)

La cascada de las proteínas kinasas activadas por mitógenos son vías de señalización intracelular que responden a varios estímulos extracelulares y controlan una gran cantidad de procesos celulares entre los que se incluyen crecimiento, proliferación, diferenciación, motilidad, respuesta a estrés, supervivencia y apoptosis (Plotnikov et al., 2011).

Cada cascada de señalización consiste en al menos tres componentes: MAPK kinasa kinasa (MAP3K), MAPK kinasa (MAP2K), y MAPK. Las MAPK activadas catalizan la fosforilación de muchas proteínas; la primera cascada que se estudió es la vía de kinasas reguladas por señales extracelulares 1/2

(ERK1/2) (Plotnikov et al., 2011). La actividad de esta vía está involucrada tanto en la neuroprotección como en la exacerbación del daño isquémico. Puede exagerar la inflamación llevando a necrosis, y puede bloquear la apoptosis mediante el aumento de los niveles de la proteína antiapoptótica Bcl-2 o mediante el bloqueo de la proteína proapoptótica Bad (Figura 5). En estudios de isquemia focal y global se ha descrito que la fosforilación de ERK1/2 disminuye durante la isquemia, sin embargo, estudios *in vivo* e *in vitro* han demostrado un gran incremento en los niveles de p-ERK1/2 después de la reperusión. No sabe si el aumento p-ERK1/2 es protector o dañino ya que, por un lado, existen estudios que indican que p-ERK1/2 protege del daño isquémico, pero por otro hay estudios que indican que algunos factores neuroprotectores inhiben la fosforilación de ERK1/2 (Sawe et al., 2008).

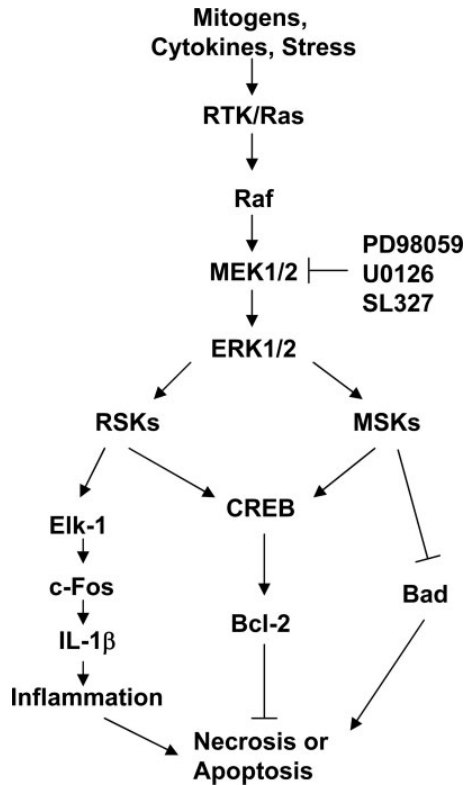


Figura 5. Vía de proteínas kinasas activadas por mitógenos (MAPK/ERK1/2). Tomado de Sawe et al., 2008.

4. EPIDEMIOLOGÍA Y CARGA DEL ICTUS: MORBIMORTALIDAD, DISCAPACIDAD Y DEMENCIA

El ictus continúa siendo la principal causa de muerte, de discapacidad permanente y de demencia en el mundo. En el año 2010 se estimó una incidencia de 16,9 millones de ictus, que se suman a un grupo de 33 millones de supervivientes a un ictus en todo el mundo (Feigin et al., 2014). Además, hubo 5,9 millones de muertes y una enorme pérdida de años de vida por discapacidad debido al ictus, posicionándolo como la segunda causa de muerte luego de la enfermedad isquémica cardíaca y la tercera

causa de pérdida de años de vida por discapacidad en todo el mundo (Hankey, 2017). Si esta tendencia continúa, en el año 2030 habrá alrededor de 12 millones de muertes debidas al ictus y 70 millones de supervivientes a un ictus (Feigin et al., 2014).

De acuerdo con los datos del Instituto Nacional de Estadística, en España los ictus provocaron un 6,7% de las muertes en el año 2015.

5. TRATAMIENTO DEL ICTUS: PREVENCIÓN, RECANALIZACIÓN, NEUROPROTECCIÓN Y REHABILITACIÓN

La hipertensión, hipercolesterolemia, estenosis carotídea y fibrilación auricular son conocidos factores de riesgo causantes de ictus; estudios clínicos han demostrado que el tratamiento de estas condiciones disminuye la incidencia de ictus (Hart et al., 2007; Raman et al., 2013; Collins et al., 2016; Xie et al., 2016). El tabaquismo, consumo excesivo de alcohol, la resistencia a la insulina y la diabetes mellitus son también factores de riesgo causantes de ictus (Peters et al., 2014; Zhang et al., 2014; Mons et al., 2015; Kernan et al., 2016). Entre otros factores de riesgo, que si se modifican podrían disminuir la incidencia de ictus, se encuentran la contaminación del aire ambiental, circunstancias de salud en la niñez, dieta de alto riesgo y malnutrición, inactividad física, obesidad, variabilidad en la presión arterial, inflamación crónica, enfermedad renal crónica, migraña, contracepción hormonal o terapia de reemplazo hormonal, estrés psicosocial, depresión, tensión laboral y largas horas de trabajo (Feigin et al., 2016; O'Donnell et al., 2016).

Los mayores avances en el tratamiento del ictus isquémico agudo vienen de enfoques vasculares centrados en disolver, mediante el activador del plasminógeno tisular (rt-PA), o remover, mediante trombectomía endovascular, el trombo que ocluye la arteria, pero solo una minoría de los pacientes (aproximadamente el 5%) son candidatos para estos tratamientos (Hankey, 2017). La neuroprotección, que se refiere a minimizar el daño de la isquemia sobre la neurona o, desde el punto de vista práctico de los pacientes y rehabilitadores, mantener el daño neuronal y glial bajo el umbral de manifestaciones clínicas, se ha conseguido en numerosos estudios de laboratorio, pero no ha conseguido reproducirse, en la mayoría de los casos, en estudios clínicos (Chamorro et al., 2016). Es por esto que la protección farmacológica del cerebro y la recuperación funcional, a través de la plasticidad neuronal inducida y la reparación, siguen siendo los objetivos centrales de la investigación en ictus (Dirnagl y Endres, 2014).

Muchos fármacos neuroprotectores han fallado en demostrar beneficio funcional en el tratamiento del ictus agudo, entre los que se incluyen recientes estudios clínicos de citicolina, albúmina a altas dosis, y sulfato de magnesio (Chamorro et al., 2016). La evidencia actual no apoya el uso rutinario de estrategias físicas o farmacológicas para reducir la temperatura en el ictus agudo, aunque hay ensayos en curso (Hankey, 2017).

Los pacientes con un ictus agudo necesitan una evaluación de la naturaleza y severidad de sus déficits neurológicos, y el pronóstico, objetivos y requerimientos de rehabilitación para su recuperación. La

rehabilitación de un ictus es un proceso progresivo y dinámico, orientado a objetivos que permitan a una persona con discapacidad alcanzar un nivel físico, cognitivo, emocional, comunicativo, social y funcional óptimos (Hebert et al., 2016). La rehabilitación física mejora la recuperación funcional tras un ictus e incorpora al entrenamiento de tareas funcionales intervenciones músculo esqueléticas activas y pasivas, neurofisiológicas y cardiopulmonares además de dispositivos y modalidades asistenciales (Pollock et al., 2014).

Avances recientes en el campo de la recuperación de un ictus muestran claramente que los efectos de la neurorehabilitación pueden mejorar mediante manipulaciones conductuales y la combinación con terapias adyuvantes que estimulan la plasticidad neuronal endógenamente. Es probable que el tratamiento futuro y los protocolos de rehabilitación para los supervivientes a un ictus esté dirigido a múltiples vías moleculares, apunte a ajustar múltiples equilibrios y se base en enfoques moduladores de la plasticidad neuronal farmacológica y no farmacológica (Pekna et al., 2012)

En las últimas dos décadas, la neurorreparación basada en células madres ha emergido como una prometedora opción terapéutica para el ictus. Los datos experimentales en animales con células madres embrionarias, células progenitoras neurales o células progenitoras derivadas de la médula ósea son alentadores, sin embargo, actualmente no hay disponibles terapias basadas en células madre para el ictus. A pesar del supuesto estado inmunoprivilegiado del sistema nervioso central, los injertos alogénicos de las neuronas y la glía derivadas de células madre

siguen siendo susceptibles al rechazo. Una nueva terapia alternativa para evitar el rechazo del injerto e inmunosupresión es generar células madres pluripotenciales inducidas desde células somáticas (Blanco y Castillo, 2013)

6. REACTIVIDAD VASCULAR Y DIABETES

Los vasos sanguíneos están compuestos por tres capas: una túnica externa o adventicia, una capa media de células musculares lisas (excepto en los capilares) y una túnica interna o íntima formada por una monocapa de células endoteliales (Figura 6).

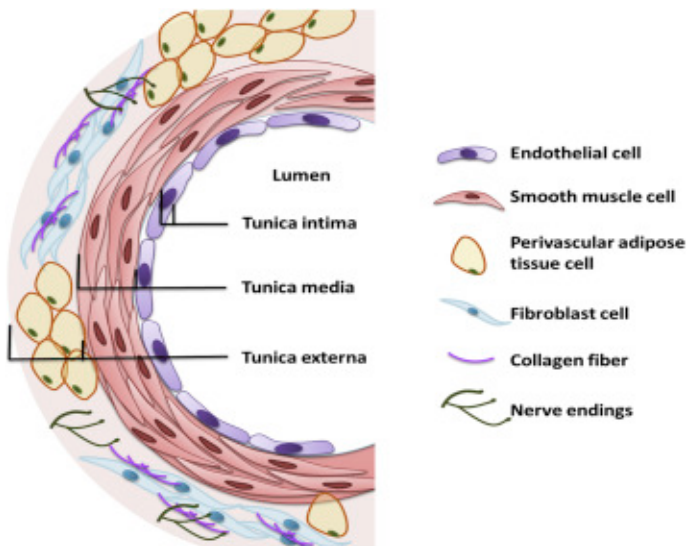


Figura 6. Estructura de la pared vascular. Tomado de Zhao et al., 2015.

La adventicia contiene terminaciones nerviosas, tejido adiposo perivascular y elementos conectivos (fibroblastos y fibras de colágeno) que permiten su adherencia a los órganos de alrededor. Los componentes de la adventicia están involucrados en el desarrollo y remodelamiento vascular,

vigilancia inmunitaria, tráfico de las células inflamatorias e intercambio de señales entre los vasos sanguíneos y el tejido circundante.

La capa de músculo liso vascular es la responsable de la constricción y dilatación de los vasos sanguíneos. La contracción de las células musculares lisas vasculares puede iniciarse por estímulos mecánicos (presión intraluminal, estiramiento) o farmacológicos (unión de ligandos a receptores de membrana) que aumentan las concentraciones de Ca^{2+} intracelular a través de su liberación desde almacenamientos internos (retículo sarcoplásmico) o por medio de su entrada a la célula a través de canales de Ca^{2+} presentes en la membrana celular (Figura 7). El Ca^{2+} libre se une a la calmodulina y el complejo Ca^{2+} -calmodulina activa a la cadena ligera de la miosina y se forman los puentes cruzados entre las cabezas de miosina y los filamentos de actina, produciéndose la contracción de las células musculares lisas vasculares (Zhao et al., 2015).

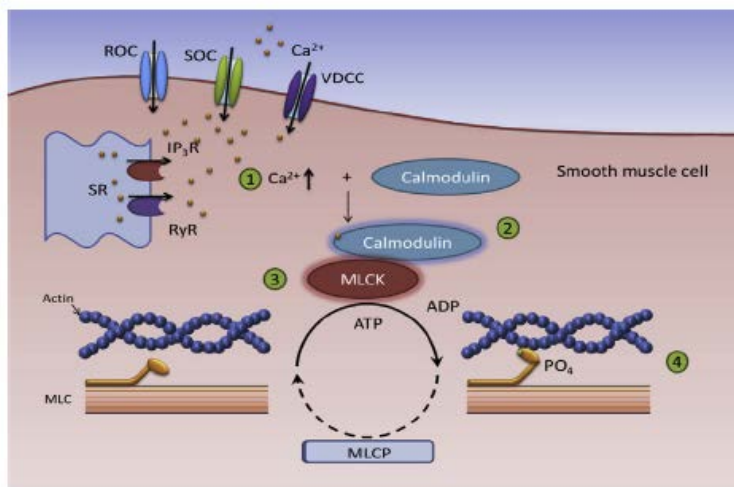


Figura 7. El aumento de Ca^{2+} intracelular estimula la contracción de las células musculares lisas de la pared vascular. Tomado de Zhao et al., 2015.

La íntima es una monocapa de células endoteliales que cubre todo el árbol vascular, desde el corazón hasta los capilares, formando la superficie interior de todos los vasos sanguíneos. El endotelio detecta cambios en el flujo sanguíneo (estrés de fricción) e interactúa con hormonas y neurotransmisores a través de sus receptores de membrana, participando en la regulación dinámica del diámetro vascular (Matsumoto et al., 2015a).

6.1. Regulación del tono vascular

La reactividad vascular está regulada por una compleja interacción entre vasoconstrictores (endotelina-1, angiotensina-II, tromboxano A_2 (TXA₂), prostaglandina H₂) y vasodilatadores (NO, prostaciclina (PGI₂), factor hiperpolarizante derivado del endotelio (EDHF)) liberados desde el endotelio, el músculo liso de la pared vascular, las terminaciones nerviosas perivasculares y las células sanguíneas, que en condiciones normales se encuentran en equilibrio y confieren el tono normal a los vasos sanguíneos (Figura 8). La vasodilatación ocurre si el efecto de los agentes dilatadores sobrepasa al de los agentes constrictores, sin embargo, la vasoconstricción ocurre si se genera una sobreproducción de agentes constrictores (Hwang y Kim, 2014). El endotelio cumple un papel clave en la regulación del tono vascular, mediante la síntesis y liberación de sustancias vasoactivas que constriñen o relajan los vasos sanguíneos. Por ser motivo de estudio en este trabajo, centraremos la atención en el NO, los prostanoides y el EDHF.

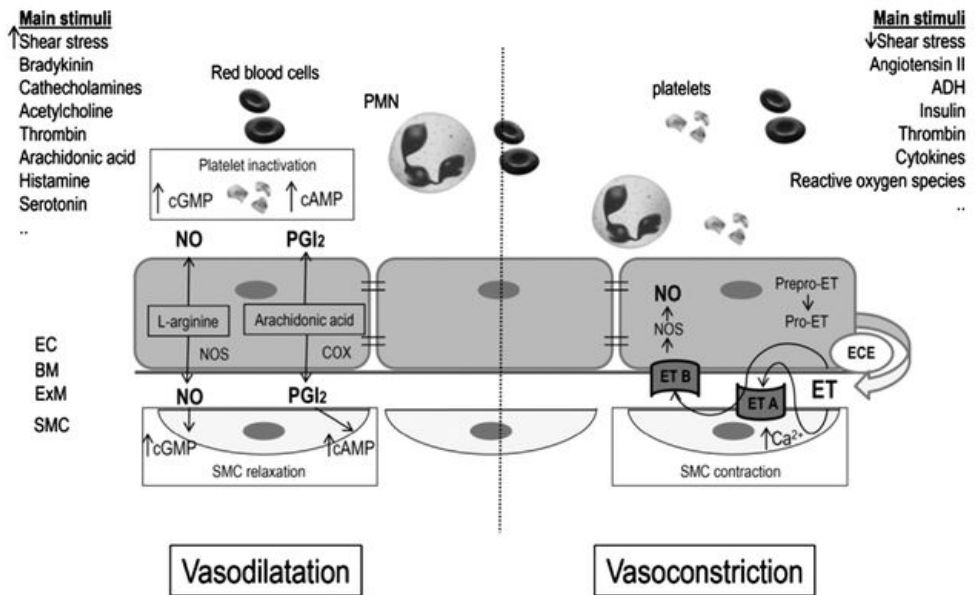


Figura 8. Representación de la regulación del tono vascular. EC= Célula endotelial, BM= membrana basal, SMC= célula muscular lisa. Tomado de Pogessi et al., 2016.

6.1.1. Óxido nítrico (NO)

El óxido nítrico es uno de los mediadores más importantes de la vasodilatación ya que es considerado el agente vasoactivo con mayor capacidad vasodilatadora (Poredos y Jezovnik, 2013). En el año 1980 Furchgott y Zawadzki describieron una sustancia vasoactiva derivada del endotelio a la que denominaron factor relajante derivado del endotelio (EDRF) que posteriormente Ignarro identificó como NO. Como se ha comentado anteriormente, se sintetiza a partir del aminoácido L-arginina, en presencia de NADPH y oxígeno, en una reacción catalizada por la enzima NOS, y en condiciones normales confiere un nivel basal de relajación a los vasos sanguíneos. El NO sintetizado en las células endoteliales difunde al

interior de las células musculares lisas de la pared vascular (Poredos y Jezovnik, 2013) y activa la enzima guanilato ciclasa soluble (sGC), aumentando la concentración intracelular de cGMP, el cual activa la proteína quinasa G (PKG), que produce fosforilación de diversas proteínas en el interior de la célula y una disminución de la concentración de Ca^{2+} libre intracelular, con la consiguiente relajación (Bhatraju et al., 2015; Zhao et al., 2015; Oliveira-Paula et al., 2016) (Figura 9): 1) la PKG-1 activa fosforila los canales de K^+ de gran conductancia (BK_{Ca}), lo que provoca salida de K^+ , hiperpolarización de la membrana, y disminución de la entrada de Ca^{2+} a través de canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje, con disminución del Ca^{2+} libre intracelular; 2) la PKG-1 también fosforila dicho canal de Ca^{2+} produciendo su inhibición; 3) la PKG-1 fosforila el receptor del 1,4,5 inositol trifosfato (IP3); una proteína diana de la PKG-1 denominada sustrato de la PKG-1 asociada al receptor del IP3 (con las siglas IRAG) ha sido caracterizada y considerada necesaria para la fosforilación del receptor IP3; la fosforilación del IRAG lleva a disminuir la actividad del receptor IP3 suprimiendo la salida de Ca^{2+} desde el retículo sarcoplasmático; y 4) la fosforilación de otra proteína citosólica, el fosfolambán, inhibe la bomba de Ca^{2+} del retículo sarcoplasmático, promoviendo su secuestro en el interior del retículo. La disminución de la concentración de Ca^{2+} intracelular debido a estas múltiples fosforilaciones provoca la disminución del complejo Ca^{2+} -calmodulina-MLCK, favoreciendo la relajación del músculo liso vascular y vasodilatación. Por otra parte, la PKG-1 puede activar directamente la fosfatasa de la cadena ligera de la miosina, contribuyendo también a vasodilatación.

treonina495 interfiere con el dominio de unión de la calmodulina, regulando negativamente la síntesis de NO.

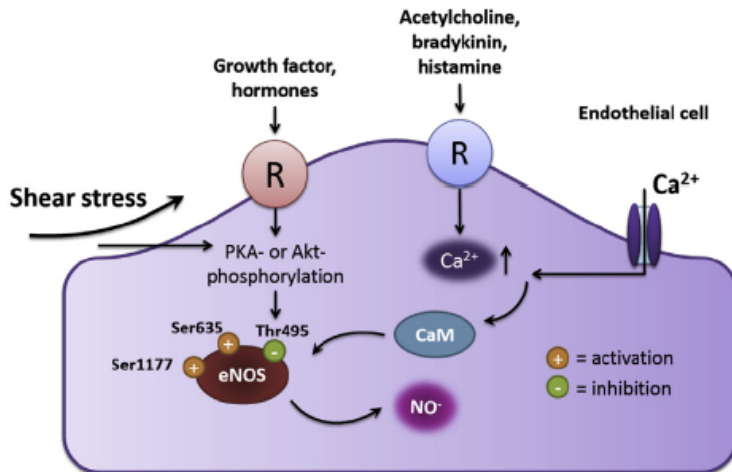


Figura 10. Activación de la eNOS de forma dependiente e independiente de Ca^{2+} . Tomado de Zhao et al., 2015.

Además de la acción relajante, el NO mantiene la homeostasis de la pared vascular a través de la inhibición de la inflamación, proliferación celular y trombosis (Poredos y Jezovnik, 2013). Dado que el aumento de Ca^{2+} libre intracelular promueve la proliferación de la célula muscular lisa perivascular, el NO, a través de la activación de la sGC y el aumento del cGMP, puede tener acciones antiproliferativas. El NO también regula la adhesión de los leucocitos al endotelio vascular al inhibir el factor nuclear Kappa-B, que estimula la expresión endotelial de moléculas de adhesión y citoquinas. Además, el NO endógeno también puede influir indirectamente en la regulación del tono vascular y la proliferación por su influencia sobre el equilibrio redox del microambiente vascular. Por último, el NO tiene acciones antitrombóticas porque puede actuar sobre las plaquetas

circulantes inhibiendo la agregación, la adhesión y la liberación de mediadores plaquetarios.

6.1.2. Prostanoides

Los prostanoides son una familia de compuestos lipídicos derivados del ácido araquidónico (AA), sintetizados por medio de la vía de la ciclooxigenasa (COX). El AA es un ácido graso liberado desde los fosfolípidos de la membrana celular por acción de la enzima fosfolipasa A₂ en respuesta a estímulos como estrés por fricción, activación de receptores de membrana, entre otros. Es metabolizado por la enzima ciclooxigenasa (COX) a un sustrato intermedio, la prostaglandina H₂ (PGH₂), que posteriormente es convertido, mediante enzimas sintasas específicas, en los productos biológicamente activos entre los que se incluyen la prostaciclina (PGI₂), tromboxano A₂ (TXA₂), prostaglandina E₂ (PGE₂), prostaglandina F_{2α} (PGF_{2α}) y prostaglandina D₂ (PGD₂) (Figura 11).

Existen dos isoformas de la enzima ciclooxigenasa, inicialmente llamadas prostaglandina H sintasa-1 y -2, y actualmente llamadas COX-1 y COX-2 (Félétoú et al., 2011; Kim, 2011; Luo et al., 2016). A pesar que ambas isoformas comparten un gran porcentaje de homología (65%), su actividad y función están reguladas de forma diferente y pueden funcionar independientemente aún en el mismo tipo celular. Aunque tradicionalmente se ha considerado a COX-2 como la isoforma inducible, ambas isoformas se expresan constitutivamente en el organismo. COX-1 se expresa constitutivamente en la mayoría de los tejidos, con especial abundancia en las células endoteliales, aunque también puede

sobreexpresarse en respuesta a determinados estímulos, como por ejemplo el estrés por fricción (Féletou et al., 2011; Matsumoto et al., 2015a), y se le adjudica la producción de prostanoïdes requeridos para funciones homeostáticas (Kim, 2011). COX-2 es altamente inducible en respuesta a estímulos proliferativos e inflamatorios y al estrés por fricción, por lo que se cree que participa en procesos inflamatorios y tumorigénesis, aunque también se expresa de forma constitutiva en el endotelio, cerebro y riñón (Féletou et al., 2011; Kim, 2011; Matsumoto et al., 2015a; Luo et al., 2016). Estudios bioquímicos en cultivos celulares que expresan las dos isoformas de COX han demostrado que COX-2 necesita menos concentración de sustrato que COX-1, por lo que podría funcionar en la presencia de COX-1 sin que ésta se encuentre activada y, además, podría ser la mayor fuente fisiológica de PGI₂ (Féletou et al., 2011; Luo et al., 2016). Es por esto que se cree que existen roles específicos para cada isoforma de la enzima (Kim, 2011).

La PGI₂ y el TXA₂ son considerados los prostanoïdes más especializados y los que ejercen mayor impacto en el sistema cardiovascular (Féletou et al., 2011; Kim, 2011; Luo et al., 2016); por esta razón se ahondará en ellos.

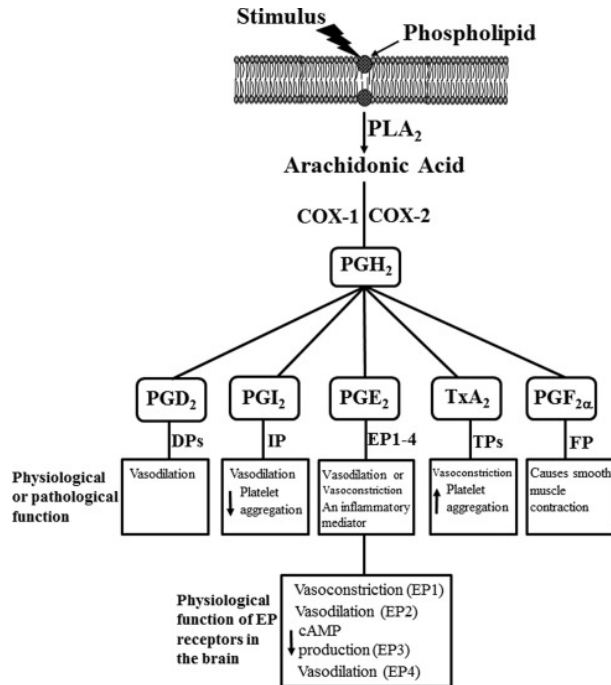


Figura 11. Síntesis de prostanoideos, receptores y efectos fisiológicos. Tomado de Huang et al., 2016.

6.1.2.1. Tromboxano A₂ (TXA₂)

El TXA₂ es sintetizado mayoritariamente en las plaquetas por acción de la enzima TXA₂ sintasa (TXAS), mediado por la COX-1; aunque también puede producirse en la pared vascular. Tiene efectos vasoconstrictores potentes y proagregantes plaquetarios (Kim, 2011; Luo et al., 2016) y además, participa en las alergias, modelación de la inmunidad adquirida, aterogénesis, neovascularización y metástasis de células cancerígenas (Félétou et al., 2011). El TXA₂ es el ligando preferencial de los receptores de prostanoideos para tromboxano (TP), aunque altas concentraciones de otras prostaglandinas y sus precursores también pueden activarlos. La vía de señalización asociada a la activación de estos receptores involucra

Mikahela López Morales

principalmente a dos tipos de proteína G, Gq y G13, resultando en activación de la fosfolipasa C y RhoGEF, respectivamente (Félétoú et al., 2011). La activación de la fosfolipasa C y la consiguiente formación de inositol 1,4,5-trisfosfato y diacilglicerol producen, respectivamente, salida de Ca^{2+} del retículo sarcoplásmico y activación de la proteína quinasa C (PKC), que finalmente generan contracción del músculo liso vascular (Figura 12).

El TXA_2 es inactivado por la conversión a un metabolito inactivo llamado TXB_2 que tiene una vida media de 30 segundos (Luo et al., 2016).

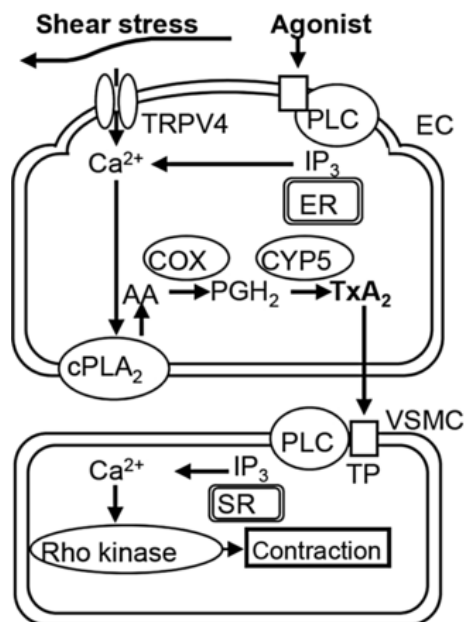


Figura 12. Síntesis y mecanismo de acción del tromboxano A₂ en el lecho vascular. EC= célula endotelial, VSMC= célula muscular lisa vascular, AA= ácido araquidónico, COX= ciclooxigenasa, cPLA₂= fosfolipasa A₂ constitutiva, CYP= citocromo P450, IP₃= inositol 1,4,5-trisfosfato, ER= retículo endoplásmico, PGH₂= prostaglandina H₂, PLC= fosfolipasa C, SR= retículo sarcoplásmico, TP= receptor de tromboxano/prostaglandina. Tomado de Ellinsworth et al., 2014.

6.1.2.2. Prostaciclina (PGI₂)

La PGI₂ es el principal y más abundante metabolito del AA; se sintetiza mayoritariamente en el endotelio vascular por acción de la enzima PGI₂ sintasa (PGIS) y luego es liberada para actuar preferentemente sobre los receptores de prostanoïdes para prostaciclina (IP) y ejercer sus efectos vasodilatadores y antiagregantes (Kim, 2011; Luo et al., 2016). La PGIS se expresa también en células vasculares lisas, neuronas, oviductos, células epiteliales intestinales y células embrionarias (Félétou et al., 2011).

Los receptores IP, la mayoría de las veces, activan la adenilato ciclasa, causando una elevación del cAMP intracelular (Félétou et al., 2011), el cual activa la proteína kinasa A (PKA) y la proteína de intercambio activada por cAMP (Exchange protein activated by cAMP, Epac), que produce una disminución del Ca²⁺ citosólico libre y que media relajación, disminución de la agregación plaquetar, disminución del remodelado vascular y disminución de la inflamación (Figura 13). Además, la prostaciclina también actúa sobre un receptor citosólico, el receptor activado por la proliferación de los peroxisomas beta (peroxisome proliferator-activated receptors, PPAR-β), que actúa por mecanismos genómicos y no genómicos, y cuya activación tiene importantes acciones antiinflamatorias (Mitchell et al., 2014).

La prostaciclina se sintetiza por ambas isoenzimas COX-1 y COX-2; se cree que en condiciones fisiológicas se sintetiza principalmente por la vía COX-1. Sin embargo, en situaciones de inflamación, la sobreestimulación de la COX-2 puede producir cantidades elevadas de PGI₂.

La PGI₂ es rápidamente hidrolizada a un metabolito inactivo llamado 6-keto-PGF_{1α} que tiene una vida media de 3 minutos.

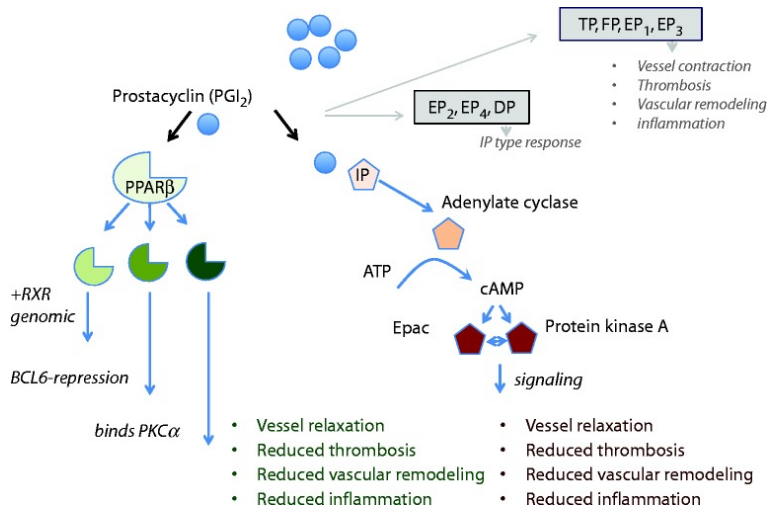


Figura 13. Mecanismos de acción de la prostaciclina. Tomado de Mitchell et al., 2014.

6.1.3. Factor hiperpolarizante derivado del endotelio (EDHF)

El EDHF es otro factor vasodilatador liberado por el endotelio. Desde principios de los años 80s se conocía que determinadas sustancias producían vasodilatación por un mecanismo que implicaba la hiperpolarización de la membrana de la célula muscular, y que este efecto solo se observaba en presencia de endotelio, por lo que empezó a usarse el término de endothelium-derived hyperpolarizing factor, EDHF (Garland y Dora, 2016). El mecanismo iónico de la hiperpolarización consiste en la salida de K⁺ desde el interior celular a través de canales de K⁺. La hiperpolarización resultante provocaría el cierre de los canales de Ca²⁺ operados por voltaje, con la consiguiente disminución de Ca²⁺ citosólico libre y relajación del músculo liso vascular. La idea inicial de la existencia de

un factor difusible que se generaba en el endotelio y que producía hiperpolarización de la célula muscular lisa de la pared vascular, y por tanto vasodilatación, ha ido evolucionando progresivamente hacia el concepto de hiperpolarización dependiente de endotelio (EDH), como expresión de una corriente hiperpolarizante que se genera en el endotelio y que se propaga al músculo liso adyacente, no siempre por medio de un factor difusible (Féléto y Vanhoutte, 2009; Sorensen et al., 2012; Ellinsworth et al., 2014; Garland y Dora, 2016). EDH se activa por un aumento del Ca^{2+} libre en la célula endotelial, que potencialmente produce la activación de tres subtipos de canales de K^+ activados por calcio (K_{Ca}): los de pequeña (SK_{Ca}), intermedia (IK_{Ca}) y gran (BK_{Ca}) conductancia. Los dos primeros están presentes constitutivamente en la célula endotelial, y los BK_{Ca} actúan como dianas en el músculo liso de un factor difusible EDHF. El propio K^+ que sale al líquido extracelular desde la célula endotelial a través de los canales SK_{Ca} e IK_{Ca} puede actuar como factor difusible EDHF (Dong et al., 2016; Garland y Dora, 2016). Por otra parte, la existencia de uniones mioendoteliales tipo GAP también contribuye a la transmisión directa de la corriente hiperpolarizante desde la célula endotelial a la célula muscular, sin necesidad de factor difusible (Figura 14). El tono vascular en un territorio determinado no es simplemente el resultado de la suma lineal del efecto contráctil/relajante de cada uno de los factores reguladores del tono, sino que se han descrito diversas interrelaciones entre ellos. Además, la importancia relativa de los diversos factores varía en función del lecho vascular. En muchos lechos vasculares, la contribución del factor

hiperpolarizante endotelial aumenta y la del óxido nítrico disminuye conforme disminuye el radio del vaso.

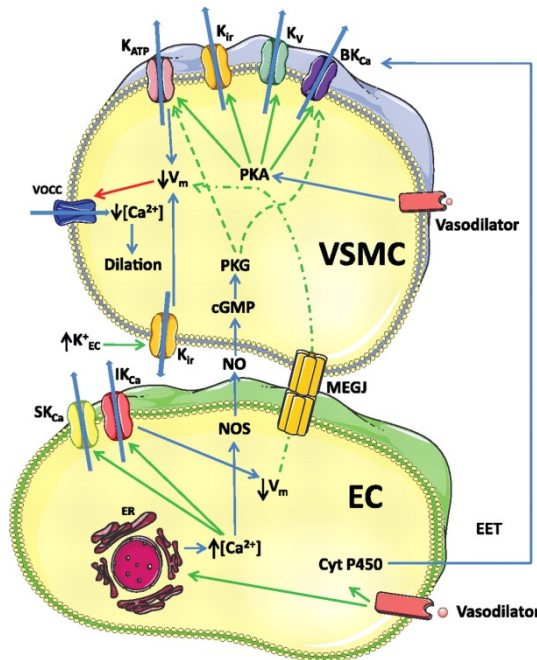


Figura 14. Vías de vasodilatación que implican canales de K^+ . MEGJ= unión mioendotelial. La flecha azul indica efecto, la flecha roja indica inhibición, la flecha verde indica activación. Tomado de Sorensen et al., 2012.

6.1.4. Canales de K^+ y tono vascular

Los canales de K^+ constituyen la más extensa familia de proteínas integrales de membrana, codificadas por más de setenta genes, que forman poros a través de los cuales puede difundir el K^+ (Humphries y Dart, 2015). Estructuralmente, los canales de K^+ tienen subunidades alfa que forman el poro, y pueden tener asociadas otras subunidades auxiliares reguladoras. Las tres familias más importantes se denominan en función de las unidades transmembrana de la subunidad alfa (Petkov, 2009; Alexander

et al., 2011; Humphries y Dart, 2015): 2TM, 4TM y 6TM con dos, cuatro y seis dominios transmembrana respectivamente. La familia 2TM se conoce también como la familia de canales de K^+ rectificadores de entrada (inward-rectifier K^+ channels, K_{IR}), y comprende siete subfamilias, entre las que cabe resaltar la de los canales sensibles a ATP (K_{ATP} o $K_{IR6.X}$, con los subtipos $K_{IR6.1}$ y $K_{IR6.2}$), que tienen como subunidades asociadas los receptores de las sulfonilureas (SUR) y que se bloquean con glibenclamida. La familia 4TM es la que ha suscitado menor consenso en su nomenclatura, comprende seis subfamilias, con diversos subtipos en cada una de ellas, y se caracterizan porque las subunidades alfa formadoras del poro forman dos poros, por lo que también se conoce esta familia como canales K_{2P} . La familia 6TM comprende, entre otras, varias subfamilias de canales de K^+ activados por voltaje (K_V), que se bloquean con 4-aminopiridina, y dos subfamilias de canales de K^+ activados por Ca^{2+} (K_{Ca}), la subfamilia Slo o Maxi K_{Ca} , que se bloquean por tetraetilamonio (TEA) e iberiotoxina, y que en realidad es 7TM, y la subfamilia SK, que se bloquean con charibdotoxina y apamina.

6.2. Complicaciones vasculares de la diabetes

La diabetes con un mal control de la hiperglucemia conduce a alteraciones vasculares por múltiples mecanismos, incluyendo complicaciones microvasculares y macrovasculares (Orasanu y Plutzky, 2009) que por sí mismas representan una elevada morbilidad y mortalidad. Un adecuado control de las cifras de glucemia constituye la mejor herramienta preventiva de estas complicaciones. Entre las complicaciones

más graves están las que afectan al sistema cardiovascular, y suelen agruparse en macropatías (ictus, cardiopatía isquémica e infarto de miocardio) y micropatías (retinopatía, neuropatía, isquemia de los miembros inferiores), según afecten a vasos de grande o pequeño calibre (Orasanu y Plutzky, 2009; Domingueti et al., 2016).

La alteración principal es una disfunción endotelial, pero también se producen alteraciones en la contractilidad del músculo liso vascular que provocan cambios en la reactividad vascular (Ding y Triggle, 2010; Chaudhuri, 2002). La disfunción endotelial se caracteriza por una disminución de la respuesta vasodilatadora mediada por el endotelio. En la diabetes, la hiperglucemia juega un papel clave en el desarrollo del daño vascular a través de diversos mecanismos, que están intensamente interrelacionados (Xu, 2015; Domingueti et al., 2016): 1) glucosilación irreversible no enzimática de las proteínas; 2) alteración del potencial redox celular; 3) inflamación; 4) disfunción endotelial; y 5) hipercoagulabilidad (Figura 15).

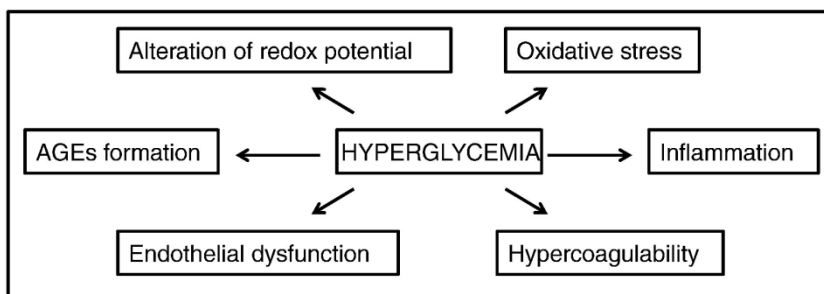


Figura 15. Mecanismos implicados en el desarrollo de las complicaciones vasculares en la diabetes. Tomado de Domingueti et al., 2016.

La célula endotelial es muy sensible a la hiperglucemia, ya que la glucosa difunde pasivamente al interior celular sin necesidad de insulina. La acumulación intracelular de glucosa en la célula endotelial activa una vía metabólica secundaria, la vía de la aldosa reductasa, en la que las enzimas aldosa reductasa y sorbitol deshidrogenasa catalizan el metabolismo de glucosa a sorbitol y de sorbitol a fructosa, respectivamente. Estas reacciones implican la oxidación del NADPH a NADP⁺ y la reducción del NAD⁺ a NADH. Por ello, el excesivo flujo de glucosa al interior de la célula endotelial produce un cambio del potencial redox, como consecuencia de la depleción del NADPH celular y el aumento del cociente NADH/NAD⁺ citosólico (Figura 16). El aumento de este cociente por la hiperglucemia imita los efectos de la hipoxia, causando una aceleración de la glucólisis, con el consiguiente aumento de la síntesis de novo de diacilglicerol a partir de metabolitos intermedios de la glucólisis, y la subsiguiente activación de la PKC (Kizub et al., 2014; Domingueti et al., 2016).

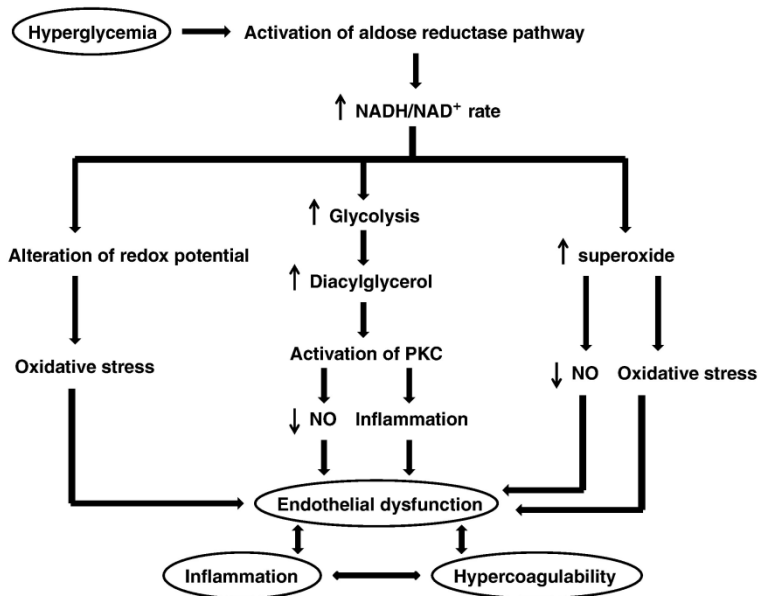


Figura 16. Mecanismos por los cuales la hiperglucemia puede producir daño vascular a través de la vía de la aldosa reductasa. Tomado de Domingueti et al., 2016.

La activación de la PKC interfiere con la síntesis de NO, promueve un aumento de la permeabilidad vascular y de la contractilidad, estimula la síntesis de la matriz extracelular y el engrosamiento de la membrana basal, y promueve una respuesta inflamatoria a través de la activación de citoquinas y moléculas de adhesión. Además, la alteración del cociente NADH/NAD⁺ también ocasiona un aumento de la producción de anión superóxido debido a la activación de oxidasas dependientes de la NADH, el cual oxida lipoproteínas de baja densidad (LDL), tiene efectos citotóxicos en las células endoteliales y provoca la disminución de la biodisponibilidad de NO, lo que conlleva a la disfunción endotelial. El endotelio dañado libera a su vez moléculas procoagulantes, como factor Von Willebrand (VWF),

inhibidor del activador del plasminógeno 1 (PAI-1) y tromboxano A₂, y expresa en su superficie factor tisular (TF) y moléculas de adhesión, como P-selectina, E-selectina, molécula de adhesión vascular 1 (VCAM-1) y molécula de adhesión intracelular 1 (ICAM-1), que median la interacción de los neutrófilos y plaquetas con el endotelio. Por lo tanto, la disfunción endotelial puede provocar un estado proinflamatorio y procoagulante.

Cuando se exponen a las aldosas, las proteínas son sometidas a un proceso de glucosilación y oxidación. Inicialmente la reacción consiste en la condensación de la glucosa a través de su grupo carbonilo con los grupos amino de las proteínas para formar compuestos inestables y reversibles, denominados bases de Schiff, las cuales pueden posteriormente sufrir un remodelado para formar compuestos más estables, denominados compuestos de Amadori como, por ejemplo, la hemoglobina glucosilada. Estos compuestos estables sufren complejas transformaciones que conducen a la formación de los denominados productos finales de la glucosilación avanzada (AGEs, de advanced glycation end-products), que son irreversibles. Las moléculas ligadas a AGEs adquieren nuevas propiedades, y son prooxidantes, lo que conlleva la producción de especies reactivas de oxígeno, que favorecen un aumento del estrés oxidativo e inhiben la liberación de NO, comprometiendo la función vascular (Figura 17). Los AGEs pueden unirse a sus receptores RAGE (receptors for advanced glycation end-products), presentes en la superficie de las células endoteliales, células musculares lisas perivasculares, fibroblastos, linfocitos, monocitos y macrófagos, con la consiguiente activación del factor nuclear de transcripción kappa B (NF-κB, nuclear factor-kappa B).

Tras su activación, el factor NF- κ B induce la transcripción de varios genes, entre ellos los de la endotelina-1, VCAM-1, ICAM-1, E-selectina, trombosmodulina, factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF, vascular endothelial growth factor), interleuquina-1 (IL-1), TNF- α y RAGE, provocando un estado proinflamatorio y procoagulante, que causa activación endotelial. El aumento de la expresión de citoquinas inflamatorias y moléculas de adhesión puede amplificar las respuestas inflamatorias, agravando el daño vascular. Además, las citoquinas proinflamatorias TNF- α , IL-1 e IL-6 median el efecto procoagulante del endotelio lesionado, ya que estimulan la liberación y expresión endotelial de moléculas procoagulantes como VWF, PAI-1 y TF, e inhiben la expresión de moléculas anticoagulantes como la trombosmodulina. Además, la producción aumentada de factores de crecimiento como el VEGF y el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF, fibroblast growth factor) puede estimular el remodelado vascular, produciendo un engrosamiento de la membrana basal, que favorece el depósito de lípidos, promueve la esclerosis y daña la vasodilatación. El daño vascular, el estrés oxidativo, la inflamación y la alteración crónica del balance hemodinámico producidos por la hiperglucemia pueden iniciar un proceso de aterosclerosis y la formación de trombos intraarteriales. La expresión de moléculas de adhesión en el endotelio lesionado promueve su unión con los leucocitos y su transmigración al interior de la pared vascular. Además, se reclutan y activan los monocitos circulantes, se transforman en macrófagos, que fagocitan el exceso de LDL oxidado y se transforman en células espumosas que forman las líneas o rayas grasas características de las fases iniciales del

proceso aterosclerótico. Los monocitos también liberan citoquinas que promueven el reclutamiento de otras células inflamatorias. En respuesta a este estado proinflamatorio las células musculares lisas proliferan y emigran desde la túnica media a la íntima, y sintetizan y secretan matriz extracelular (colágeno, elastina y proteoglicanos) que facilitan la formación de un fibroateroma. En las fases iniciales de la aterosclerosis no se suele producir trombosis. Sin embargo, cuando el proceso avanza, se producen fisuras o ulceraciones de la placa que, expuestas a sustancias altamente trombogénicas como el TF y VWF, provoca la adhesión y agregación plaquetar y un rápido crecimiento del trombo. Además, las plaquetas activadas también liberan citoquinas y factores de crecimiento que facilitan el reclutamiento de monocitos a la placa aterosclerótica y estimulan la proliferación de fibroblastos y de células musculares lisas, que acentúan el proceso aterosclerótico. Las plaquetas activadas también pueden interactuar con el endotelio, estimulando la formación de moléculas de adhesión y citoquinas, exacerbando el proceso inflamatorio. Resulta por tanto incontestable el papel de la disfunción endotelial, la inflamación y la hipercoagulabilidad en el desarrollo de las complicaciones vasculares en la diabetes.

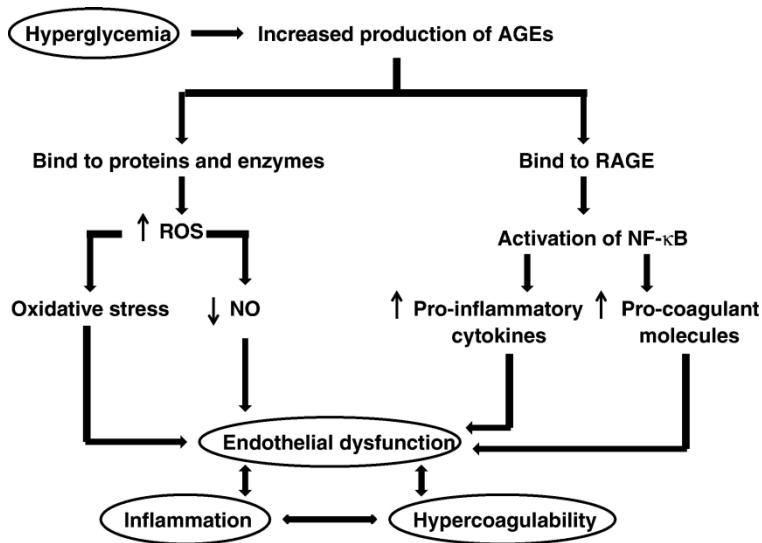


Figura 17. Mecanismos por los cuales la hiperglucemia puede producir daño vascular a través de la vía de los productos finales de la glucosilación avanzada (AGEs). Tomado de Domingueti et al., 2016.

En un metaanálisis (Loader et al., 2015) se ha observado que durante la hiperglucemia aguda se produce una disminución de la función endotelial en la macrocirculación, aunque no se ha observado en la microcirculación; sin embargo, la función de las células musculares lisas no se ve afectada durante la hiperglucemia aguda. Esta disfunción endotelial macrovascular puede ser atribuible a una disminución de la biodisponibilidad de NO secundaria al estrés oxidativo producido por la hiperglucemia. La ausencia de disfunción endotelial en la microcirculación podría explicarse por el hecho de que el NO tiene un menor peso en la regulación vascular en la microcirculación, pesando más otros mediadores químicos vasodilatadores como el EDHF o la prostaciclina. Por otra parte, el hecho de que la función del músculo liso vascular no esté alterada durante la hiperglucemia aguda indica que la disfunción endotelial precede a la

disfunción de la célula muscular lisa, sugiriendo que la disfunción endotelial tiene un papel primordial en la patogénesis de la enfermedad cardiovascular (Loader et al., 2015). Aunque la menor biodisponibilidad de NO durante la hiperglucemia aguda pueda ser transitoria, la repetición o el mantenimiento de esta situación puede provocar un estado proinflamatorio con proliferación del músculo liso vascular, mayor tono vasoconstrictor y remodelado vascular, todos ellos factores que están implicados en la fisiopatología de la enfermedad cardiovascular.

Como se ha comentado anteriormente, en condiciones fisiológicas el NO se sintetiza a partir de L-arginina con la participación de la enzima NO sintasa (NOS), enzima que está inhibida por la dimetil arginina asimétrica (ADMA). El NO ejerce sus acciones vasodilatadoras, antiagregantes, antiproliferativas y antioxidantes a través de la activación de la guanilato ciclasa soluble (sGC) y la formación de cGMP. Sin embargo, durante la hiperglucemia aguda se genera un exceso de superóxido que secuestra el NO, contribuyendo a la atenuación de sus acciones tisulares y a la formación de peroxinitrito (ONOO^-). Además, se aumenta la expresión de una proteína proinflamatoria, la thioredoxin-interacting protein (TXNIP), que aumenta el estrés oxidativo, contribuyendo potencialmente a la disfunción de la sGC (Horowitz et al., 2015).

Diversos estudios han puesto de manifiesto que en la diabetes se produce una disminución de la síntesis de prostaciclina y un aumento de la síntesis de tromboxano, condicionando un aumento del cociente vasoconstrictor/vasodilatador prostanoidérgico en diabetes que puede contribuir a la disfunción endotelial, hipercoagulabilidad, aterosclerosis y

trombosis (Stitham y Hwa, 2016). Los mecanismos propuestos por los cuales la hiperglucemia produciría ese cambio en el balance regulador de los prostanoides serían básicamente un aumento de la inducción de COX-2, mediada por el aumento de la PKC descrito en párrafos anteriores (Kizub et al., 2014; Domingueti et al., 2016; Stitham y Hwa, 2016), y que produciría un aumento del TXA₂, y por otra parte, ONOO⁻ inhibiría la prostaciclina sintasa, lo que conllevaría una disminución de la síntesis de prostaciclina (Figura 18).

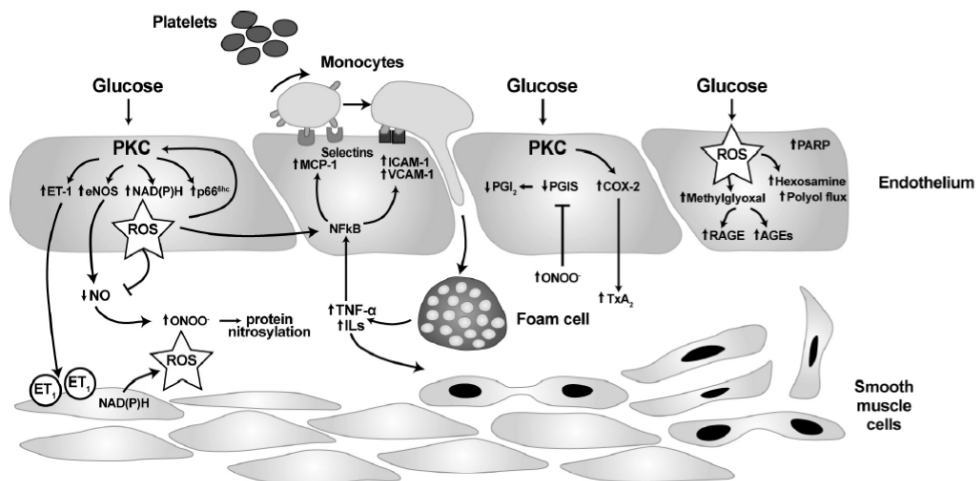


Figura 18. Mecanismos por los que la hiperglucemia produce cambios en el balance de los prostanoides en el lecho vascular en la diabetes. Tomado de Stitham y Hwa, 2016.

La disfunción endotelial en la diabetes también podría estar relacionada con cambios en el mecanismo de relajación vascular dependiente de EDH. Se ha observado que los AGEs inducen sobreexpresión de los canales IK_{Ca} en el músculo liso vascular y en fibroblastos (Zhao et al., 2012; Zhao et al., 2013). En un modelo de diabetes tipo 2 en ratas (ratas ZDF) se ha descrito una elevada contribución de los

canales IK_{Ca} en la respuesta vasodilatadora de la arteria mesentérica, que se acompaña de un aumento de expresión de dichos canales en la pared arterial (Schach et al., 2014). El bloqueo farmacológico de los canales IK_{Ca} reduce significativamente el desarrollo de la nefropatía diabética (Huang et al., 2015). En arteriolas coronarias humanas se ha descrito que la respuesta al NS309, un activador de los canales endoteliales SK_{Ca} e IK_{Ca} , está disminuida en la diabetes, aunque este menor papel funcional de estos canales no se acompaña de cambios significativos en la expresión de los mismos en el lecho arteriolar (Liu et al., 2015). De forma similar, una alteración en la relajación mediada por activación de canales IK_{Ca} contribuye a la disfunción endotelial en la circulación uteroplacentaria en ratas (Gokina et al., 2015). Por otra parte, la actividad de los canales BK_{Ca} (Nystoriak et al., 2014; Qian et al., 2014) y K_v (Nieves-Cintrón et al., 2015; Hong et al., 2016) también está alterada en la diabetes, y contribuye al mayor tono arterial.

6.3. Alteraciones cerebrovasculares de la diabetes e ictus

La diabetes produce cambios estructurales y funcionales en el lecho cerebrovascular, y las respuestas vasculares se ven afectadas de diferente manera en los grandes y pequeños vasos cerebrales. Estas alteraciones locales pueden tener un papel importante en la regulación fisiológica de la perfusión cerebral y en la patogenia de las complicaciones cerebrales de la diabetes, incluyendo el ictus (Ergul et al., 2012). De hecho, la relación entre la diabetes y el ictus es bidireccional: la diabetes es un fuerte factor de riesgo independiente de ictus, está asociada con malos resultados

funcionales y altas tasas de mortalidad, y más de un tercio de los pacientes con ictus agudo presentan hiperglucemia, muchos de los cuales no han tenido historia previa conocida de diabetes. Además, los pacientes que sufren un ictus y que presentan hiperglucemia aguda desde el inicio, tienen menor tasa de recanalización y mayor riesgo de transformación hemorrágica con el tratamiento con el activador del plasminógeno tisular (Luitse et al., 2012; Hafez et al., 2014).

7. EL SISTEMA DE PÉPTIDOS NATRIURÉTICOS EN EL ICTUS: ANP COMO OPCIÓN TERAPÉUTICA

En la búsqueda de nuevas terapias y agentes neuroprotectores más efectivos para el tratamiento del ictus isquémico agudo, el sistema de los péptidos natriuréticos representa una fuerte alternativa.

7.1. El sistema de péptidos natriuréticos: péptidos, receptores y aplicación clínica

Los péptidos natriuréticos son un importante sistema autocrino, paracrino y endocrino que participa en el control de la presión arterial y la homeostasis de fluidos mediante la afectación de la hemodinámica central y periférica (Guo et al., 2014; Hodes y Lichtstein, 2014). Se han identificado tres péptidos natriuréticos distintos, pero estructuralmente relacionados: péptido atrial natriurético (ANP), péptido natriurético tipo B (BNP) y péptido natriurético tipo C (CNP). Los tres péptidos son sintetizados inicialmente como prohormonas y su subsecuente escisión da como resultado la formación de los péptidos biológicamente activos (Kerkelä et

al., 2015). Tienen una estructura común constituida por un anillo de 17 aminoácidos con un puente disulfuro entre los dos residuos cisteínicos. En humanos, la secuencia de aminoácidos de este anillo es muy similar, con pequeños cambios de un péptido a otro (Figura 19).

El ANP es mayormente sintetizado, almacenado y liberado por los cardiomiocitos auriculares en respuesta al aumento de la tensión de la pared de la aurícula y al aumento del volumen intravascular, se sintetiza también en los ventrículos en situaciones de estrés hemodinámico (Potter et al., 2006; Pandey, 2011; De Vito et al., 2014; Kerkelä et al., 2015; Song et al., 2015). Deriva de un péptido precursor llamado pre-pro-ANP, que es fragmentado formando otro péptido llamado pro-ANP, el cual se almacena en gránulos en los cardiomiocitos auriculares (De Vito et al., 2014; Song et al., 2015). Cuando las células cardíacas son debidamente estimuladas, el pro-ANP es liberado a la circulación y es escindido generándose un péptido N-terminal (NT-pro-ANP) y el péptido C-terminal biológicamente activo de 28 aminoácidos, ANP (Song et al., 2015). El BNP se sintetiza principalmente por los cardiomiocitos ventriculares y su liberación aumenta en situaciones que aumentan la precarga y poscarga cardíaca; al igual que el ANP, se sintetiza como preprohormona y su forma biológicamente activa está compuesta por 32 aminoácidos. El CNP se produce y libera mayoritariamente por las células endoteliales en respuesta al estrés de fricción, a agentes vasoactivos y a citoquinas proinflamatorias, aunque también se produce en el cerebro, cartílago y otros tejidos periféricos (Potter et al., 2006; Pandey, 2011; Guo et al., 2014; Kerkelä et al., 2015); su forma activa está compuesta por 22 aminoácidos (Figura 19).

tanto de venas como de arterias, además está presente en neuronas y otros tejidos (Guo et al., 2014) como glándula adrenal, riñón y corazón (Nakayama, 2005; Gardner et al., 2007). El receptor NPR-B está localizado en el cerebro y sistema vascular, especialmente en venas (Guo et al., 2014), además está presente en la glándula adrenal y riñón. Y el receptor NPR-C se ubica en las células musculares lisas vasculares, células endoteliales, pulmón, riñón (Nakayama, 2005; Potter et al., 2006; Pandey, 2011).

NPR-A y NPR-B poseen un segmento de transmembrana acoplado a la enzima guanilato-ciclasa (GC) en el dominio intracelular. La unión del péptido al receptor estimula la actividad de GC y se genera como segundo mensajero GMP cíclico (cGMP) (Gardner et al., 2007; Misono et al., 2011; Pandey, 2011; Potter, 2011), el cual puede actuar sobre tres tipos de efectores para producir efectos fisiológicos: 1) proteínas kinasas dependientes de cGMP (PKG), la cuales se piensa que ejercen los efectos cardioprotectores de los péptidos natriuréticos; 2) fosfodiesterasas reguladas por cGMP; y 3) canales iónicos regulados por cGMP. El NPR-C, por otra parte, carece de un dominio intracelular unido a GC y cumple la función de aclaramiento de los tres péptidos, internalizándolos y removiéndolos de la circulación (Figura 20) (Potter et al., 2006; Kerkelä et al., 2015; Song et al., 2015).

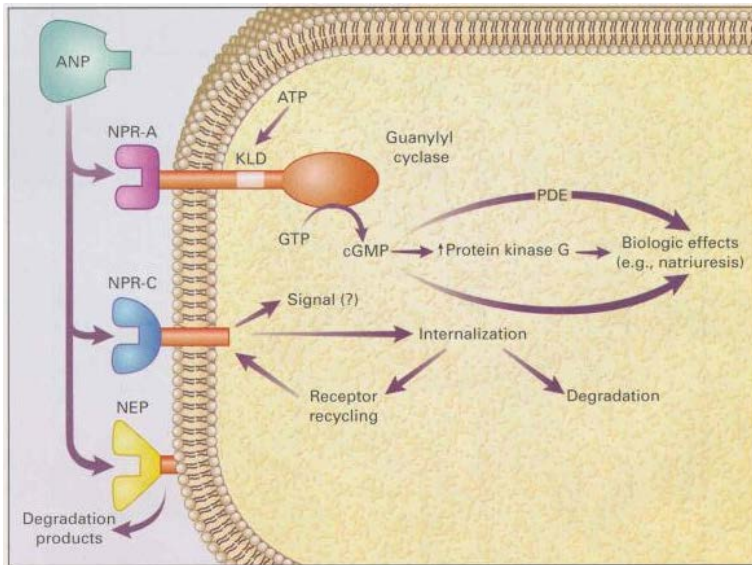


Figura 20. Receptores NPR para ANP y mecanismos de acción de ANP. Tomado de Levin et al., 1998.

La importancia de los péptidos natriuréticos en la regulación de la homeostasis cardiovascular está relacionada con sus acciones sobre distintos órganos y sistemas. Los péptidos natriuréticos inhiben el sistema renina-angiotensina-aldosterona, aumentando la excreción renal de sodio y de agua, e inhiben la actividad del sistema nervioso autónomo, reduciendo el tono vascular. El aumento de la diuresis y natriuresis está relacionado también con una acción directa a nivel renal, donde aumentan el filtrado glomerular y disminuyen la reabsorción de agua en el túbulo proximal y en el tubo colector. Además, los péptidos natriuréticos aumentan la permeabilidad endotelial, facilitando el paso de agua al compartimento extracelular y reducen la precarga, posiblemente por disminución del retorno venoso y aumento de la capacitancia venosa. También se ha descrito que los péptidos natriuréticos pueden ejercer

importantes acciones metabólicas. En el tejido adiposo aumentan la lipólisis y la liberación de adiponectinas, e inhiben la liberación de leptina; además, aumentan la biogénesis mitocondrial y la capacidad oxidativa en el tejido adiposo y en músculo esquelético.

En el contexto clínico, los péptidos natriuréticos han emergido como una herramienta para el diagnóstico, pronóstico y terapéutica cardiovascular (Potter et al., 2006; Gruden et al., 2014; Schlueter et al., 2014; Kerkelä et al., 2015).

7.2. Péptidos natriuréticos y diabetes

A raíz del conocimiento de las acciones metabólicas de los péptidos natriuréticos ha suscitado gran interés la posible relación de este sistema con la obesidad, la diabetes mellitus tipo 1 y 2 y la resistencia a la insulina (Gruden et al., 2014; Schlueter et al., 2014). Se ha descrito que existe un aumento de la concentración plasmática de ANP en pacientes con diabetes tipo 1 (McKenna et al., 2005) y tipo 2 (Nannipieri et al., 2002); situación que ha sido descrita también en modelos experimentales de diabetes en ratas (Obineche et al., 2004) y conejos (Yeğen et al., 1995). Este aumento de la concentración plasmática de ANP se ha relacionado con un mal control de la glucemia (McKenna et al., 2005). Los péptidos natriuréticos estimulan la lipólisis, aumentan la producción de adiponectina y pueden contribuir a un mejor control de la glucemia (Welsh y McMurray, 2012; Heinisch et al., 2012).

7.3. Péptidos natriuréticos en el sistema nervioso central: funciones y potencial neuroprotector

Los péptidos natriuréticos y sus receptores están expresados y distribuidos en el sistema nervioso central. Esto tiene dos consecuencias importantes: la primera es que, además de sus acciones periféricas, los péptidos natriuréticos podrían estar implicados en el control central de funciones cardiovasculares como la presión arterial (Hodes y Lichstein, 2014), y la segunda es que el sistema de los péptidos natriuréticos podría estar involucrado en una variedad de aspectos en la fisiología y fisiopatología del sistema nervioso central, por ejemplo, desarrollo neural, transmisión sináptica (Cao y Yang, 2008), comportamiento (Hodes y Lichstein, 2014), hemodinámica cerebral (Guo et al., 2014), homeostasis de fluidos, neuroinflamación, ansiedad y memoria (Mahinrad et al., 2016). De particular interés es la función neuroprotectora que los péptidos natriuréticos han presentado en varios ejemplos de daño neuronal experimental (Ma et al., 2010; Kuribayashi et al., 2006; Wiggins et al., 2003; Fiscus et al., 2001), conduciendo a la premisa de que los péptidos natriuréticos podrían ser parte de un mecanismo protector endógeno en el cerebro (Hodes y Lichstein, 2014).

7.4. Péptido atrial natriurético en el ictus: biomarcador y herramienta terapéutica

Diversos estudios experimentales han demostrado que el ANP, por su habilidad de regular el balance de fluidos y electrolitos disminuye el edema cerebral y el consecuente aumento de la presión intracraneal tras isquemia

cerebral focal (Naruse et al., 1991) o global (Akdemir et al., 1997; Nakao et al., 1990), así como tras hemorragia cerebral (Rosenberg y Estrada, 1995) en ratas. En concordancia, bajos niveles de mRNA de ANP se han asociado a aparición temprana de ictus en ratas espontáneamente hipertensas (Rubattu et al., 1999), y mutaciones en el gen de ANP se han asociado con remodelamiento cerebrovascular alterado e incremento del riesgo de un evento en las ratas espontáneamente hipertensas propensas a ictus (De Paolis et al., 2007). En contraste, algunos estudios desde el ámbito clínico han presentado resultados conflictivos. El aumento de la inmunoreactividad glial a ANP en la sustancia blanca peri infarto sugiere que podría contribuir a la regulación del flujo sanguíneo en el cerebro dañado (Nogami et al., 2001). La interacción del ANP y los polimorfismos del gen NPR-A se han asociado con aumento de la aparición y recurrencia de ictus (Rubattu et al., 2004). Niveles elevados en plasma de fragmentos de ANP han sido asociados con aumento del riesgo de ictus cardioembólico (Berntsson et al., 2014; Katan et al., 2016), y predicen resultados desfavorables y mortalidad luego de ictus isquémico (Mäkikallio et al., 2005; Katan et al., 2010) o hemorrágico (Fisher et al., 2014). Sin embargo, un reciente estudio de asociación genética ha demostrado un polimorfismo de nucleótido simple en el gen de ANP, cuyos portadores tienen bajos niveles plasmáticos de ANP y mayor incidencia de ictus (Pereira et al., 2015), en contraste con previos estudios que sugieren que altos niveles de ANP circulante son un biomarcador de riesgo de ictus.

Enfocándonos en el ANP en el escenario del ictus experimental, cierta evidencia nos lleva a sugerir que el ANP podría ser visto como un factor

protector debido, al menos en parte, a sus efectos antiedema y, por lo tanto, a su habilidad de disminuir la presión intracraneana (Nakao et al., 1990; Naruse et al., 1991; Rosenberg y Estrada, 1995; Akdemir et al., 1997). Una conclusión diferente parece derivar de estudios en humanos, en los que se ha descrito que niveles elevados de ANP (Rubattu et al., 2004; Mäkikallio et al., 2005) o de MR-proANP se asocian con malas consecuencias funcionales, aumento de la mortalidad y aumento de la incidencia de ictus (Katan et al., 2010; Berntsson et al., 2014; Katan et al., 2016).

Independientemente de las diferentes conclusiones derivadas de estudios preclínicos y clínicos, las estrategias terapéuticas dirigidas a los péptidos natriuréticos podrían tener un potencial papel en el ictus. Para nuestro conocimiento, la posibilidad de que el ANP podría mejorar el estatus neurológico y reducir el volumen de infarto, los principales objetivos de la neuroprotección en el ictus isquémico agudo, no han sido investigados en modelos animales de ictus isquémico.

7.5. Efectos vasoactivos del ANP: circulación cerebral

Se ha sugerido, además, que los péptidos natriuréticos participan en el control del flujo sanguíneo cerebral debido a la presencia de sitios de unión a ANP en la red vascular cerebral (Bianchi et al., 1986) y de neuronas corticales inmunoreactivas a ANP cerca de los vasos sanguíneos cerebrales (McKenzie et al., 1990). Sin embargo, estudios en animales en los que se evalúa el efecto de los péptidos natriuréticos en arterias cerebrales asiladas, en el diámetro *in situ* de vasos piales o en la perfusión cortical han

presentado resultados inconsistentes o incluso contradictorios (Guo et al., 2014). Un estudio reciente en voluntarios sanos mostró que la infusión intravenosa de péptidos natriuréticos a dosis farmacológica no modifica la velocidad del flujo sanguíneo de la arteria cerebral media y tiene efectos adversos (Guo et al., 2015). En contraste, la infusión intraarterial de péptidos natriuréticos indujo aumentos en el flujo sanguíneo del antebrazo en hombres sanos (van der Zander et al., 1999; Komarek et al., 2004). Los efectos vasodilatadores locales de los péptidos natriuréticos sugeridos en la circulación cerebral merecen mayor investigación para poder clarificar el rol fisiológico de estos péptidos en la regulación del flujo sanguíneo cerebral y su potencial participación en las enfermedades en las que está alterada la hemodinámica cerebral, como es el caso del ictus isquémico agudo.

Con la excepción de que el ANP induce vasoconstricción en arteriolas renales eferentes (Marin-Grez et al., 1986) y vasos esplénicos (Andrew y Kaufman, 2003), se sabe que el ANP ejerce vasodilatación (Winquist y Hintze, 1990), aunque con significativas diferencias regionales (Faison et al., 1985; Kawai y Ohhashi, 1989). Por otra parte, el efecto del ANP en la circulación cerebral es controversial (Guo et al., 2014; 2015), y existe una carencia de información acerca de los efectos vasoactivos de este péptido en condiciones de diabetes. En nuestro grupo de investigación hemos descrito previamente el efecto relajante del ANP y del BNP en la arteria carótida, y la hiporreactividad inducida por la diabetes ante estos dos péptidos en esta arteria extracraneal (Marrachelli et al., 2011; Centeno et al., 2013).

Objetivos

El objetivo genérico del trabajo de investigación que se presenta en esta Tesis Doctoral consiste en evaluar a nivel preclínico el potencial neuroprotector del péptido atrial natriurético (ANP) en el ictus isquémico, los efectos vasoactivos del ANP en las arterias cerebrales y su posible alteración por la diabetes.

Se han utilizado modelos animales de ictus y diabetes para abordar los siguientes objetivos concretos, con los que analizar los siguientes aspectos:

1. Efecto protector del ANP sobre el daño cerebral isquémico provocado por un ictus en rata, en términos de deterioro neurofuncional, volumen de infarto y muerte celular apoptótica.
2. Papel de la expresión en el tejido cerebral de los receptores para ANP (NPR-A y NPR-C) y de los subtipos de canales de K^+ en el efecto protector del péptido.
3. Implicación de la modulación en el tejido cerebral de las vías de señalización PI3K/Akt y MAPK/ERK1/2 en el efecto protector del ANP frente al daño isquémico.
4. Efecto relajante del ANP en la arteria basilar de conejo aislada, comprobando la expresión de receptores vasculares para ANP (NPR-A y NPR-C) y la participación del endotelio en el efecto relajante del péptido.
5. Intervención del óxido nítrico (NO), los prostanoïdes vasoconstrictores y vasodilatadores, y el flujo de salida de K^+ a través de diferentes subtipos de canales, en el efecto relajante del ANP.
6. Efecto de la diabetes sobre el efecto relajante del ANP en la arteria basilar y los mecanismos implicados en la relajación.

Material y métodos

1. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

Las condiciones de estabulación y los procedimientos experimentales utilizados se realizaron respetando la normativa española (RD 53/2013) que regula el uso de animales en la investigación científica, y se aprobaron por el Comité Ético de Bienestar Animal del Hospital La Fe y por el Comité de Ética de la Universidad de Valencia.

En este estudio se emplearon ratas Wistar macho de 300-350 g de peso (Charles River Laboratories, Barcelona, España) y conejos Blancos Nueva Zelanda machos de 2-3 kg de peso (Granja San Bernardo, Navarra, España)

Todos los animales se mantuvieron estabulados en ciclos de 12 h luz/oscuridad, con agua y comida *ad libitum*.

2. ICTUS ISQUÉMICO EN RATA

2.1. Oclusión transitoria de la arteria cerebral media mediante la técnica del filamento intraluminal

La preparación del modelo se lleva a cabo en dos días consecutivos. En el primer día, el animal es anestesiado mediante inyección i.p. de 5 mg/kg de diazepam (Valium®, Roche Pharma) y 100 mg/kg de ketamina (Ketolar®, Parke-Davis), y además se le proporciona analgesia mediante inyección s.c. de 0,1 mg/kg de buprenorfina (Buprex®, Schering-Plough). A continuación se coloca en decúbito prono en un marco estereotáxico (Kopf® Instruments, mod. 900) y se realiza una incisión longitudinal en la línea media de la cabeza. Se separan la piel y el periostio y se expone el cráneo.

Con la ayuda de un microscopio quirúrgico se realiza un trépano de 1 mm de diámetro situado 3 mm posterior al bregma y 4 mm a la derecha de la sutura sagital (LDF); y otros tres trépanos de 0,8 mm de diámetro, uno situado 1 mm posterior al bregma y 1,5 mm a la derecha de la sutura sagital (ICV), otro situado 2,5 mm posterior a LDF (T1), y otro situado 2,5 mm anterior al bregma y 2,5 mm a la izquierda de la sutura sagital (T2) (Figura 21). En los trépanos T1 y T2 se enroscan minitornillos de acero inoxidable (Fine Science Tools). A continuación, en el trépano ICV se introduce la cánula de un kit de infusión intracerebroventricular (Alzet Brain Infusion Kit 1, Durect Corp), la cual se fija al cráneo con cemento dental. Posteriormente, sobre el trépano LDF se coloca un cono de aguja de 21G cortada y limada que servirá de guía para una fibra óptica que se conectará a una sonda láser-Doppler, que nos permitirá medir el flujo sanguíneo cerebrocortical. Al igual que el kit de infusión intracerebroventricular, este cono se fija al cráneo con cemento dental, aprovechando el anclaje que ofrecen los tornillos T1 y T2. Finalmente se sutura la herida y se recupera al animal de la anestesia y se le estabula.

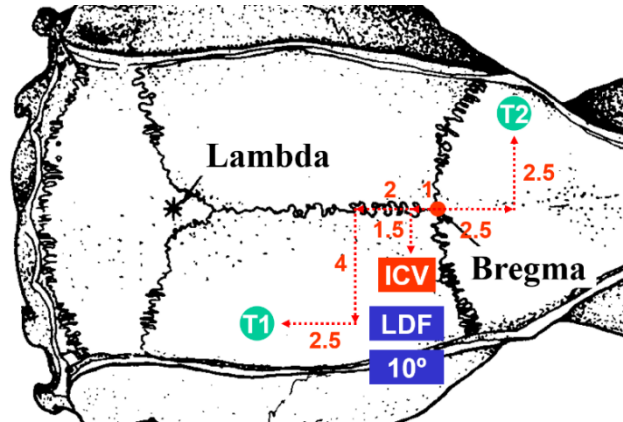


Figura 21. Localización del soporte de la sonda LDF, cánula ICV y tornillos de fijación. LDF: soporte para la sonda láser-Doppler; ICV: cánula intracerebroventricular; T1 y T2: tornillos de fijación.

En el segundo día, el animal se anestesia con una inyección i.p. de clorhidrato de ketamina, diazepam y sulfato de atropina (0,3 mg/Kg) (B. Braun Medical) para permitir la intubación orotraqueal con una cánula de 16G y se le proporciona analgesia mediante inyección s.c. de buprenorfina. Una vez intubado se monitorizan los siguientes parámetros: perfusión cerebrocortical (PC), presión arterial sistémica (PAS), temperatura corporal, presión parcial de oxígeno arterial (PaO_2), presión parcial de dióxido de carbono arterial (PaCO_2), pH arterial y glucemia.

Para la monitorización de la PC, la fibra óptica (mod. MT B500-0 L120, Perimed AB) se aloja en su correspondiente guía, avanzando su extremo hasta que establece suave contacto con la corteza cerebral. El otro extremo se conecta a una sonda láser-Doppler (Probe 418, Perimed AB) que, a su vez, está conectada a un medidor láser-Doppler (Periflux 4001 Master, Perimed AB). A continuación, el animal se posiciona en decúbito supino fijado a la mesa quirúrgica y se conecta a un ventilador mecánico

(Harvard Rodent Ventilator, mod. 683). La anestesia se mantiene con una mezcla de 0,5-1% de sevoflurano (Sevorane[®], Abbot Laboratories) en N₂O y O₂ (70:30, respectivamente), un volumen corriente de 2,5 mL y una frecuencia respiratoria inicial de 55-60 ciclos/minuto. La proporción de gases y frecuencia respiratoria se modifican a lo largo del experimento en función de los requerimientos del animal medidos mediante gasometría.

La temperatura corporal se mide mediante una sonda rectal y se mantiene a 37°C durante todo el experimento con la ayuda de una manta calefactora homeotérmica.

Para el registro de la PAS se introduce un catéter de 0,9 mm de diámetro externo (Vasocan[®] Braunüle[®], Braun Medical S.A.) en la arteria femoral izquierda, el cual se conecta, a través de una cúpula (Hewlett-Packard Medical Products Group, mod. 1295C), a un transductor de presión (Hewlett-Packard Medical Products Group, mod. 1290C), y éste a un medidor de presión arterial (Stoelting mod. 50110). El catéter femoral permite además obtener muestras de sangre arterial (0,2 mL) para monitorizar la PaO₂, PaCO₂ y pH con un analizador de gases (ABLTM5, Radiometer Medical A/S) y de la glucemia (Glucometer Elite[®], Química Farmacéutica Bayer) en tres momentos del procedimiento: antes (valor control), durante (valor representativo de la isquemia) y después (valor representativo de la reperfusión) del episodio de isquemia-reperfusión. Las señales de PC, PAS y temperatura corporal son digitalizadas (PF 472, Perimed AB) y enviadas a un ordenador equipado con un programa de adquisición y almacenamiento de datos para su posterior análisis (Perisoft v5.10, Perimed AB).

Una vez monitorizados los parámetros se procede a la oclusión de la arteria cerebral media (ACM) mediante la técnica del filamento intraluminal (Longa et al., 1989), esquematizada en la Figura 22.

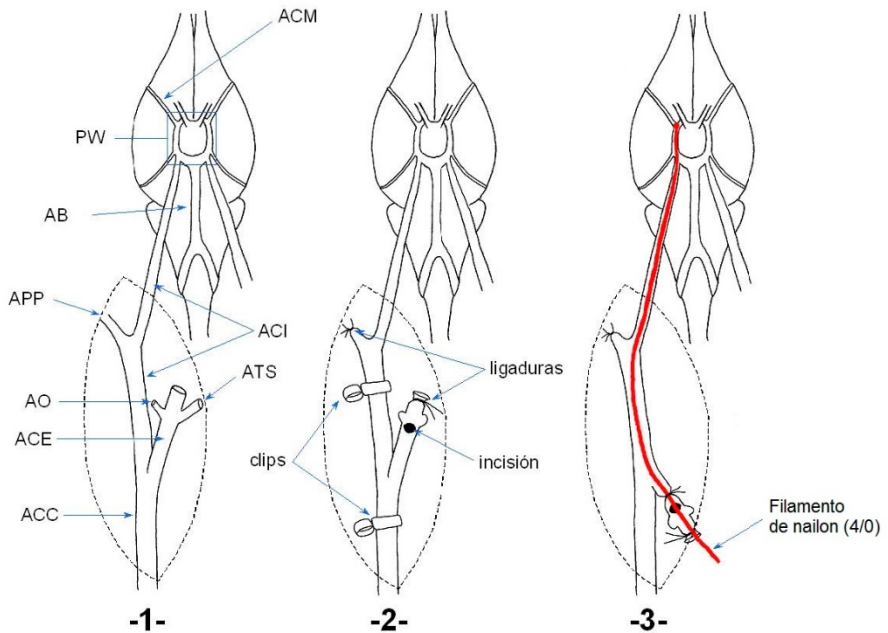


Figura 22. Anatomía vascular de la zona ventral derecha del cuello y de la base del encéfalo de la rata, y secuencia quirúrgica de la técnica del filamento intraluminal. La línea discontinua delimita el campo quirúrgico. 1. Arteria basilar (AB); arteria carótida común (ACC); arteria carótida externa (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 flujo sanguíneo y realización de una incisión en la ACE. 3. Retirada de los clips microvasculares e introducción de la sutura de nailon con la cabeza redondeada hasta la base de la ACM en el polígono de Willis.

La técnica consiste en la exposición de la arteria carótida común derecha tras 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 carótida común y carótida externa y se termocoagulan las dos primeras ramas de la última: 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 que se liga en su parte distal. El siguiente paso es introducir un filamento de nailon (4/0) con la punta redondeada por acercamiento a una fuente de calor, que ocluirá la ACM. Para ello se colocan dos clips microvasculares, uno en la arteria carótida común y otro en la arteria carótida interna, interrumpiéndose momentáneamente el flujo sanguíneo, y se realiza una pequeña incisión en el extremo distal del muñón de la arteria carótida externa por donde se introduce el filamento de nailon. Después de comprobar que el filamento se encuentra en la luz de la arteria se coloca una ligadura para impedir que sangre por la incisión, se retiran los clips y se restaura la circulación normal de la sangre.

Tras unos minutos de registro de las señales de PC, PAS y temperatura corporal y tras la extracción de la primera muestra de sangre arterial (muestra control), se hace avanzar el filamento hasta el origen de la ACM en el polígono de Willis. La colocación óptima del filamento se pone de manifiesto por el descenso brusco de la PC (Figura 23). La oclusión se mantiene durante 60 min, tras los cuales se extrae una nueva muestra de sangre arterial (muestra de isquemia) y se retira el filamento permitiendo la reperfusión, la cual se pone de manifiesto por la recuperación de los

valores de PC. Tras 15 min de reperfusión se extrae una nueva muestra de sangre arterial (muestra de reperfusión). Por último, se extrae el filamento y el catéter femoral, se suturan las heridas y el animal se estabula.

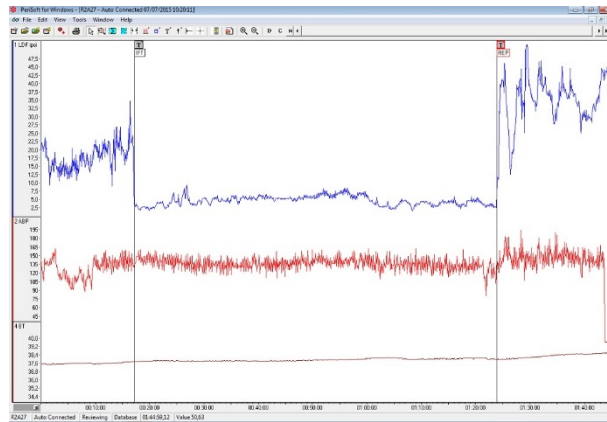


Figura 23. Registro de la perfusión cerebrocortical (PC) durante la intervención. De izquierda a derecha se observa, en línea azul, el valor basal de PC, el descenso brusco de ésta al colocar el filamento y la recuperación e incluso superación del nivel basal al quitar el filamento (reperfusión). La línea roja representa el registro de la presión arterial media.

2.2. Evaluación del daño cerebral isquémico

2.2.1. Valoración neurofuncional

La afectación del animal se evalúa mediante un test que permite cuantificar de 0 a 9 el grado de deterioro neurofuncional, siendo 0 ausencia de afectación y 9 afectación máxima. El test se basa en la observación de las siguientes respuestas con sus correspondientes puntuaciones:

- 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

2.2.2. Evaluación del volumen de infarto cerebral

El volumen de infarto se determinó mediante tinción con cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolio (TTC; Sigma-Aldrich) (Bederson et al., 1986). Esta sal hidrosoluble alcanza la mitocondria y, en tejidos sanos, se reduce adquiriendo una coloración roja. En tejidos donde la actividad mitocondrial está comprometida, como el tejido cerebral infartado, el TTC no llega a reducirse, por lo que no se produce coloración alguna. En primer lugar, el animal se anestesia mediante inyección intraperitoneal de una mezcla de

clorhidrato de ketamina (100 mg/Kg) y diazepam (5 mg/Kg) y se sacrifica por inyección intracardíaca de una solución de cloruro potásico (Antibióticos Farma, S.A.) (200 mg/Kg). Rápidamente se extrae el encéfalo, se sumerge en solución salina fisiológica fría (4°C) durante 5 min y se corta en secciones coronales de 2 mm de grosor con un cortador de tejido (Stoelting mod. 51425). Se obtienen 7 secciones que se incuban durante 10 min a 37°C en una solución de TTC al 2% en salino fisiológico y se fijan durante 24 h en una solución de formaldehído al 10% en tampón fosfato sódico (0,1 M, pH 7.4). Posteriormente, con una cámara digital (Olympus C-5050, Olympus Optical Co.LTD) se fotografían ambas caras de cada sección y se cuantifica el área de infarto, diferenciando las regiones corticales de las subcorticales, con la ayuda de un software de análisis de imagen (software desarrollado por el Prof. Mateo Buendía del Departamento de Fisiología de la Universitat de València). Para excluir los efectos del edema, el área de infarto se corrige con el índice de edema que resulta de multiplicar esta área por la relación entre el área total del hemisferio contralateral y el ipsilateral. El volumen de infarto cortical y subcortical (mm^3) se calcula sumando las áreas de infarto corregidas de las dos caras de cada sección y multiplicando esta suma por el grosor de la sección (2 mm). El volumen de infarto total corresponde a la suma de los volúmenes de infarto cortical y subcortical. Por último, se calcula el porcentaje de tejido infartado respecto al tamaño total del hemisferio contralateral (sano).

3. REACTIVIDAD VASCULAR EN ARTERIA BASILAR DE CONEJO AISLADA

3.1. Obtención y montaje de los segmentos arteriales

Los animales se anestesian mediante una inyección de tiopental sódico (24 mg/kg, Tiobarbital Braun) y se sacrifican mediante una inyección de una solución de KCl (250 mg/kg), en la vena marginal de la oreja. Para aislar la arteria basilar, el cráneo se expone mediante una incisión circular a nivel de la base de los conductos auditivos, realizándose a continuación una craneotomía siguiendo esa incisión. Se retira la duramadre y el encéfalo se separa del resto del eje nervioso seccionando las vías aferentes y eferentes, nerviosas y hemáticas, y rápidamente se introduce en solución salina fisiológica fría (4°C). A continuación, con la ayuda de una lupa binocular (Wild M3B Heerbrugg) y una fuente de luz fría (Euromex EK-1) para evitar deteriorar los tejidos, se disecciona la arteria basilar, se eliminan las colaterales y los restos de sangre del interior de la arteria y se corta en segmentos de aproximadamente 3 mm de longitud.

3.2. Registro de la tensión isométrica

Para el registro de la tensión isométrica desarrollada por los segmentos arteriales, se introducen los extremos finos y rígidos de dos alambres de acero inoxidable (89 μm de diámetro) a través de la luz vascular. Uno de los alambres queda unido a un soporte fijo, de tal forma que la arteria queda en posición horizontal. El otro se conecta a un transductor de tensión isométrica (Panlab UF-1 y Letica TRI 201), de forma que puede traccionar verticalmente, en sentido perpendicular al eje mayor

del segmento arterial, en respuesta a los cambios de tensión que se producen en la pared del vaso. Cada segmento vascular, con los alambres en el interior de su luz, se aloja en un baño de órganos que contiene 5 mL de una solución fisiológica (solución nutritiva de Ringer-Locke). Esta solución se encuentra burbujeada continuamente con gas carbógeno (95% de O₂ y 5% de CO₂), lo que le confiere un pH de 7,3-7,4. Un circuito de agua caliente, que rodea las copas de los baños, permite mantener las soluciones con los tejidos vasculares a una temperatura constante de 37 ± 0,5°C. Se dispone de una reserva de la solución, en condiciones idénticas a las descritas, que se utiliza para renovar el medio en que se hallan inmersos los segmentos arteriales.

El sistema de medida y registro consta, para cada uno de los segmentos arteriales, de un transductor de tensión isométrica (Panlab Mod. UF-1/ Letica TRI 201), un tornillo micrométrico adaptado al transductor y capaz de desplazar el conjunto transductor-alambre, un amplificador de tensión (Amplifier Panlab 40154/Letica ISO 506), y un sistema informatizado de digitalización y registro (PowerLab 8sp y software Chart 5, ADInstruments).

Los cambios de tensión isométrica producidos por los diferentes estímulos aplicados sobre los segmentos arteriales se cuantifican midiendo, a partir del trazado basal o del trazado de tono activo, el desplazamiento producido hasta el efecto máximo desarrollado por cada una de las dosis. Las cantidades obtenidas se expresan porcentualmente respecto del tono activo.

Una vez situados los segmentos en el baño de órganos se les aplica, previa calibración del aparato, una tensión basal de 0,5 g mediante la rotación del tornillo micrométrico. Dado que la tendencia inmediata de los segmentos arteriales es relajarse, la tensión se reajusta periódicamente hasta que se estabilizan en la tensión basal. Durante este período el líquido nutritivo se renueva cada 20 minutos. Una vez alcanzada la tensión basal estable, y con el fin de analizar la reactividad de los segmentos arteriales, éstos se someten a un estímulo despolarizante con una solución de KCl 50 mM. Posteriormente, y tras varios lavados con la solución nutritiva de Ringer-Locke, se verifica la funcionalidad del endotelio provocando un tono activo con UTP (10^{-4} M) y comprobando la relajación a acetilcolina (10^{-5} M). Se considera que el endotelio está “intacto” cuando la relajación producida por la acetilcolina es superior al 80% del tono activo.

4. DIABETES EXPERIMENTAL EN CONEJO

Tras un ayuno de 24 horas, el animal se anestesia mediante inyección i.m. de 40 mg de clorhidrato de Ketamina (Ketolar®). A continuación, se induce la diabetes mediante la inyección, en la vena marginal de la oreja, de un tóxico selectivo de las células β -pancreáticas, aloxano (85 mg/kg disueltos en 10 mL de solución salina). Debido a la destrucción de las células β -pancreáticas, en las primeras horas posteriores a la inyección del aloxano se produce una liberación masiva de insulina y un estado de hipoglucemia. Con el fin de evitar los graves problemas que la hipoglucemia puede acarrear para la vida del animal, tras el aloxano se le administran 2 mL de solución glucosada al 5% por vía intravenosa, y luego

8 mL de la misma solución por vía subcutánea. Durante las primeras horas se mantiene al animal con agua de bebida glucosada al 10% hasta que alcanza el estado hiperglucémico (normalmente entre 24 y 48 horas post aloxano). Luego, la solución glucosada se sustituye por agua de bebida normal y los conejos permanecen estabulados durante seis semanas. En el periodo de estabulación a todos los animales se les realizan controles de peso y glucemia semanalmente.

5. TUNEL (“TERMINAL DEOXYNUCLEOTIDYL TRANSFERASE-MEDIATED DUTP NICK END LABELING”)

El método de TUNEL se utilizó para estudiar la fragmentación de ADN apoptótico en tejido cerebral de rata. Consiste en marcar, con nucleótidos modificados, el extremo libre 3'-OH de los fragmentos de ADN de las células apoptóticas, mediante una reacción enzimática catalizada por la enzima “*terminal deoxynucleotidyl transferase*” (TdT). Utilizamos el kit “*In situ cell death detection kit TMR red*” (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Alemania), en el cual se utiliza tetrametil-rodamina-dUTP para marcar directamente los fragmentos de ADN con fluorescencia de color rojo.

El marcaje se realizó en tejido cerebral congelado en fresco. Previa anestesia del animal, se sacrifica por inyección intracardíaca de cloruro potásico (200 mg/kg), se extrae el encéfalo, se sumerge en solución salina fisiológica fría (4°C) y se congela en metilbutano (Sigma Aldrich, Barcelona, España) enfriado a -40°C con nitrógeno líquido. Se cortan secciones coronales de 18 µm de grosor, de la zona ubicada entre 0,2 y -1,8 mm

desde el bregma. Cada sección se fija con paraformaldehído (4%), se permeabiliza con Tritón X-100 (0,1%) y citrato sódico (0,1%) y se incuba con 50 μ L del kit de TUNEL durante 1h a 37°C en ambiente húmedo. Posteriormente, las secciones se incuban con 50 μ L de 4',6-diamino-2-fenilindol (DAPI; 1:1000, Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA) para marcar los núcleos celulares y, finalmente, se montan con ProLong Gold (Molecular Probes) y se dejan secar durante toda la noche en oscuridad.

6. CASPASA-3 ACTIVADA

Los estudios de caspasa-3 activada se realizaron en secciones de tejido cerebral fresco obtenido de la misma manera que para la realización del TUNEL.

En este caso utilizamos el “*APO LOGIX™ carboxyfluorescein (FAM) caspase detection kit*” (Cell Technology, Fremont, CA, USA). El kit contiene FAM-DEVD-FMK, un análogo con carboxifluoresceína (FAM) del péptido modificado zDEVD-fluorometilcetona (zDEVD-FMK), un inhibidor selectivo de la caspasa-3. El reactivo FAM-DEVD-FMK entra a las células y se une irreversiblemente a la caspasa-3 activada, visualizándose de color verde al microscopio de fluorescencia.

Cada sección se incuba con 50 μ L de FAM-DEVD-FMK (1,5X) durante 2 horas a 37°C en ambiente húmedo, se lava 3 veces con el correspondiente tampón (1X), se fija durante 1 hora con 100 μ L de la solución correspondiente, se monta con ProLong Gold (Molecular Probes) y se deja secar durante la noche en oscuridad. Posteriormente las secciones se

visualizan al microscopio de fluorescencia (LEICA DM 4500B) y se adquieren imágenes para su análisis.

7. WESTERN BLOT (WB)

Para estudiar la expresión de proteínas en cerebro de rata mediante WB se utilizó una sección de cerebro, entre 0,2 y -1,8 mm desde el bregma, dividida en hemisferios ipsilateral y contralateral. Cada hemisferio se homogeneiza en tampón de lisis (ProteoJet™ Mammalian Cell Lysis Reagent, Fermentas) con inhibidores de proteasas y fosfatasa (1%, Sigma-Aldrich) mediante un homogeneizador Ultra-Turrax (Modelo T8, IKA-WERKE).

Para el Western blot en arteria se utilizaron 3 arterias basílicas de conejo para cada muestra. Las arterias se homogeneizan en un mortero con N₂ líquido; el polvo resultante se recoge y se suspende en tampón de lisis (ProteoJet™ Mammalian Cell Lysis Reagent, Fermentas) con inhibidores de proteasas y fosfatasa (1%, Sigma-Aldrich).

Posteriormente las muestras se agitan a temperatura ambiente durante 15 minutos a 1500 rpm, seguido de centrifugado a 4°C durante 15 minutos a 5000 rpm. Se extrae el sobrenadante y se determina la concentración de proteínas con un kit de BCA (Pierce, Rockford, IL). Para realizar la electroforesis se preparan alícuotas de cada muestra, de 40 µg de proteína en el caso del tejido cerebral y de 30 µg de proteína en el caso del tejido arterial, a las que se les añade el tampón de carga (NuPAGE LDS, Invitrogen). Las muestras se desnaturalizan calentando a 70°C durante 10 minutos, se cargan en el gel (4-12% Bis-Tris, Invitrogen) y se procede a la

electroforesis para separar las proteínas según peso molecular. Posteriormente las proteínas son electrotransferidas a una membrana de nitrocelulosa de 0,2 μm , que se bloquea durante 1 hora con TBS-Tween más leche desnatada y se marca con los diferentes anticuerpos primarios durante toda la noche, y secundarios durante 1 hora. A continuación, las membranas se incuban durante 5 minutos con reactivos de quimioluminiscencia (ECL, Amersham Life Science, Buckinghamshire, UK) y se revelan usando un sistema de imagen ChemiDoc XRS (Bio-Rad, CA, USA).

La cuantificación se lleva a cabo con el programa Scion Image Beta 4.0.3; se mide la densidad óptica de cada banda y se normaliza respecto a la densidad óptica de la banda de la proteína constitutiva correspondiente utilizada como control de carga.

8. ELISA (ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY)

La liberación de tromboxano A_2 (TXA_2) y prostaciclina (PGI_2) al medio de incubación de arteria basilar de conejo se determinó cuantificando sus respectivos metabolitos estables (TXB_2 y 6-ceto- $\text{PGF}_{1\alpha}$) mediante los correspondientes kits de ELISA competitivo en placa: "*Thromboxane B₂ ELISA kit*" y "*6-keto Prostaglandin F_{1 α} ELISA kit*" (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA). Estos ensayos se basan en la competición del prostanoide y un conjugado prostanoide-acetilcolinesterasa (AChE), denominado prostanoide trazador, por los sitios de unión de un antisuero de conejo específico para el prostanoide. El complejo prostanoide-antisuero (libre o trazador) se une a un anticuerpo monoclonal de ratón anti-IgG de conejo, fijado al pocillo de la placa. La concentración del prostanoide se determina

espectrofotométricamente añadiendo el reactivo de Ellman, que contiene acetiltiocolina, sustrato para la AChE, y ácido 5,5'-ditio-bis-2-nitrobenzoico. La hidrólisis de la acetiltiocolina produce tiocolina. La reacción no enzimática de la tiocolina con el ácido 5,5'-ditio-bis-2-nitrobenzoico produce ácido 5-tio-2-nitrobenzoico, de color amarillo.

Para realizar el ensayo se añaden 50 μL de muestra, 50 μL de trazador y 50 μL de antisuero al pocillo. Además, se preparan los pocillos correspondientes a blanco, actividad total, unión no específica, unión máxima y curva patrón. La placa se cubre con film plástico y se incuba durante 24 h a 4°C. Para revelar la placa, se vacían los pocillos, se lavan 5 veces con tampón, se añaden 200 μL de reactivo de Ellman, se cubre la placa con film plástico y coloca en un agitador orbital en oscuridad durante 120 min. Se retira el film plástico y se lee en el espectrofotómetro a 412 nm. La absorbancia es inversamente proporcional a la concentración del prostanoide.

9. PROTOCOLOS EXPERIMENTALES

9.1. Efectos del ANP en el ictus isquémico

Los efectos del ANP sobre las consecuencias del ictus isquémico se comprobaron transcurridas 24 horas desde la isquemia focal transitoria.

9.1.1. Grupos experimentales y tratamientos

Para el estudio del efecto neuroprotector del ANP se utilizaron 58 ratas Wistar macho que se dividieron aleatoriamente en tres grupos: control, ANP a dosis baja y ANP a dosis alta.

Se excluyeron 24 ratas de acuerdo con los siguientes criterios:

1. La PC no descendió al introducir el filamento de nailon o no se consiguió mantener el descenso estable durante los 60 min de inserción, es decir, no hubo isquemia (n=4)
2. La PC no se recuperó tras retirar el filamento ni durante los 30 min siguientes, es decir, no hubo reperfusión (n=5)
3. Hemorragia subaracnoidea durante la inserción o retirada del filamento (n=4)
4. Ausencia de daño cerebral visible con TTC a pesar de un buen patrón de isquemia-reperfusión (n=1)
5. Muerte del animal antes de las 24h post isquemia (n=10)

Finalmente, los grupos quedaron compuestos de la siguiente manera: control, n=11; ANP a dosis baja, n=10; y ANP a dosis alta, n=13.

Luego de la isquemia focal y los 30 minutos de reperfusión se infundió, vía intracerebroventricular, el tratamiento correspondiente. Las ratas del grupo ANP a dosis baja recibieron 0,5 nmol de ANP en un volumen de 5 μ L, seguidos de 6 μ L de solución salina fisiológica; las ratas del grupo ANP a dosis alta recibieron 2,5 nmol de ANP en un volumen de 8 μ L, seguidos de 6 μ L de solución salina fisiológica; y las ratas pertenecientes al grupo control

recibieron 8 μ L de PBS-SAB + ácido acético (solvente del ANP), seguidos de 6 μ L de solución salina fisiológica.

9.1.2. Efectos sobre el daño cerebral

Se realizó la valoración neurofuncional del animal y posteriormente se sacrificó, obteniéndose las secciones coronales (2 mm) de tejido cerebral fresco para la medición del volumen del infarto mediante la tinción con TTC.

9.1.3. Efectos sobre la apoptosis

Los marcajes de TUNEL (fragmentación de ADN) + DAPI (núcleos celulares) y FAM-DEVD-FMK (actividad caspasa-3) se realizaron en secciones coronales (18 μ m) del cerebro congelado. Una vez aplicado el correspondiente kit, las preparaciones se observaron al microscopio de fluorescencia (LEICA DM 4500B; Leica Microsystems, Barcelona, España) y se obtuvieron las imágenes de diferentes zonas del cerebro.

De las secciones procesadas con TUNEL se capturaron tres imágenes de la región cortical (superior, media e inferior) y una imagen de la región subcortical, tanto en el hemisferio ipsilateral como en el hemisferio contralateral al infarto. Las imágenes se analizaron con el programa ImageJ para cuantificar el número de células TUNEL positivas y el número de células DAPI positivas. El número de células TUNEL positivas se expresa como porcentaje de las células DAPI positivas.

De las secciones procesadas con FAM-DEVD-FMK se obtuvieron 3 imágenes de la región cortical (superior, media e inferior), tanto en el

hemisferio ipsilateral como en el hemisferio contralateral al infarto, de las cuales se cuantificó la intensidad de la fluorescencia respecto al área de la imagen utilizando el programa ImageJ. La intensidad media de las imágenes se promedió para asignar un único valor por hemisferio.

Mediante Western blot se estudió, en tejido cerebral homogeneizado, la expresión de caspasa-3 activada (17 kDa) usando el anticuerpo primario policlonal anti-caspasa-3 activada (1:500, Cell Signaling Technology, Inc., Beverly, MA, USA) producido en conejo, el anticuerpo secundario anti-rabbit IgG (1:2000, Bio-Rad) y el anticuerpo monoclonal anti- β -actina (1:10000; Sigma-Aldrich) producido en ratón, como control de carga.

9.1.4. Efectos sobre la expresión de receptores NPR, canales de K^+ y vías de señalización apoptótica

Se observó, mediante Western blot, la expresión de receptores NPR, canales de K^+ y vías de señalización apoptótica en tejido cerebral homogeneizado.

En el estudio de la expresión de los receptores NPR para el ANP se utilizaron los siguientes anticuerpos primarios policlonales producidos en conejo: anti-NPRA (1:1000, GeneTex, Irvine, CA, USA) y anti-NPRC (1:1000, GeneTex).

Para estudiar la expresión de canales de K^+ se utilizaron los siguientes anticuerpos primarios policlonales producidos en conejo: anti-KCNJ8 (1:1000, Sigma-Aldrich) que reconoce los canales de K^+ sensibles a ATP (K_{ATP}), anti-KCNC1 (1:400, Sigma-Aldrich) que reconoce los canales de K^+

dependientes de voltaje (K_v), y anti-KCNMA1 (1:1000, Alomone Labs, Jerusalén, Israel) que reconoce los canales de K^+ activados por calcio (BK_{Ca}).

Para estudiar las vías de supervivencia/apoptosis se utilizaron los siguientes anticuerpos primarios: anti-p-Akt monoclonal (1:1000, Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA), que reconoce la proteína Akt cuando está fosforilada en el residuo Ser473; anti-Akt monoclonal (1:1000, Millipore, Temecula, CA, USA) que reconoce la totalidad de Akt; anti-p-MAPK monoclonal (pERK1/2) (1:2000, Cell Signaling Technology) que reconoce las proteínas ERK1 y ERK2 cuando están fosforiladas en los residuos Thr202/Thr204 y Thr185/187, respectivamente; y anti-MAPK1/2 policlonal (ERK1/2) (1:5000, Millipore) producido en ratón, que reconoce la totalidad de la proteína ERK1/2.

Los anticuerpos secundarios fueron anti-rabbit IgG (1:2000, Bio-Rad) para los anticuerpos primarios producidos en conejo, y anti-mouse IgG (1:2000, Bio-Rad) para los anticuerpos primarios producidos en ratón.

Las membranas se remarcaron con el anticuerpo monoclonal anti- β -actina (1:10000; Sigma-Aldrich) producido en ratón, como control de carga.

9.2. Efectos del ANP en arteria basilar

9.2.1. Grupos experimentales

Para el estudio de la respuesta de la arteria basilar a ANP se utilizaron 100 conejos macho Nueva Zelanda, que se dividieron aleatoriamente en grupo control ($n=50$) y grupo diabético ($n=50$) y se mantuvieron estabulados durante 6 semanas. Tras este período los conejos del grupo diabético presentaron un aumento significativo en la glucemia ($5,7 \pm 0,02$ y

18,5 ± 1,1 mM grupo control y diabético, respectivamente) y un menor peso final (3,29 ± 0,11 kg) en comparación con los conejos del grupo control (3,70 ± 0,15 kg).

9.2.2. Efectos vasoactivos

Los conejos se sacrificaron y se obtuvieron los segmentos de arteria basilar. Tras provocar un tono activo con UTP (10^{-4} M) se realizaron las curvas concentración-respuesta a ANP (10^{-11} - 10^{-7} M) en las diversas situaciones experimentales. Dichas curvas se obtuvieron mediante la adición, al baño de órganos, de dosis acumulativas del péptido; cada dosis se añadió cuando la dosis inmediatamente anterior desarrolló su efecto máximo. La concentración del péptido en el baño de órganos es la suma de la última dosis administrada y las dosis administradas con anterioridad. En cada segmento arterial se realizó solamente una curva concentración-respuesta a ANP.

Para el estudio del papel del endotelio en la respuesta arterial, se realizaron curvas concentración-respuesta a ANP en arterias previamente sometidas a la eliminación mecánica del endotelio mediante el legrado de la superficie luminal.

Para el estudio del papel del óxido nítrico (NO) se realizaron curvas concentración-respuesta a ANP en arterias previamente incubadas (20 minutos) con el inhibidor de la síntesis de NO, *NG*-nitro-L-arginina (L-NOArg, 10^{-5} M).

Para el estudio del papel de los prostanoideos derivados del ácido araquidónico se realizaron curvas concentración-respuesta a ANP en

arterias previamente incubadas (20 minutos) con el inhibidor de la ciclooxigenasa, indometacina (10^{-5} M).

Para el estudio del papel del flujo saliente de K^+ se realizaron curvas concentración-respuesta a ANP en arterias despolarizadas con KCl (50 mM). Para identificar la participación de los diferentes subtipos de canales de K^+ se realizaron curvas concentración-respuesta a ANP en arterias preincubadas (20 minutos) con iberiotoxina (5×10^{-8} M), inhibidor selectivo de los canales de K^+ activados por calcio (BK_{Ca}); con glibenclamida (10^{-5} M), inhibidor selectivo de los canales de K^+ sensibles a ATP (K_{ATP}); y con 4-AP (10^{-4} M), inhibidor selectivo de los canales de K^+ dependientes de voltaje (K_V).

La respuesta relajante a ANP se expresa como porcentaje respecto del tono activo previamente inducido con UTP (10^{-4} M) o KCl (50 mM).

9.2.3. Efectos sobre la liberación de prostanoideos

Los segmentos de arteria basilar se incubaron en 110 μ l de solución de Ringer-Locke con UTP (10^{-4} M) y ANP (10^{-7} M) durante 3 horas a 37°C. La liberación de tromboxano A_2 (TXA_2) y prostaciclina (PGI_2) al medio de incubación se determinó cuantificando sus respectivos metabolitos estables (TXB_2 y 6-ceto- $PGF_{1\alpha}$) mediante ELISA competitivo. Las muestras se midieron por triplicado, y la concentración de prostanoideos se estandarizó en relación al peso seco de cada segmento arterial.

9.2.4. Efectos sobre la expresión de receptores NPR y canales de K⁺

Para estudiar la expresión de los receptores NPR para el ANP mediante Western blot, en tejido arterial homogeneizado, se utilizaron los siguientes anticuerpos primarios policlonales producidos en conejo: anti-NPRA (1:500, GeneTex) y anti-NPRC (1:500, GeneTex).

Para estudiar la expresión de canales de K⁺ se utilizaron los siguientes anticuerpos primarios policlonales producidos en conejo: anti-KCNJ8 (1:500, Sigma-Aldrich) para los K_{ATP}, anti-KCNC1 (1:200, Sigma-Aldrich) que reconoce los K_V, y anti-KCNMA1 (1:250, Alomone Labs, Jerusalén, Israel) para los BK_{Ca}.

Las membranas se remarcaron con el anticuerpo monoclonal anti-β-actina (1:2000; Sigma-Aldrich) producido en ratón, como control de carga.

Para reconocer los anticuerpos primarios y visualizar las bandas de las proteínas estudiadas, se utilizó proteína-A marcada con peroxidasa (1:2000, Sigma-Aldrich) en vez del anticuerpo secundario anti-conejo, debido a que el tejido arterial sobre el cual se realizaron los estudios proteínicos procede de conejo.

9.2.5. Fármacos y soluciones

Acetilcolina, aloxano, ANP, indometacina, L-NOArg y UTP proceden de Sigma–Aldrich. Todos, excepto el ANP y la indometacina, se disuelven en solución salina fisiológica. El ANP se disuelve en ácido acético acuoso 0,5 % y se diluye en una mezcla de PBS y seroalbúmina bovina 0,05%. La indometacina se disuelve y diluye en etanol; en ensayos previos se

comprobó que las concentraciones más altas de etanol (0,69%) alcanzadas en el baño de órganos no modificaban el tono vascular.

La composición de la solución Ringer-Locke es: NaCl, 120 mM; KCl, 5,4 mM; CaCl₂, 2,2 mM; MgCl₂, 1,0 mM; NaHCO₃, 25 mM; y glucosa, 5,6 mM. En primer lugar, se prepara una solución concentrada (20x) de cloruros (NaCl, KCl, CaCl₂, MgCl₂) que se diluye en el momento de su uso, añadiendo entonces el NaHCO₃ y la glucosa.

La solución despolarizante de KCl 50 mM se prepara del mismo modo que la solución de Ringer-Locke, pero sustituyendo el NaCl por una cantidad equimolar de KCl.

10. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS

Los resultados de parámetros fisiológicos, volumen de infarto, caspasa-3 activada, TUNEL, WB, relajación arterial y ELISA se expresan como media aritmética \pm EEM; y la valoración neurofuncional se expresa como la mediana y el rango intercuartil. Para cada curva concentración-respuesta arterial, el efecto máximo ($E_{m\acute{a}x}$) y la concentración del agonista que produce la mitad del $E_{m\acute{a}x}$ (EC_{50}), se calcularon usando una regresión no lineal. EC_{50} se expresa como media aritmética con sus límites de confianza.

El análisis de los datos se realizó con el programa GraphPad InStat 3.06, excepto para las curvas concentración-respuesta, en que se utilizó el programa GraphPad Prism 4.00; y la regresión ordinal, que se realizó con el programa R 3.3.2. Las comparaciones estadísticas se realizaron mediante el test t de Student para muestras independientes (ELISA, caspasa-3 activada); el análisis de la varianza (ANOVA) seguido del post test Dunnet

(parámetros fisiológicos), del post test de comparaciones múltiples Student-Newman-Keuls (volumen de infarto, TUNEL, WB), del post test de comparaciones múltiples Bonferroni (relajación arterial); o el test no paramétrico Kruskal-Wallis seguido del test de múltiples comparaciones Dunn (valoración neurofuncional).

Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas con un valor $p < 0,05$.

Resultados

1 EFECTOS PROTECTORES DEL ANP EN EL ICTUS ISQUÉMICO

1.1. Hemodinámica, gases arteriales y glucemia durante la isquemia focal transitoria en ratas, previos al tratamiento.

El análisis estadístico no reveló diferencias significativas en el patrón de isquemia-reperfusión previo a la administración del tratamiento entre los tres grupos de estudio (control, ANP 0,5 nmol, ANP 2,5 nmol) (Figura 24). Los valores de perfusión cerebrocortical (PC) durante los 60 minutos de oclusión de la arteria cerebral media fueron significativamente menores que los valores basales, con una reducción del 63%. Durante los primeros 30 minutos de perfusión, la PC aumentó a valores hiperémicos, significativamente mayores que los valores basales (Tabla 1).

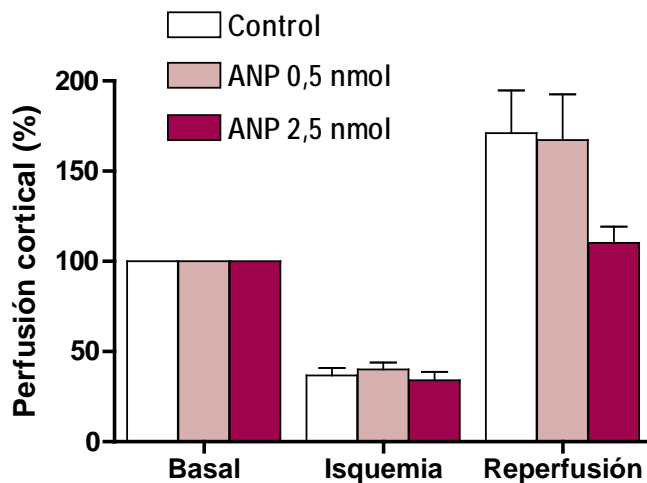


Figura 24. Perfusión cortical durante las tres etapas del episodio de isquemia-reperfusión, previo a la administración del tratamiento, en los tres grupos experimentales: ratas a tratar con el solvente (control, n=11), ANP a dosis baja (0,5 nmol, n=10) y ANP a dosis alta (2,5 nmol, n=13). Los datos se expresan como media \pm EEM.

Resultados

La presión arterial media (PAM) disminuyó de forma significativa durante la isquemia, y volvió al valor basal durante la reperfusión. Durante el periodo de isquemia la PaCO₂ aumentó de forma significativa, indicando hipercapnia, y el pH disminuyó significativamente, indicando acidosis, aunque ambos parámetros se recuperaron parcialmente a niveles basales durante la reperfusión. La PaO₂ y la glucemia no se modificaron significativamente respecto a los valores basales durante el episodio de isquemia-reperfusión (Tabla 1).

Tabla 1. Parámetros fisiológicos durante las tres etapas del episodio de isquemia-reperfusión

	Basal	Isquemia	Reperfusión
Perfusión Cortical (%)	100	36,7 ± 2,48 **	146,7 ± 11,9 **
PAM (mmHg)	130,1 ± 2,5	122.4 ± 1,7 *	132,5 ± 2,4
PaO ₂ (mmHg)	145,3 ± 16,7	118,4 ± 13,9	138,2 ± 14,8
PaCO ₂ (mmHg)	38,9 ± 1,5	59,8 ± 2,9 **	51 ± 2,5 **
pH	7,43 ± 0,01	7,28 ± 0,02 **	7,33 ± 0,02 **
Glucemia (mg/dL)	114,6 ± 7,4	112,6 ± 7,2	119 ± 8,6

Los datos se expresan como media ± EEM de 29-34 valores. Significativamente diferente del valor basal * p < 0,05, ** p < 0,01.

1.2. El tratamiento agudo con ANP intracerebroventricular tras la isquemia focal transitoria redujo el daño cerebral isquémico

El tratamiento con ANP intracerebroventricular de forma aguda, 30 minutos tras la isquemia focal transitoria, produjo una disminución del volumen de infarto medido a las 24 horas del episodio isquémico. Como se muestra en la Figura 25A, en el grupo de ratas tratadas con ANP a dosis baja (0,5 nmol) se observó una tendencia a la disminución del volumen total de infarto, que fue estadísticamente significativa en el grupo de ratas tratadas con ANP a dosis alta (2,5 nmol). La disminución del volumen total de infarto fue la consecuencia de una disminución significativa del volumen de infarto en la región cortical, no así en la región subcortical (Figura 25B y C). En línea con la disminución del volumen de infarto, la valoración del deterioro neurofuncional de las ratas tratadas con ANP a dosis baja (0,5 nmol) tendió a disminuir, observándose significación estadística en las ratas tratadas con ANP a dosis alta (2,5 nmol) (Figura 26). Independientemente del grupo de estudio, hubo una significativa correlación positiva entre el volumen total de infarto y la puntuación neurofuncional (Figura 27).

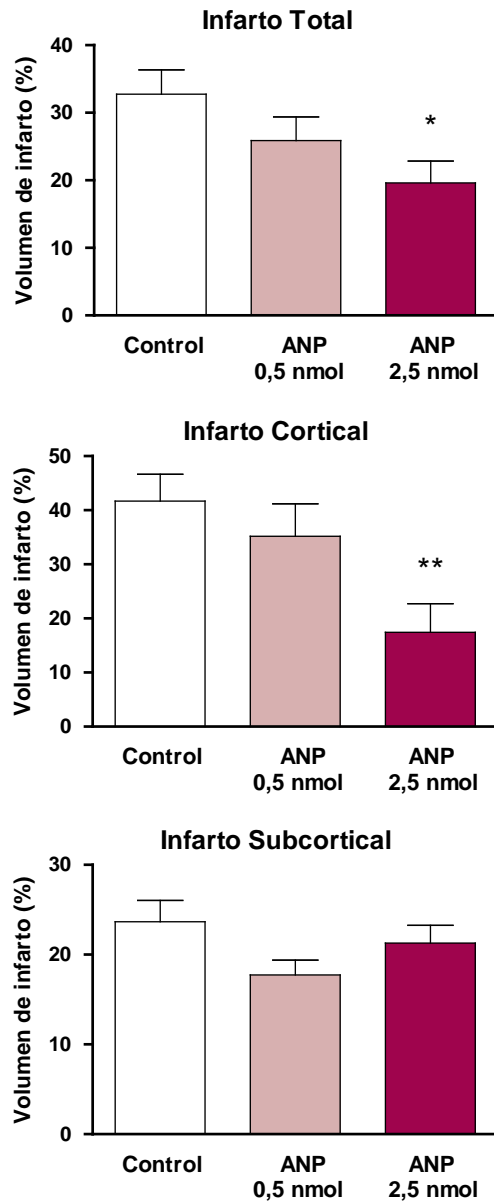


Figura 25. Volumen de infarto (A) total, (B) cortical y (C) subcortical, tras 24 horas del insulto isquémico, en ratas tratadas con el solvente (control, n=7), ANP a dosis baja (0,5 nmol, n=7) y ANP a dosis alta (2,5 nmol, n=9). Los datos se expresan como media \pm EEM. Significativamente diferente del control * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

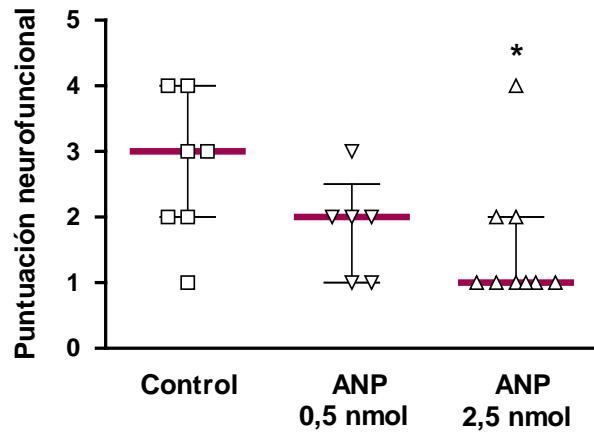


Figura 26. Puntuación neurofuncional de ratas tratadas con el solvente (control, n=7), ANP a dosis baja (0,5 nmol, n=6) y ANP a dosis alta (2,5 nmol; n=9). Los datos se expresan como la mediana con su rango intercuartil. Significativamente diferente del control * $p < 0,05$.

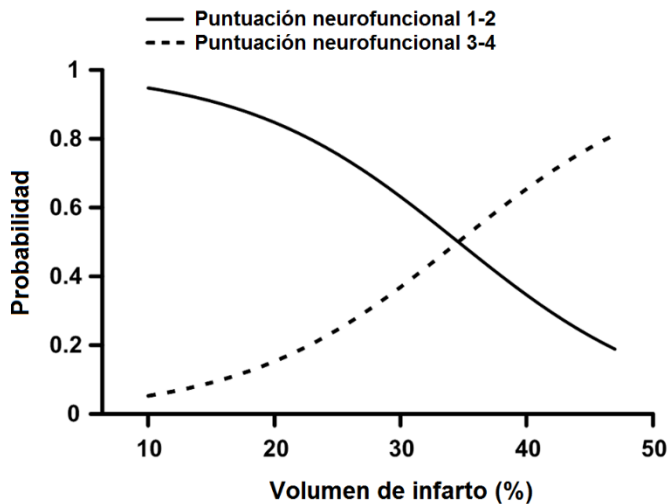


Figura 27. Asociación entre el volumen de infarto y la posibilidad de presentar peor estado funcional (alta puntuación), con una razón de probabilidad de 1,124 (95% CI, 1,036 - 1,233).

1.3. El ANP disminuyó la apoptosis mediada por caspasa-3 en el cerebro isquémico

En el hemisferio contralateral a la isquemia de las ratas sometidas a oclusión de la arteria cerebral media no se detectaron células TUNEL-positivas. Por el contrario, la isquemia-reperfusión indujo la presencia de células TUNEL-positivas en el hemisferio ipsilateral de las ratas del grupo control y, en menor medida, de las tratadas con ANP (Figura 28). El número de células TUNEL-positivas medido en la región cortical del hemisferio ipsilateral de las ratas tratadas con ANP (0,5 y 2,5 nmol) fue significativamente menor que el número de células TUNEL-positivas medido en la correspondiente región de las ratas del grupo control, mientras que no se observaron diferencias significativas en la región subcortical entre los tres grupos (Figura 29AyB). En concordancia con este último resultado, el número de células TUNEL-positivas de la totalidad del hemisferio ipsilateral mostró una tendencia a reducirse en las ratas tratadas con ANP a dosis baja (0,5 nmol), que alcanzó significación estadística en las ratas tratadas con ANP a dosis alta (2,5 nmol) (Figura 29C).

En relación al ejecutor de la apoptosis, caspasa-3 activada, ésta no se detectó en el hemisferio contralateral a la isquemia. En contraste, la isquemia-reperfusión provocó la aparición de caspasa-3 activada en el hemisferio ipsilateral de las secciones cerebrales de ratas control y tratadas con ANP (2,5 nmol) (Figura 30A). Sin embargo, la cantidad de caspasa-3 activada que se observó en el hemisferio ipsilateral de las ratas tratadas con ANP (2,5 nmol) fue significativamente menor que en el hemisferio

correspondiente de las ratas control (Figura 30B). En concordancia, los estudios de WB revelaron que la isquemia provocó una elevación significativa de la expresión de caspasa-3 (fragmento de 17kDa) en el hemisferio ipsilateral de las ratas sometidas a isquemia focal transitoria. Sin embargo, el tratamiento con ANP (2,5 nmol) disminuyó significativamente este aumento en la expresión, causada por la isquemia (Figura 31).

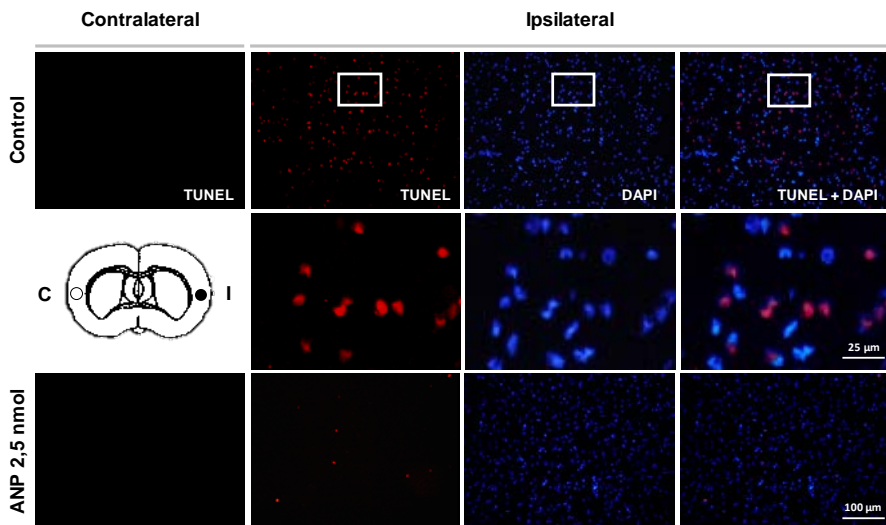


Figura 28. Detección de la fragmentación del ADN mediante la técnica de TUNEL en cerebros de ratas controles y tratadas con ANP, sometidas a isquemia-reperfusión. Ausencia de marcaje TUNEL en la región cortical del hemisferio contralateral a la isquemia (o) y doble marcaje (TUNEL, DAPI y co-localización) en la región cortical del hemisferio ipsilateral a la isquemia (●) de secciones de cerebro representativas. Las zonas enmarcadas se muestran ampliadas.

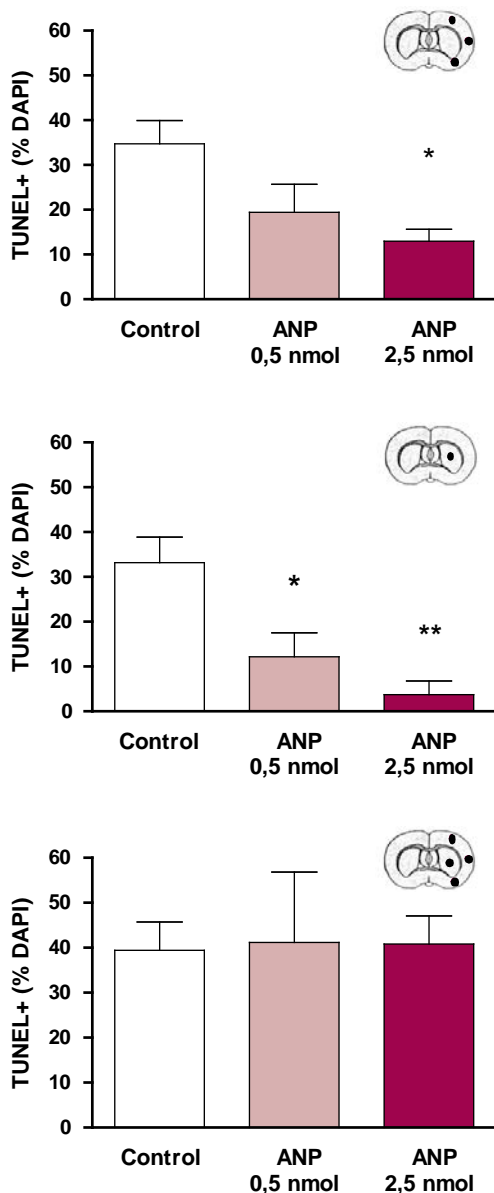


Figura 29. Recuento de células TUNEL-positivas expresadas como porcentaje de los correspondientes núcleos celulares teñidos con DAPI en (A) tres zonas de la región cortical del hemisferio ipsilateral a la isquemia (●), (B) una zona en la región subcortical (●), y (C) las cuatro zonas, es decir, en la totalidad del hemisferio (●). Los datos se expresan como media \pm EEM de n=3-4. Significativamente diferente del control * p < 0,05; ** p < 0,01.

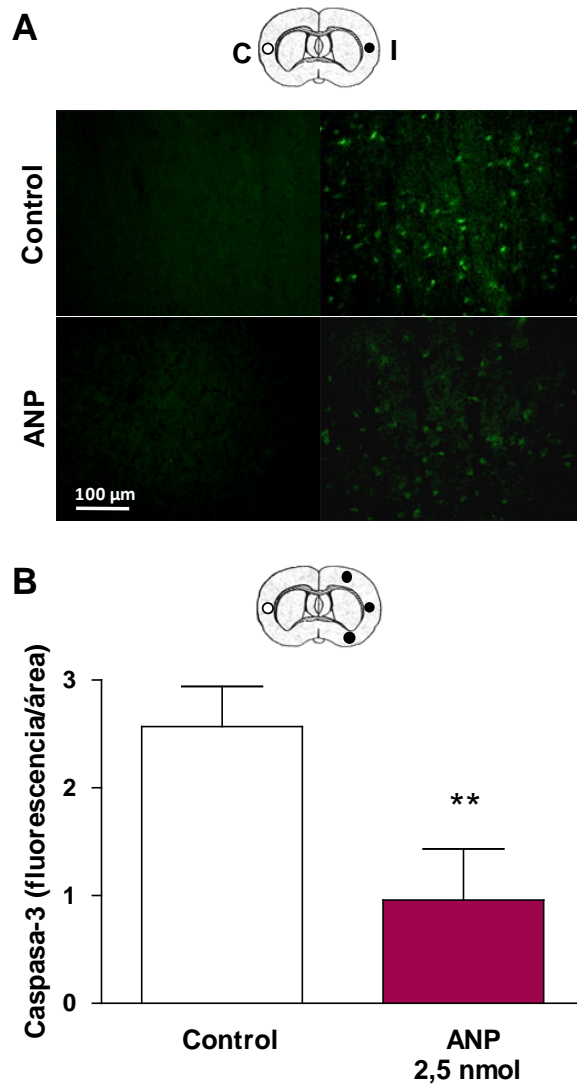


Figura 30. Caspasa-3 activada en secciones cerebrales de ratas control y tratadas con ANP, sometidas a un ictus isquémico agudo. (A) Marcaje con FAM-DEVD-FMK en la zona cortical del hemisferio contralateral (o) e ipsilateral (●) de secciones de cerebro representativas. (B) Cuantificación de la fluorescencia en tres zonas de la región cortical ipsilateral a la isquemia (●), expresado como porcentaje respecto al área total. Los datos se expresan como media \pm EEM de $n=4$. Significativamente diferente del control ** $p < 0,01$.

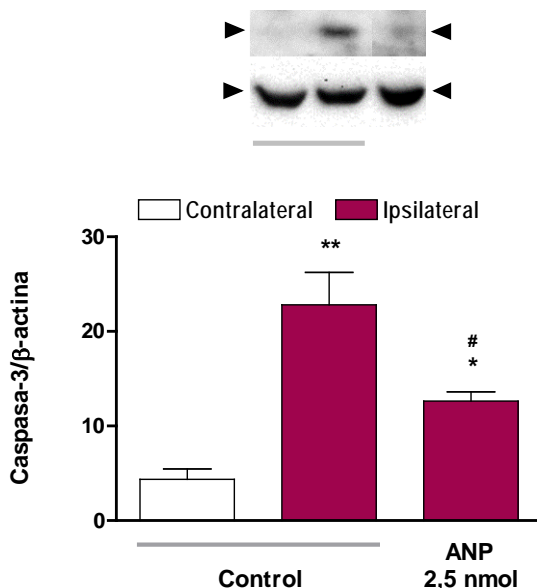


Figura 31. Western blot representativo y abundancia relativa de caspasa-3, fragmento de 17 kDa, en cerebros de ratas control y tratadas con ANP, sometidas a un ictus isquémico agudo. La densidad relativa de las bandas inmunorreactivas fueron normalizadas respecto a las bandas de β -actina correspondientes (control de carga). Los datos se expresan como media \pm EEM de $n=7-8$. Significativamente diferente del control contralateral * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$. Significativamente diferente del control ipsilateral # $p < 0,05$.

1.4. El ANP no modificó la expresión de los receptores NPR-A y NPR-C reducida por la isquemia

El análisis de Western blot reveló la expresión de los dos receptores para ANP, NPR-A (130 kDa) y NPR-C (60 kDa), tanto en el hemisferio contralateral como en el hemisferio ipsilateral de las ratas sometidas a isquemia focal transitoria (Figura 32). Sin embargo, la isquemia-reperfusión provocó una significativa disminución de la expresión de estos receptores en el hemisferio ipsilateral de las ratas de los grupos control y ANP (2,5

nmol). El tratamiento con ANP no modificó la expresión de ninguno de los dos tipos de receptores en el hemisferio ipsilateral a la isquemia.

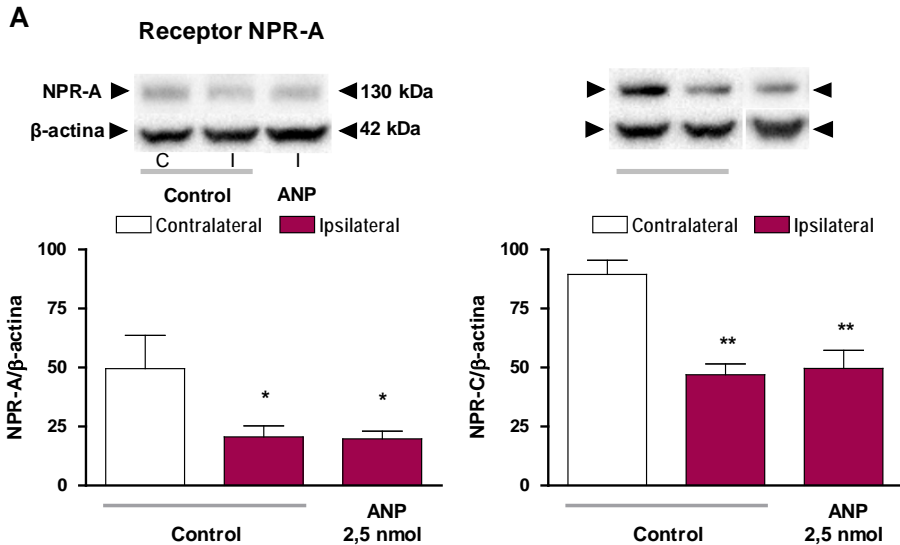


Figura 32. Expresión de los subtipos de receptores para los péptidos natriuréticos en cerebros de ratas control y tratadas con ANP, sometidas a un ictus isquémico agudo. Western blot representativo y abundancia relativa de (A) NPR-A, y (B) NPR-C. La densidad relativa de las bandas inmunorreactivas de receptores fueron normalizadas respecto a las bandas de β -actina correspondientes (control de carga). Los datos se expresan como media \pm EEM de $n=4-9$. Significativamente diferente del control contralateral * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

1.5. La isquemia y el ANP modificaron la expresión de los subtipos de canales de K^+

El análisis de Western blot reveló la expresión de los tres subtipos de canales de K^+ estudiados, K_{ATP} (KCNJ8, 112 kDa), K_v (KCNC1, 58 kDa) y BK_{Ca} (KCNMA1, 100 kDa), tanto en el hemisferio ipsilateral como en el hemisferio contralateral de las ratas sometidas a isquemia focal transitoria (Figura 33, 34 y 35, respectivamente). La isquemia-reperfusión produjo una

reducción significativa de la expresión de los K_{ATP} (Figura 33), pero no de los K_V ni de los BK_{Ca} (Figura 34 y 35, respectivamente) en el hemisferio ipsilateral de ratas control. El tratamiento con ANP (2,5 nmol) provocó una reversión parcial y significativa de la disminución de la expresión de los K_{ATP} (Figura 33), y no cambió la expresión de los K_V ni de los BK_{Ca} en el hemisferio ipsilateral a la isquemia.

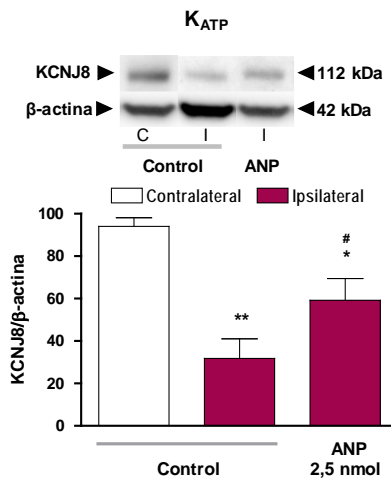


Figura 33. Western blot y abundancia relativa del K_{ATP} (KCNJ8) en ratas control y tratadas con ANP, sometidas a isquemia focal transitoria. La densidad relativa de las bandas inmunorreactivas de canales se ha normalizado con las bandas de β -actina correspondientes. Los datos se expresan como media \pm EEM de $n=7-9$. Significativamente diferente del control contralateral * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$. Significativamente diferente del control ipsilateral # $p < 0,05$.

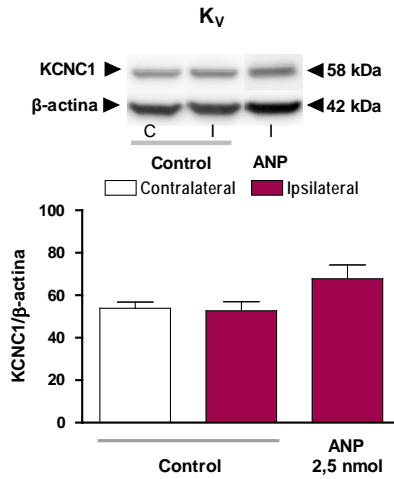


Figura 34. Western blot y abundancia relativa del K_V (KCN1) en ratas control y tratadas con ANP, sometidas a isquemia focal transitoria. La densidad relativa de las bandas inmunorreactivas de canales se ha normalizado con las bandas de β -actina correspondientes (control de carga). Los datos se expresan como media \pm EEM de n=7-8.

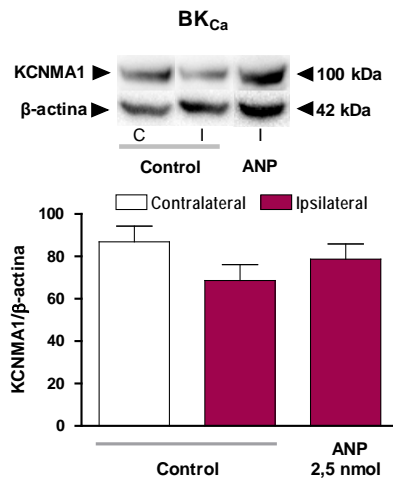


Figura 35. Western blot y abundancia relativa del BK_{Ca} (KCNMA1) en cerebros de ratas control y tratadas con ANP, sometidas a isquemia focal transitoria. La densidad relativa de las bandas inmunorreactivas de canales se han normalizado con las bandas de β -actina correspondientes (control de carga). Los datos se expresan como media \pm EEM de n=5-8.

1.6. El ANP moduló la vía de señalización MAPK/ERK, pero no la vía PI3K/Akt, ambas sobreexpresadas por la isquemia

Los estudios de Western blot detectaron la expresión de las proteínas quinasas Akt (60 kDa), ERK1 (44 kDa) y ERK2 (42 kDa) fosforiladas y no fosforiladas, tanto en el hemisferio contralateral como en el ipsilateral a la isquemia (Figura 36 y 37). La isquemia-reperfusión elevó los ratios de expresión p-Akt/Akt, p-ERK1/ERK1 y p-ERK2/ERK2 en el hemisferio ipsilateral de ratas control. El tratamiento con ANP (2,5 nmol) no modificó los ratios de expresión p-Akt/Akt ni p-ERK1/ERK1 en el hemisferio ipsilateral a la isquemia (Figura 36 y 37, respectivamente). En contraposición, el ANP indujo una reversión parcial significativa del ratio de expresión de p-ERK2/ERK2 incrementado por la isquemia (Figura 37B).

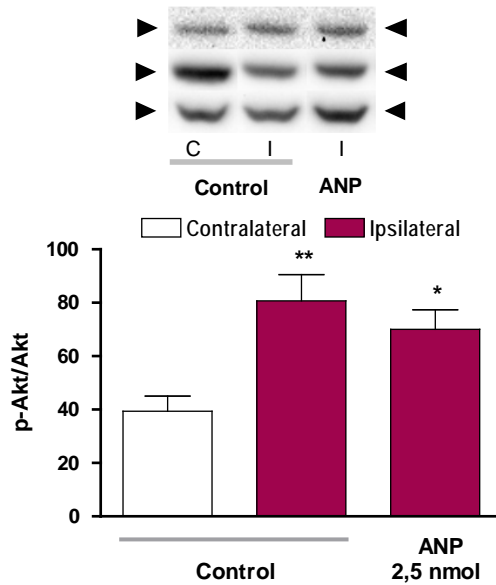


Figura 36. Expresión de Akt en cerebros de ratas control y tratadas con ANP, sometidas a isquemia focal transitoria. Western blot y abundancia relativa de pAkt. La densidad relativa de las bandas inmunorreactivas de la proteína fosforilada se ha normalizado con las bandas correspondientes de proteína total. Los datos se expresan como media \pm EEM de $n=7-9$. Significativamente diferente del control contralateral * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

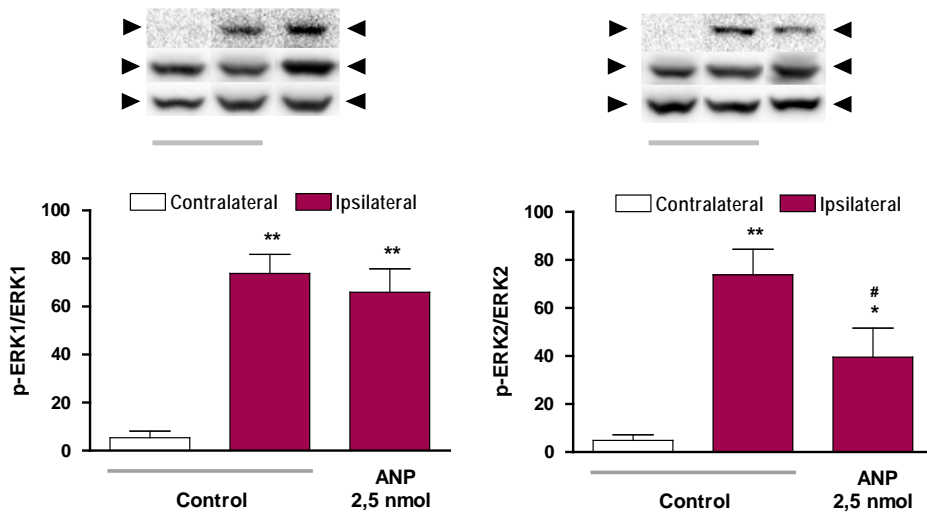


Figura 37. Expresión de ERK1/2 en cerebros de ratas control y tratadas con ANP, sometidas a isquemia focal transitoria. Western blot y abundancia relativa de (A) pERK1 y (B) pERK2. La densidad relativa de las bandas inmunorreactivas de las proteínas fosforiladas se ha normalizado con las bandas correspondientes de proteína total. Los datos se expresan como media \pm EEM de $n=7-9$. Significativamente diferente del control contralateral * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$. Significativamente diferente del control ipsilateral # $p < 0,05$.

2. EFECTOS RELAJANTES DEL ANP EN ARTERIA BASILAR

2.1. El ANP produce relajación dependiente de endotelio de la arteria basilar de conejo

Los experimentos en los que se midió la tensión isométrica de arteria basilar de conejo precontraída con UTP (10^{-4} M) mostraron que concentraciones acumulativas de ANP (10^{-11} – 10^{-7} M) provocaron relajación arterial dependiente de concentración con una potencia para el

ANP en el rango nanomolar alto ($EC_{50} = 2,51 [2,32 - 2,71] \times 10^{-8} \text{ M}$) (Figura 38).

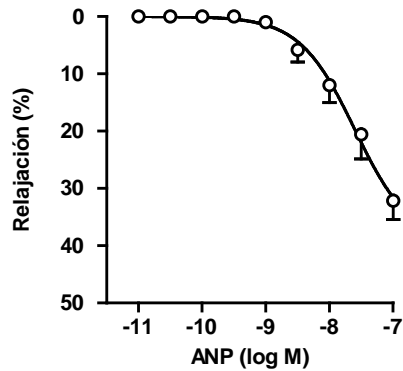


Figura 38. Curva concentración-respuesta de ANP en segmentos de arteria basilar de conejo precontraídos con UTP (n=10). Los valores se expresan como porcentaje del tono activo y representan la media \pm EEM de "n" segmentos arteriales de al menos 4 animales.

Los experimentos de Western blot mostraron expresión de los dos receptores NPR para ANP en la arteria basilar de conejo (Figura 39). Las bandas obtenidas corresponden a proteínas de 130 kDa para el receptor NPR-A y de 60 kDa para el receptor NPR-C.

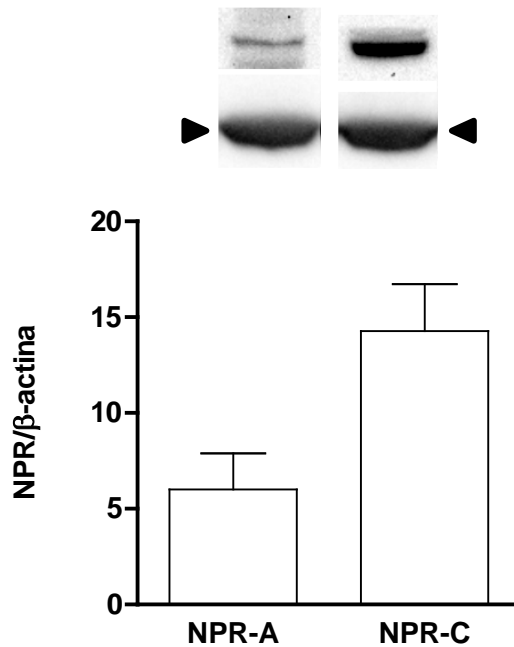


Figura 39. Expresión de los subtipos de receptores para los péptidos natriuréticos en arteria basilar de conejo. Western blot representativo y abundancia relativa de NPR-A y NPR-C. La densidad relativa de las bandas inmunorreactivas de receptores fueron normalizadas respecto a las bandas de β -actina correspondientes (control de carga). Los datos se expresan como media \pm EEM de n=3-4.

Al eliminar mecánicamente el endotelio, la respuesta relajante de la arteria basilar de conejo a ANP fue significativamente menor a la obtenida en arterias con endotelio (Figura 40).

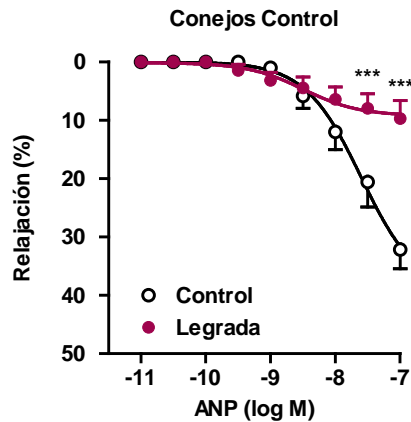


Figura 40. Curvas concentración-respuesta a ANP en arteria basilar de conejo, con endotelio (control, n=9) y sin endotelio (legrada, n=9). Los valores se expresan como porcentaje del tono activo y representan la media \pm EEM de "n" segmentos arteriales de al menos 4 animales. Significativamente diferente del control, ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

2.2. El NO y los prostanooides están implicados en la relajación inducida por ANP

La incubación con el inhibidor de la NO sintasa, L-NOArg (10^{-5} M), inhibió de forma significativa el efecto relajante del ANP en arteria basilar de conejo precontraída con UTP (10^{-4} M), como se muestra en la Figura 41. Por el contrario, el inhibidor de la COX, indometacina (10^{-5} M), desplazó significativamente la curva concentración-respuesta a ANP a la izquierda (EC_{50} 5,03 [4,57-5,53] $\times 10^{-9}$), sin modificar de forma significativa el valor de $E_{m\acute{a}x}$ (Figura 42). El papel de los prostanooides en respuesta a ANP se investigó, además, mediante ELISA (Figura 43). La arteria basilar incubada con ANP (10^{-7} M) liberó tanto el vasoconstrictor tromboxano A_2 (TXA₂) como el vasodilatador prostaciclina (PGI₂). La eliminación del endotelio no

modificó la liberación de TXA₂ de forma significativa, mientras que la liberación de PGI₂ se vio significativamente reducida.

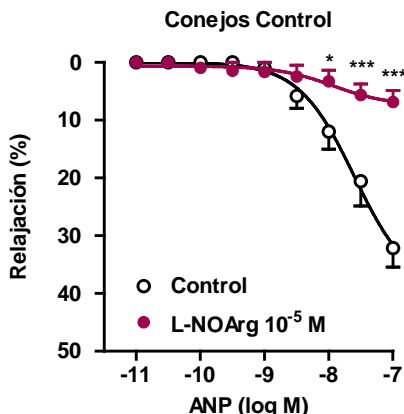


Figura 41. Curvas concentración-respuesta a ANP en arteria basilar de conejo, en situación control (n=10) y tras la incubación con el inhibidor de la NO sintasa, L-NOArg 10⁻⁵ M (n=10). Los valores se expresan como porcentaje del tono activo y representan la media ± EEM de "n" segmentos arteriales de al menos 4 animales. Significativamente diferente del control, * p < 0,05; *** p < 0,001.

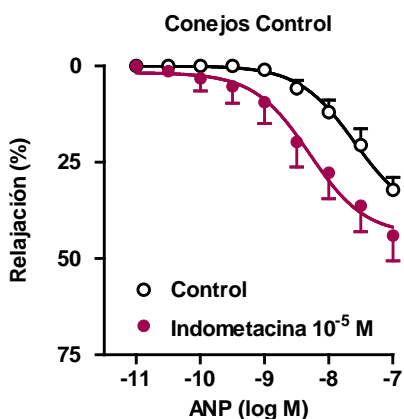


Figura 42. Curvas concentración-respuesta a ANP en arteria basilar de conejo, en situación control (n=10) y tras la incubación con el inhibidor de la COX, indometacina 10⁻⁵ M (n=11). Los valores se expresan como porcentaje del tono activo y representan la media ± EEM de "n" segmentos arteriales de al menos 4 animales.

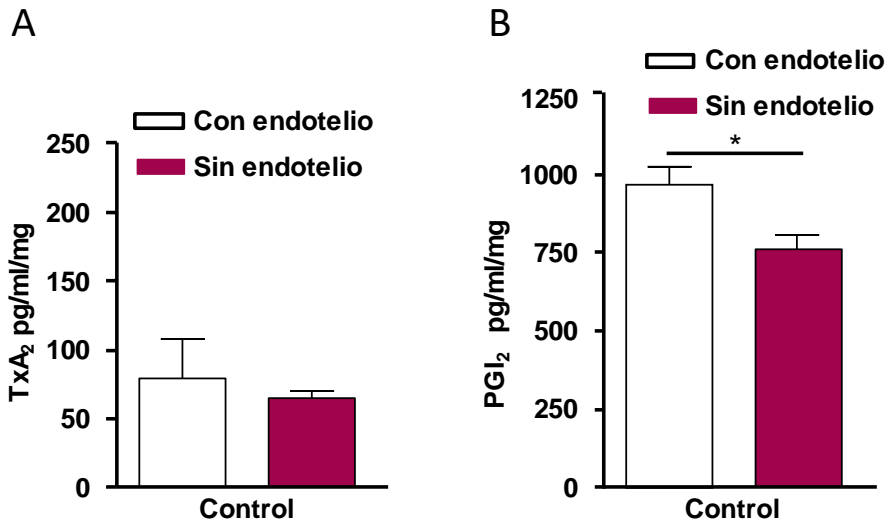


Figura 43. Liberación de tromboxano (TXA₂) y de prostaciclina (PGI₂) en arteria basilar de conejo, con (n=4) y sin endotelio (n=4), incubadas con ANP 10⁻⁷ M. Los valores representan la media ± EEM. Significativamente diferente del control, * p < 0,05.

2.3. El flujo de K⁺ a través de diferentes subtipos de canales de K⁺ media la relajación de la arteria basilar de conejo inducida por ANP

En arteria basilar precontraída por despolarización con una solución con alta concentración de K⁺ (KCl 50 mM), la relajación a ANP se vio fuertemente inhibida en comparación con la relajación observada en arterias precontraídas con UTP (10⁻⁴ M) (Figura 44), indicando la participación del flujo saliente de K⁺ en la relajación inducida por ANP.

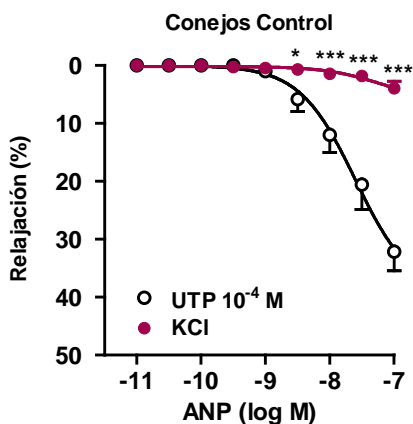


Figura 44. Curvas concentración-respuesta a ANP en arteria basilar de conejo, precontraídas con UTP 10⁻⁴ M (n=10) y despolarizadas con KCl 50 mM (n=21). Los valores se expresan como porcentaje del tono activo y representan la media ± EEM de "n" segmentos arteriales de al menos 4 animales. Significativamente diferente del control (UTP), * p < 0,05; *** p < 0,001.

Los experimentos de Western blot mostraron que en la arteria basilar de conejo se expresan los tres subtipos de canales de K⁺ estudiados (Figura 45). Las bandas de proteínas observadas a 58 kDa corresponden a los K_v, las de 100 kDa a los BK_{Ca} y las de 112 kDa a los K_{ATP}.

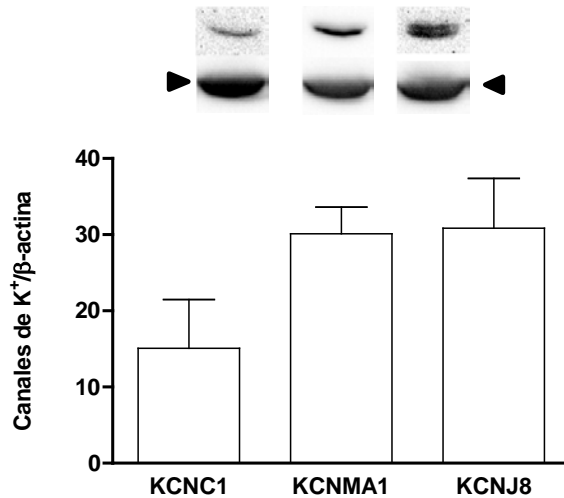


Figura 45. Expresión de los subtipos de canales de K⁺ en arteria basilar de conejo. Western blot representativo y abundancia relativa de K_V (KCNC1), BK_{Ca} (KCNMA1), y K_{ATP} (KCNJ8). La densidad relativa de las bandas inmunorreactivas de los canales fueron normalizadas respecto a las bandas de β-actina correspondientes. Los datos se expresan como media ± EEM de n=3.

La contribución de los tres subtipos de canales en la relajación de la arteria basilar inducida por ANP se investigó mediante el uso de inhibidores selectivos de cada subtipo de canal. Como se muestra en las Figuras 46 a 48, cada uno de los inhibidores, tanto de los K_V (4-aminopiridina, 10⁻⁴ M), de los BK_{Ca} (iberiotoxina, 5x10⁻⁸ M), como de los K_{ATP} (glibenclamida, 10⁻⁵ M) provocó una inhibición significativa del efecto relajante de la arteria basilar de conejo producido por el ANP.

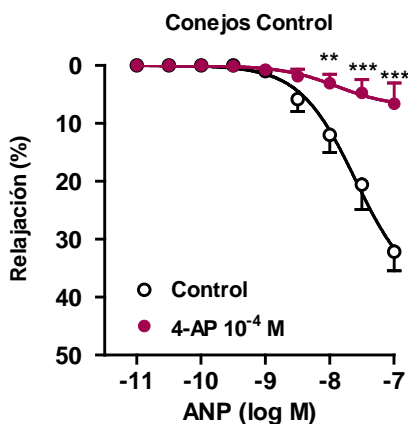


Figura 46. Curvas concentración-respuesta a ANP en arteria basilar de conejo, en situación control (n=10) y tras la incubación con 4-aminopiridina (4-AP, 10^{-4} M, n=12). Los valores se expresan como porcentaje del tono activo y representan la media \pm EEM de segmentos arteriales de al menos 4 animales. Significativamente diferente del control, ** p < 0,01; *** p < 0,001.

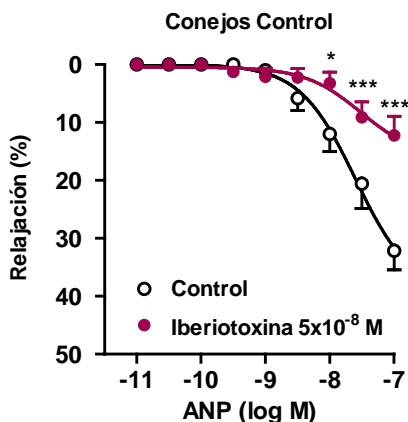


Figura 47. Curvas concentración-respuesta a ANP en arteria basilar de conejo, en situación control (n=10) y tras la incubación con iberiotoxina (5×10^{-8} M, n=11). Los valores se expresan como porcentaje del tono activo y representan la media \pm EEM de segmentos arteriales de al menos 4 animales. Significativamente diferente del control, * p < 0,05; *** p < 0,001.

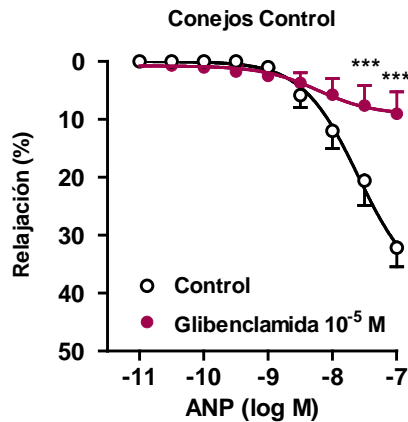


Figura 48. Curvas concentración-respuesta a ANP en arteria basilar de conejo, en situación control (n=10) y tras la incubación con glibenclamida (10^{-5} M; n=11). Los valores se expresan como porcentaje del tono activo y representan la media \pm EEM de segmentos arteriales de al menos 4 animales. Significativamente diferente del control, *** $p < 0,001$.

2.4. La diabetes incrementa la sensibilidad de la arteria basilar de conejo a ANP mediante la modificación de los mecanismos de relajación

Los experimentos de registro de tensión isométrica en arteria basilar de conejos diabéticos mostraron que el ANP (10^{-11} – 10^{-7} M) produce, al igual que en arterias de conejos control, relajación dependiente de la concentración. Sin embargo, el valor de EC_{50} ($3,71 [3,45 - 3,89] \times 10^{-9}$ M) fue significativamente menor que en arterias de conejos control ($2,51 [2,32 - 2,71] \times 10^{-8}$ M), observándose por lo tanto un desplazamiento significativo de la curva concentración-respuesta hacia la izquierda, sin cambios significativos en el $E_{m\acute{a}x}$ (Figura 49).

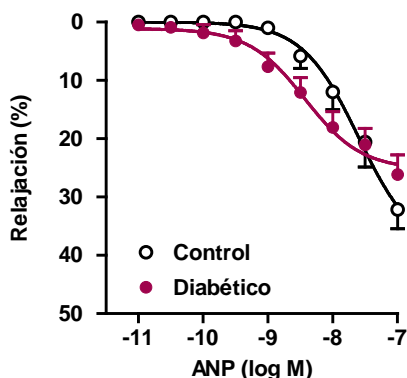


Figura 49. Curvas concentración-respuesta a ANP en segmentos de arteria basilar de conejo control (n=10) y conejo diabético (n=15), precontraídos con UTP. Los valores se expresan como porcentaje del tono activo y representan la media \pm EEM de segmentos arteriales de al menos 4 animales.

La arteria basilar procedente de conejos diabéticos exhibió diferencias en relación a la expresión de los receptores para ANP, así como a la participación tanto del endotelio como del NO, de los prostanoides y de los canales de K^+ , en la relajación inducida por ANP, que serían la razón del incremento de la reactividad vascular a ANP en diabetes. Los experimentos de Western blot mostraron que en la arteria basilar de conejos diabéticos también se expresan los receptores NPR-A y NPR-C. En comparación a la arteria de conejo control, en la arteria de conejo diabético disminuye de forma significativa la expresión del receptor NPR-C y no se modifica la expresión del receptor NPR-A (Figura 50).

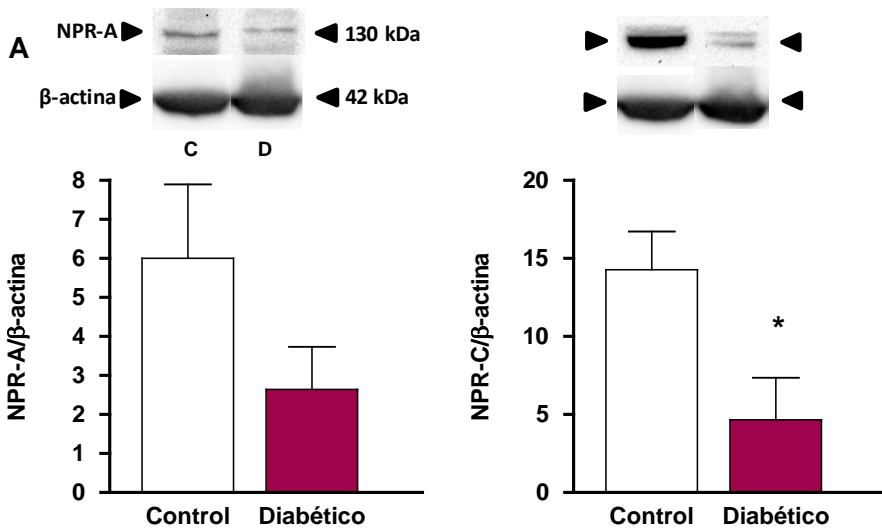


Figura 50. Expresión de los subtipos de receptores de los péptidos natriuréticos en arteria basilar de conejos controles y diabéticos. Western blot representativo y abundancia relativa de (A) NPR-A, y (B) NPR-C. La densidad relativa de las bandas inmunorreactivas de los receptores fueron normalizadas respecto a las bandas de β-actina correspondientes (control de carga). Los datos se expresan como media ± EEM de n=3-5. Significativamente diferente del control, * $p < 0,05$.

En cuanto a la participación del endotelio, su eliminación inhibió significativamente la relajación de la arteria basilar de conejos diabéticos a ANP (Figura 51). El valor de EC_{50} de la curva concentración-respuesta a ANP en arteria basilar legrada procedente de conejos diabéticos ($5,55 [5,29 - 5,82] \times 10^{-9}$ M) fue significativamente mayor que en conejos controles ($3,20 [2,73 - 3,76] \times 10^{-9}$ M), sin haber diferencias significativas entre los valores de $E_{máx}$, indicando un desplazamiento hacia la derecha de la curva concentración-respuesta a ANP.

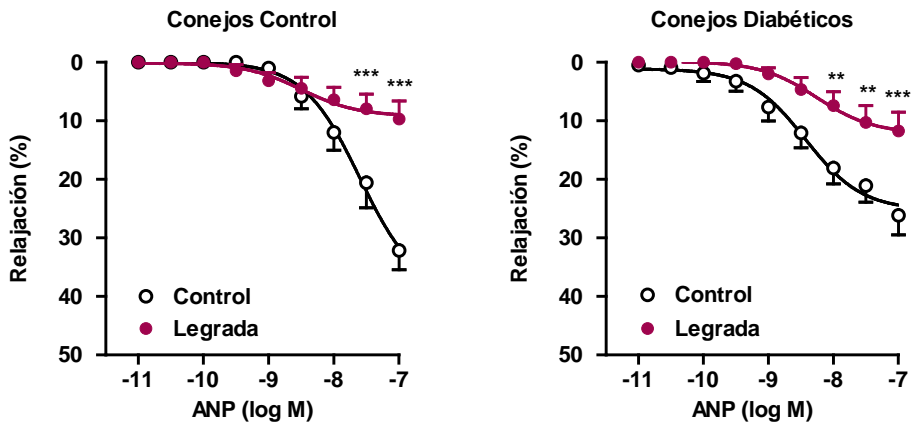


Figura 51. Curvas concentración-respuesta a ANP en arteria basilar de conejo control (n=11) y de conejo diabético (n=10), desprovistas de endotelio. Los valores se expresan como porcentaje del tono activo y representan la media \pm EEM de segmentos arteriales de al menos 4 animales.

En arteria de conejo diabético, la incubación con el inhibidor de la NO sintasa, L-NOArg, disminuyó de forma significativa la respuesta arterial a ANP (Figura 52), aunque esta respuesta relajante fue significativamente mayor que la de arterias procedentes de conejos controles (Figura 52).

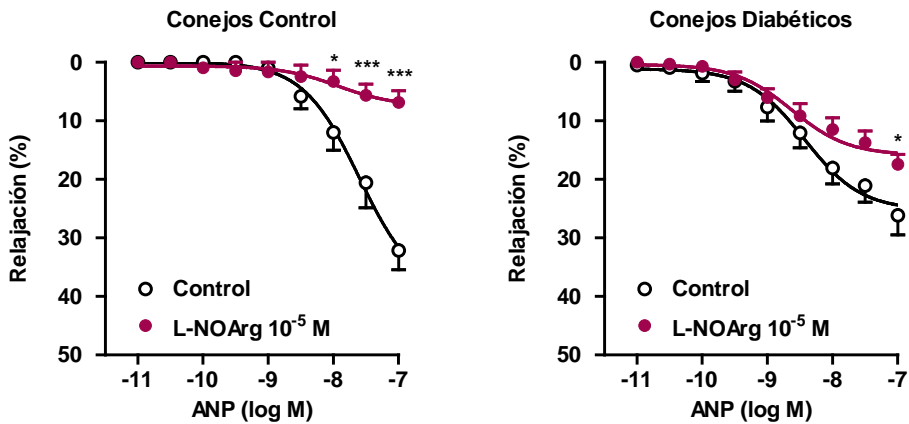


Figura 52. Curvas concentración-respuesta a ANP en arteria basilar de conejo control (n=11) y de conejo diabético (n=10), incubadas con el inhibidor de la NO sintasa, L-NOArg (10^{-5} M). Los valores se expresan como porcentaje del tono activo y representan la media \pm EEM de segmentos arteriales de al menos 4 animales. Significativamente diferente del control, * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001.

Por contra, la incubación con el inhibidor de la COX, indometacina (10^{-5} M), incrementó de forma significativa la relajación inducida por ANP en arterias de conejos diabéticos, a diferencia de lo ocurrido en las arterias de conejos controles (Figura 53). El valor de EC_{50} de las curvas concentración-respuesta a ANP en las arterias de conejo diabético tratadas con indometacina ($1,88 [1,71 - 2,04] \times 10^{-9}$ M), fue significativamente menor que en arterias de conejos controles ($5,03 [4,57 - 5,53] \times 10^{-9}$ M), sin diferencias significativas entre los valores de $E_{m\acute{a}x}$. Por otra parte, los ensayos ELISA mostraron que la arteria basilar de conejo diabético incubada con ANP (10^{-7} M) liberó tanto TXA_2 (Figura 54) como PGI_2 (Figura 55) y que la eliminación del endotelio no modificó la liberación de TXA_2 ni de PGI_2 en dichas arterias. La diabetes no modificó la liberación de TXA_2

inducida por ANP en arteria basilar con endotelio ni en arteria basilar legrada (Figura 54). En contraste, la liberación de PGI₂ en arterias con endotelio intacto fue significativamente menor que en arterias de conejo control, sin presentar diferencias significativas en arterias sin endotelio (Figura 55).

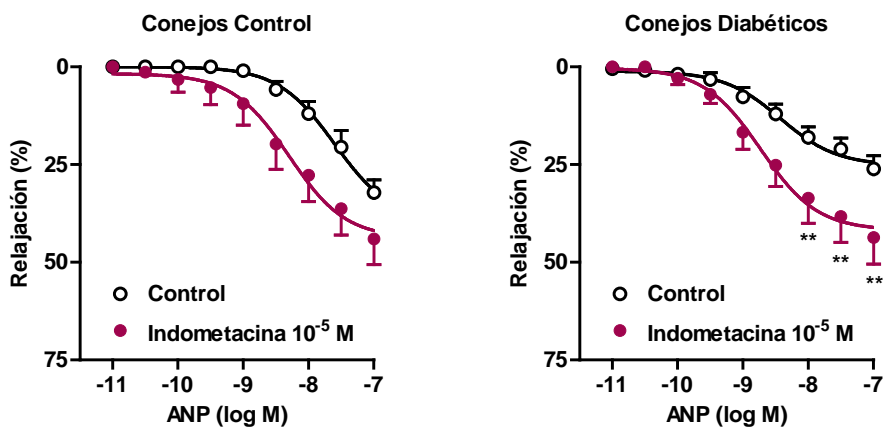


Figura 53. Curvas concentración-respuesta a ANP en arteria basilar de conejo control (n=11) y de conejo diabético (n=10), incubadas con indometacina (10⁻⁵ M). Los valores se expresan como porcentaje del tono activo y representan la media ± EEM de segmentos arteriales de al menos 4 animales. Significativamente diferente del control, ** p < 0,01.

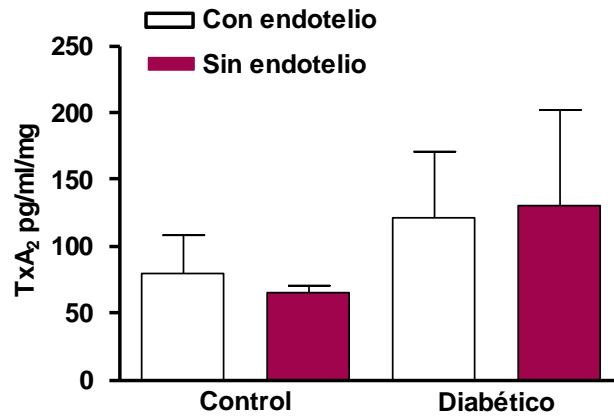


Figura 54. Liberación de tromboxano (TXA₂) en arteria basilar de conejos control (n=4) y conejos diabéticos (n=4), con y sin endotelio, incubadas con ANP (10⁻⁷ M). Los valores representan la media ± EEM.

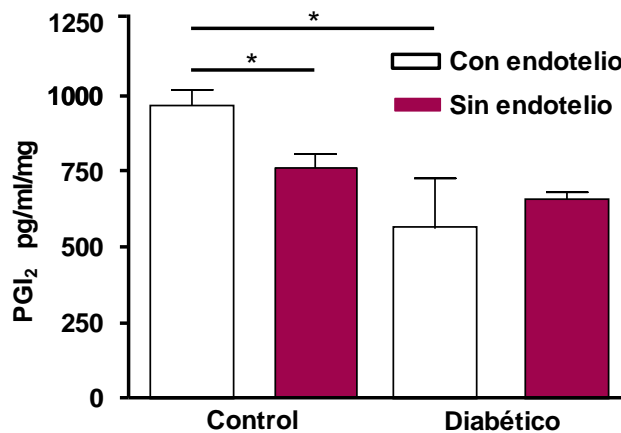


Figura 55. Liberación de prostaciclina (PGI₂) en arteria basilar de conejos control (n=4) y conejos diabéticos (n=4), con y sin endotelio, incubadas con ANP (10⁻⁷ M). Los valores representan la media ± EEM. Significativamente diferente del correspondiente control, * p < 0,05.

En arteria de conejo diabético despolarizada con KCl (50 mM) la relajación a ANP fue significativamente menor a la observada en arterias precontraídas con UTP (Figura 56). El valor de EC_{50} de las curvas concentración-respuesta a ANP en arterias despolarizadas procedentes de conejos diabéticos ($8,61 [6,81 - 10,86] \times 10^{-9}$ M) fue significativamente menor que en arterias de conejos controles ($6,10 [5,07 - 7,34] \times 10^{-8}$ M), sin diferencias significativas en los valores de $E_{m\acute{a}x}$.

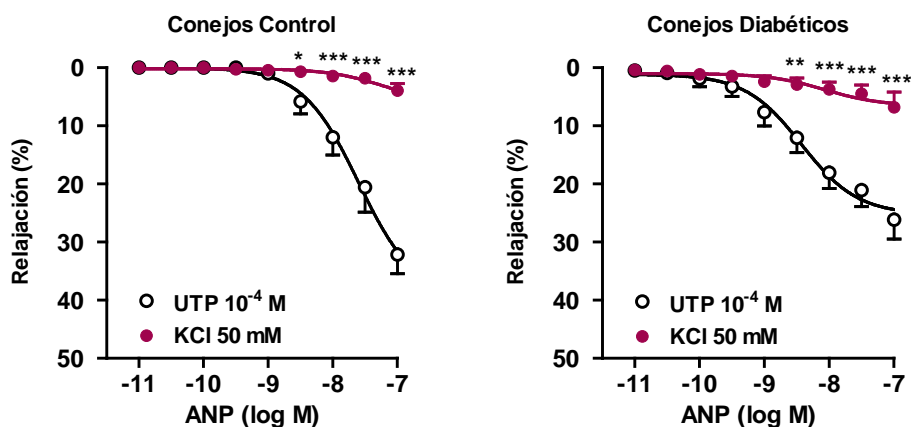


Figura 56. Curvas concentración-respuesta a ANP en arteria basilar de conejo control (n=11) y de conejo diabético (n=10) despolarizadas con KCl (50mM). Los valores se expresan como porcentaje del tono activo y representan la media \pm EEM de segmentos arteriales de al menos 4 animales. Significativamente diferente del control (UTP), * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Los inhibidores selectivos de los canales K_v (Figura 57) y BK_{Ca} (Figura 58) inhibieron significativamente la respuesta relajante de la arteria basilar de conejos diabéticos al ANP. En presencia del inhibidor selectivo de los K_v (4-AP, 10^{-4} M), el valor de EC_{50} del ANP en arteria basilar de conejos diabéticos ($4,04 [3,62 - 4,52] \times 10^{-8}$ M) fue significativamente mayor que en

conejos controles ($1,29 [1,17 - 1,41] \times 10^{-8}$ M), sin haber cambios en los valores de $E_{\text{máx}}$ (Figura 57). En cambio, en presencia del inhibidor de los BK_{Ca} (iberiotoxina, 5×10^{-8} M), el valor de EC_{50} del ANP en arterias de conejos diabéticos ($1,66 [1,44 - 1,91] \times 10^{-8}$ M) fue significativamente menor que en arterias de conejos control ($3,03 [2,52 - 3,65] \times 10^{-8}$ M) (Figura 58). Finalmente, el inhibidor de los K_{ATP} (glibenclamida, 10^{-5} M), abolió completamente el efecto relajante del ANP en arterias de conejos diabéticos, provocando por lo tanto una inhibición mayor a la observada en arteria de conejos controles (Figura 59). Por otro lado, los experimentos de Western blot mostraron que los tres subtipos de canales de K^+ estudiados (K_V , BK_{Ca} y K_{ATP}) se expresan en la arteria basilar de conejos diabéticos, y que la diabetes no modifica de forma significativa dicha expresión (Figura 60).

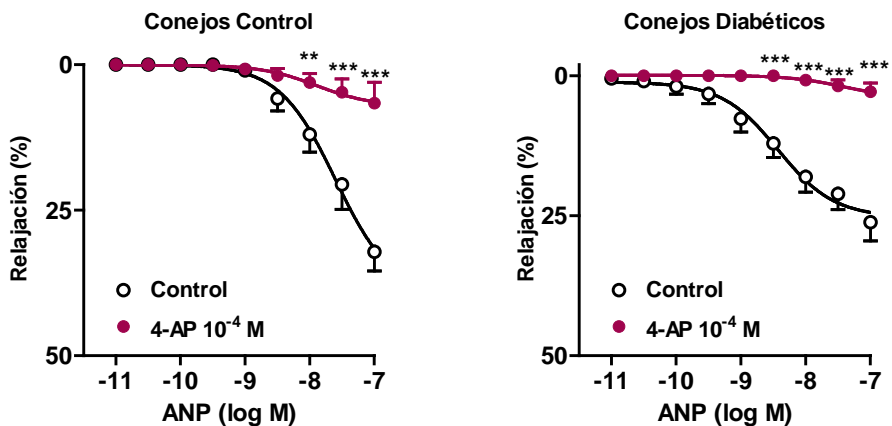


Figura 57. Curvas concentración-respuesta a ANP en arteria basilar de conejo control ($n=11$) y de conejo diabético ($n=10$) incubadas con 4-AP (10^{-4} M). Los valores se expresan como porcentaje del tono activo y representan la media \pm EEM de segmentos arteriales de al menos 4 animales. Significativamente diferente del control, ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

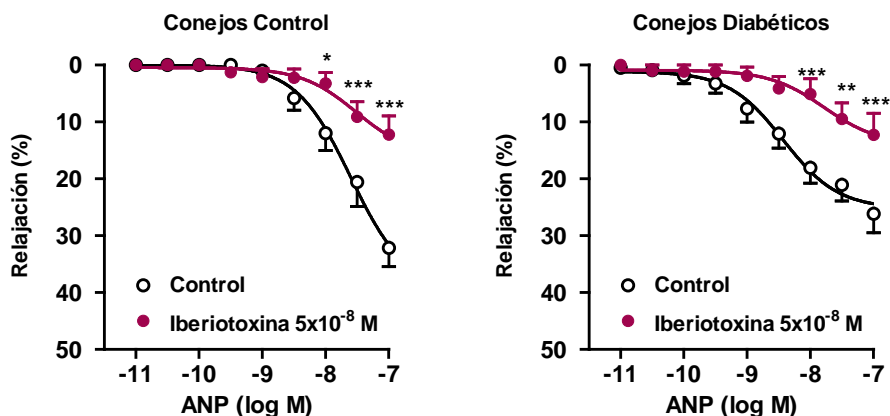


Figura 58. Curvas concentración-respuesta a ANP en arteria basilar de conejo control (n=11) y de conejo diabético (n=10) incubadas con iberiotoxina (5×10^{-8} M). Los valores se expresan como porcentaje del tono activo y representan la media \pm EEM de segmentos arteriales de al menos 4 animales. Significativamente diferente del control, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

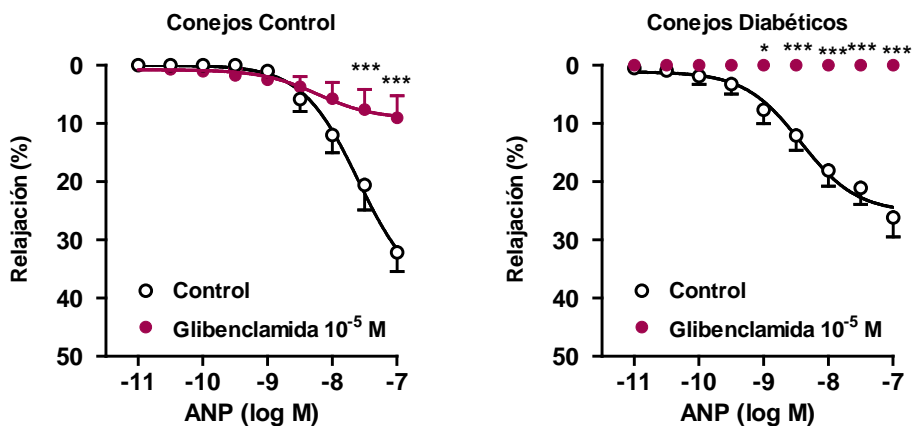


Figura 59. Curvas concentración-respuesta de ANP en arteria basilar de conejo control (n=11) y de conejo diabético (n=10) incubadas con glibenclámdida (10^{-5} M). Los valores se expresan como porcentaje del tono activo y representan la media \pm EEM de segmentos arteriales de al menos 4 animales. Significativamente diferente del control, * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$.

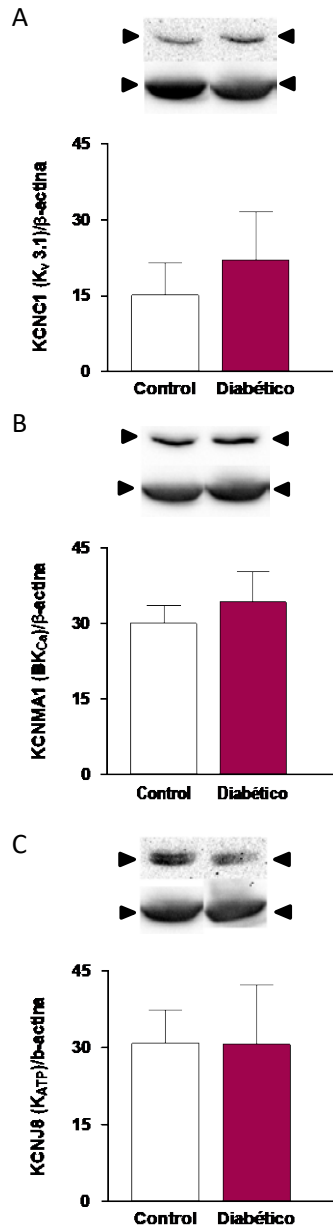


Figura 60. Expresión de los subtipos de canales de K^+ en arteria basilar de conejos controles y diabéticos. Western blot representativo y abundancia relativa de (A) K_v (KCNC1), (B) BK_{Ca} (KCNMA1), y (C) K_{ATP} (KCNJ8). La densidad relativa de las bandas inmunorreactivas de los canales fueron normalizadas respecto a las bandas de β -actina correspondientes. Los datos se expresan como media \pm EEM de n=3-5.

Resultados

Los valores de EC₅₀ de las curvas concentración respuesta de ANP en las diferentes situaciones experimentales estudiadas se presentan en la Tabla 2.

Tabla 2. Valores de EC₅₀ en las diferentes situaciones experimentales.

	EC ₅₀	
	Conejo control	Conejo diabético
Control	2,51 [2,32 - 2,71] x10 ⁻⁸	3,71 [3,45 - 3,89] x10 ⁻⁹ ###
Legrado	3,20 [2,73 - 3,76] x10 ⁻⁹ ***	5,55 [5,29 - 5,82] x10 ⁻⁹ *** ###
L-NOArg	1,17 [9,37x10 ⁻⁹ - 1,45]x10 ⁻⁸ ***	2,35 [1,99 - 2,79] x10 ⁻⁹ ** ###
Indometacina	5,03 [4,57 - 5,53] x10 ⁻⁹ ***	1,88 [1,71 - 2,04] x10 ⁻⁹ *** ###
KCl 50 mM	6,10 [5,07 - 7,34] x10 ⁻⁸ ***	8,61 [6,81 - 10,86] x10 ⁻⁹ *** ###
Glibenclamida	5,94 [5,21 - 6,77] x10 ⁻⁹ ***	----
4-AP	1,29 [1,17 - 1,41] x10 ⁻⁸ ***	4,04 [3,62 - 4,52] x10 ⁻⁸ *** ###
Iberiotoxina	3,03 [2,52 - 3,65] x10 ⁻⁸	1,66 [1,44 - 1,91] x10 ⁻⁸ *** ###

Los valores se expresan como media e intervalos de confianza. Significativamente diferente de su control *** p < 0,001. Significativamente diferente de su correspondiente valor en conejo control ### p < 0,001.

Discusión

1 MODELOS ANIMALES DE ICTUS ISQUÉMICO Y DIABETES

1.1. Ictus isquémico

Ningún modelo animal es capaz de abarcar todas las variables que afectan al ictus isquémico humano. Los ictus se presentan de muchas formas según la causa, localización, tamaño e impacto funcional en el paciente. En consecuencia, no hay ningún modelo de ictus universalmente apropiado (Howells et al., 2010). El subtipo de ictus humano más común es el causado por la oclusión de la arteria cerebral media (ACM). En los modelos animales de este subtipo de ictus, se utilizan dos métodos quirúrgicos para acceder a los vasos cerebrales y generar una isquemia focal. El primer método requiere abrir el cráneo para acceder directamente a las arterias cerebrales. En la mayoría de los casos, esto implica pequeñas craneotomías que permiten que las ramas distales de la ACM sean ligadas (Crowell et al., 1981), cortadas (Tamura et al., 1979, 1981), o selladas por fototrombosis (Markgraf et al., 1993) o electrocoagulación (O'Brien y Waltz, 1973). Aunque la oclusión del vaso es usualmente permanente, la ligadura puede deshacerse o la trombosis puede recanalizarse para realizar una oclusión transitoria. El vasoconstrictor endotelina también puede utilizarse para ocluir reversiblemente la ACM (Agnati et al., 1991), aunque esta intervención también requiere de una mínima craneotomía para introducir una cánula fina e inyectar *in situ* la endotelina y provocar la vasoconstricción (Callaway et al., 1999). Para evitar la apertura del cráneo, el segundo grupo de métodos usa el acceso intraarterial para ocluir las arterias cerebrales. El más comúnmente utilizado es la oclusión de la ACM

con un filamento de nailon. Aunque este método tiene muchas variantes, particularmente respecto a la elaboración del filamento ocluyente y el cierre de vasos adicionales para manipular el flujo sanguíneo colateral, la técnica básica descrita originalmente por Koizumi et al. (1986) y modificada por Longa et al. (1989) consiste en la introducción de un filamento dentro de la arteria carótida interna extracraneal y avanzarlo hasta que su extremo anterior ocluye el origen de la ACM.

A pesar de que la oclusión mediante un filamento intraluminal y sus variantes modelan efectivamente la inducción de la isquemia en el sitio más comúnmente ocluido en humanos, no modelan el mecanismo de oclusión. Aproximadamente el 80% de los ictus humanos son isquémicos (Donnan et al., 2008), y la mayoría de los grandes infartos (no lacunares) son causados por tromboembolismo. En consecuencia, la ventaja específica de los métodos tromboembólicos es que es el mecanismo de oclusión que más se asemeja al observado en una gran proporción de ictus humanos, y que permiten el estudio de procesos trombolíticos. Sin embargo, el éxito de este modelo es altamente dependiente de las propiedades del trombo introducido y, al igual que en humanos, el tiempo de reperusión puede ser incierto. A pesar de que el primer modelo embólico de ictus fue descrito en perros (Hill et al., 1955), no fue hasta 1982 que un modelo embólico se describió en rata (Kudo et al., 1982) usando esencialmente el mismo enfoque quirúrgico que el usado para la oclusión con un filamento intraluminal. El modelo embólico más simple inyecta una suspensión de pequeños fragmentos de trombos en la arteria carótida común o arteria carótida interna. La mortalidad descrita utilizando este modelo fue baja,

pero el foco de infarto fue ampliamente distribuido, incluyendo un número significativo en el hemisferio contralateral (Kudo et al., 1982). Una alternativa es la introducción directa de la formación del trombo en el origen de la ACM o en su rama más distal. Para tal fin, se ha infundido trombina en el origen de la ACM en ratas (Zhang et al., 1997) y en conejos (Jahan et al., 2008), mediante el paso de sangre dentro de un catéter lleno de trombina y luego liberando el trombo recién formado (Beech et al., 2001) o por inyección de trombina directamente dentro de la rama distal de la ACM (Orset et al., 2007).

Aunque las ratas Sprague-Dawley son los animales más utilizados en la investigación en ictus, desafortunadamente dan resultados muy variables (Spratt et al., 2006) probablemente debido a su alta variabilidad en la anatomía de la ACM (Fox et al, 1993). Incluso la elección del proveedor puede condicionar los resultados en las ratas Sprague-Dawley (Oliff et al., 1995). A priori, las ratas Wistar Kyoto (WKR) parecen ser la mejor elección. Carecen de la variabilidad vascular de las Sprague-Dawley, y no exhiben la extrema reactividad inflamatoria de las cepas Lewis y Fischer 344 (Morand y Leech, 2001). Además, la relación genética de las ratas WKR con las cepas de las ratas espontáneamente hipertensas y las ratas espontáneamente hipertensas propensas a ictus, que son los modelos más comúnmente utilizados de hipertensión y de ictus espontáneo, las convierten en un trampolín ideal para evaluaciones preclínicas posteriores.

En este estudio utilizamos el método del filamento intraluminal para ocluir transitoriamente la ACM en su origen. Este modelo simula la trombectomía mecánica usada en clínica para retirar el trombo, una

técnica que podría revolucionar el tratamiento agudo del ictus (Sutherland et al., 2016). En nuestro estudio, la mortalidad en las primeras 24 h fue del 17% y se aplicaron criterios de exclusión objetivos para impedir la inclusión de animales sin un adecuado patrón de isquemia-reperfusión o con un ictus hemorrágico. Además, no hubo diferencias en el patrón de isquemia transitoria entre los tres grupos experimentales, por lo que todos los animales afrontaron sus respectivos tratamientos en las mismas condiciones. Finalmente, los dos principales resultados valorables en el ictus isquémico, el tamaño de infarto y la funcionalidad, mostraron una potente correlación positiva. La probabilidad de presentar un mayor deterioro funcional crece con el aumento del volumen de infarto.

1.2. Diabetes

Existen diferentes modelos experimentales para el estudio de la diabetes, que pueden dividirse en tres grandes grupos: modelos espontáneos, modelos inducidos (quirúrgica o químicamente), y modelos transgénicos (King y Bowe, 2016). Los diferentes modelos permiten estudiar tanto la prevención y la fisiopatología como los tratamientos para la enfermedad. Cada uno de los modelos tiene sus méritos, pero ninguno representa completamente la fisiopatología de la enfermedad. Por lo tanto, la elección del modelo animal dependerá del diseño y objetivo del estudio (King y Bowe, 2016). El modelo de daño pancreático inducido, ya sea quirúrgica o químicamente, es una herramienta útil en el estudio de las consecuencias de la hiperglucemia, como por ejemplo el desarrollo de complicaciones diabéticas (Rees y Alcolado, 2005). Entre los modelos más

utilizados están los que inducen la diabetes mediante la inyección de un tóxico (aloxano o estreptozotocina) al animal de experimentación (Lenzen, 2008), que produce una destrucción de las células β -pancreáticas ocasionando un síndrome equivalente a la diabetes tipo 1, con hiperglucemia, polidipsia, glucosuria, poliuria y pérdida de peso (Wang et al., 2010). El aloxano es un compuesto hidrofílico que a pH neutro se reduce rápidamente a ácido dialúrico, forma tóxica del compuesto que actúa selectivamente sobre las células β -pancreáticas generando el radical hidroxilo que provoca fragmentación del ADN. Tras la inyección vía intravenosa de aloxano, los animales muestran una hipoglucemia transitoria las primeras 12-24 h, que revierte a hiperglucemia crónica a partir de 3-4 días (Lenzen, 2008). En el presente trabajo hemos utilizado un modelo de diabetes experimental inducida por aloxano en conejos. Teóricamente se esperaría que los animales inyectados con aloxano o estreptozotocina mostraran una falta total de insulina proveniente de sus células β -pancreáticas y necesitaran administración exógena de insulina para vivir. Sin embargo, a pesar de presentar niveles insignificantes de insulina endógena, pueden sobrevivir durante meses sin tratamiento. El aloxano tiene la desventaja frente a la estreptozotocina de que el porcentaje de incidencia de la diabetes es bastante variable y la incidencia de cetosis y consiguiente mortalidad es relativamente alta. Además, en algunos animales la hiperglucemia revierte espontáneamente al cabo de unas semanas. No obstante, el aloxano es el agente diabetogénico más comúnmente usado en el conejo.

Los conejos diabéticos utilizados en este estudio presentaron poliuria, polidipsia, hiperglucemia y menor aumento ponderal que los conejos del grupo control, confirmando la inducción de la diabetes. En un estudio anterior pudimos comprobar que los conejos a los que se les indujo la diabetes presentaron un nivel plasmático de ANP significativamente mayor que los animales control (Marrachelli et al., 2012), tal como se ha descrito en diversos estudios realizados por otros grupos en conejos (Yeğen et al., 1995), ratas (Ortola et al., 1987; Choi et al., 1994; Obineche et al., 2006), y humanos con diabetes tipo 1 (McKenna et al., 2000; McKenna et al., 2005).

2. EFECTO DEL ANP SOBRE EL DAÑO CEREBRAL ISQUÉMICO EN EL ICTUS

Hasta lo que sabemos, el presente estudio muestra por primera vez que el ANP, administrado de forma local y precoz tras un episodio de isquemia focal transitoria con reperfusión, ejerce un potente y significativo papel tanto en la reducción del volumen de infarto como en la mejoría del estado neurofuncional, los dos principales objetivos de la neuroprotección en el ictus isquémico agudo.

A pesar de que no se puede hacer una comparación directa con los efectos del ANP descritos previamente en el ictus experimental, debemos citar algunos antecedentes relacionados. Naruse et al. (1991), usando un modelo de oclusión permanente de la arteria cerebral media en ratas, fue el primero en describir que el ANP disminuía el contenido de agua y sodio del cerebro y reducía el área de las regiones edematosas. Aunque no es estrictamente un modelo de ictus, los estudios de Nakao et al. (1990) y de Akdemir et al. (1997) usando modelos de isquemia cerebral global

describieron algunos resultados en la misma línea. Además, el ANP ha demostrado disminuir el edema cerebral secundario a un episodio de ictus hemorrágico (Rosenberg y Estrada, 1995). Esta evidencia nos lleva a sugerir que el ANP podría ser visto como un factor protector en el ictus debido, al menos en parte, a sus efectos antiedema y, por lo tanto, a su habilidad en disminuir la presión intracraneal. Por otra parte, Wengenmayer et al. (2011) utilizó un inhibidor de la endopeptidasa neutra (SLV 338), la enzima que degrada los péptidos natriuréticos, para estudiar su rol protector en ratas espontáneamente hipertensas propensas al ictus. Sus resultados mostraron que el resultado neurológico y el tamaño de infarto no fueron significativamente diferentes entre los animales tratados y no tratados, pero la incidencia de ictus y la mortalidad disminuyeron en los animales tratados.

2.1. Efecto antiapoptótico del ANP en el cerebro isquémico

Nuestros resultados muestran que la neuroprotección inducida por el ANP se correlaciona con la disminución del número de células TUNEL positivas en el tejido cerebral isquémico, así como con la disminución de la caspasa-3 activada, lo que significa que la inhibición de la muerte celular apoptótica subyace en la acción protectora del ANP. La relación entre ANP y apoptosis no se ha investigado previamente en el marco de la isquemia-reperfusión cerebral, pero en otros tejidos y condiciones se han presentado efectos opuestos. En cuanto al tejido nervioso, y en línea con nuestros resultados, el ANP inhibe la fragmentación apoptótica del ADN en líneas celulares neuronales en cultivo, como las células PC12 privadas de

suero (Fiscus et al., 2001) y células NG108-15 tratadas con SNAP, un dador de NO (Cheng Chew et al., 2003). El efecto antiapoptótico ha sido demostrado en otros tejidos no nerviosos, como en células de la granulosa estimuladas para luteinización (Dineva et al., 2007), así como en un modelo de isquemia-reperfusión hepática (Gerwig et al., 2003; Kulhanek-Heinze, 2004). Por el contrario, se ha comprobado que el ANP es responsable de apoptosis en cultivos celulares de cardiomiocitos (Wu et al., 1997; Kang et al., 2000), así como de células musculares lisas vasculares pulmonares (Deprez et al., 2001). Posiblemente, la diversidad de aspectos metodológicos, que incluyen el tejido examinado y la dosis de ANP, explicarían, al menos en parte, tales discrepancias.

2.2. Papel de los receptores cerebrales para el ANP en la neuroprotección

Como ya se ha descrito, los péptidos natriuréticos se unen a subtipos específicos de receptores de membrana (Potter et al., 2006; Kerkelä et al., 2015). El ANP se une tanto al receptor NPR-A como al NPR-C; esta es la razón por la que no se ha estudiado la expresión del receptor NPR-B en el presente estudio. El principal descubrimiento en estos experimentos fue que la isquemia-reperfusión disminuye la expresión de NPR-A y de NPR-C en el hemisférico ipsilateral a la isquemia, y que el ANP no modifica la regulación a la baja de la expresión de estos receptores inducida por la isquemia. La conclusión más obvia es que la disminución de la expresión de NPR-A y de NPR-C podría tener un rol en la fisiopatología del ictus

isquémico agudo, y que el efecto del ANP en la expresión de sus receptores no tiene relación con su papel neuroprotector.

2.3. Intervención de los canales de K⁺ cerebrales en la neuroprotección inducida por ANP

Debido a su amplia distribución en el cerebro, los canales de K⁺ son una diana farmacológica atractiva en enfermedades neurológicas, como por ejemplo el ictus (Maljevic y Lerche, 2013). Es de notar que los canales de K⁺ participan en el control de diferentes fases de la apoptosis (Burg et al., 2006). Nosotros analizamos la expresión de los canales de K⁺ sensibles a ATP (K_{ATP}), dependientes de voltaje (K_V) y activados por calcio (BK_{Ca}). Nuestros resultados revelan que la isquemia-reperfusión no afecta la expresión de los subtipos K_V y BK_{Ca}, pero que inhibe fuertemente la expresión de los canales K_{ATP}. Dicha inhibición fue parcial, pero significativamente contrarrestada por el ANP.

Como han indicado Sun y Feng (2013), el rol neuroprotector de los canales K_{ATP} en modelos animales de isquemia cerebral está bien documentado. Cuando cesa el flujo sanguíneo, se produce un fallo energético y la disminución del ATP conduce a la activación de canales K_{ATP}, hiperpolarización, supresión de la actividad neuronal y, por lo tanto, a estabilización del potencial de membrana de reposo y protección neuronal contra la despolarización anóxica. En consecuencia, los activadores de canales K_{ATP} han mostrado disminuir la muerte neuronal, mientras que los bloqueantes de los canales K_{ATP} impiden la protección neuronal. En línea con esta evidencia, nuestros resultados indican que el ANP aumenta la

expresión de los canales K_{ATP} y sugieren que estos canales podrían participar, al menos en parte, en el efecto neuroprotector de este péptido natriurético.

2.4. Efecto modulador del ANP sobre vías de señalización de apoptosis en el cerebro isquémico

La proteína quinasa activada por mitógenos (MAPK), que incluye la subfamilia de quinasas reguladas por señales extracelulares 1/2 (ERK1/2), y la fosfatidilinositol 3-quinasa/Akt (PI3K/Akt) son vías de señalización importantes que están implicadas en la regulación de la apoptosis tras un ictus (Sun y Nan, 2016). Las principales características de la vía de señalización PI3K/Akt en la isquemia cerebral han sido recientemente actualizadas (Koh y Lo, 2015; Zhao et al., 2016), y han descrito resultados contradictorios: la isquemia-reperfusión ha mostrado inhibir o activar la vía PI3K/Akt. Obviamente surge la pregunta de si la vía PI3K/Akt debería ser inhibida o activada para evitar la apoptosis y promover la supervivencia celular. Nuestros resultados evidencian claramente que el episodio de isquemia-reperfusión aumenta potentemente la expresión de p-Akt, y que el ANP no altera dicho aumento. Se puede, por lo tanto, concluir que la acción neuroprotectora del ANP no está mediada por la modulación de la vía PI3K/Akt.

Por otra parte, en la mayoría de estudios que usan el modelo de oclusión de la arteria cerebral media, los niveles de p-ERK1/2 que reflejan la actividad de ERK aumentan durante el estado de reperfusión, especialmente en la zona de penumbra (Sawe et al., 2008). Nuestros

resultados concuerdan con estas conclusiones, ya que la expresión tanto de p-ERK1 como de p-ERK2 aumentó en el hemisferio isquémico. En cuanto al efecto del ANP, éste disminuyó de forma significativa el aumento de la expresión de p-ERK2, pero no el de p-ERK1. En concordancia, la inhibición precoz de la vía ERK1/2 con U0126 disminuye el daño neuronal y mejora la tasa de supervivencia tras una isquemia cerebral global (Johansson et al., 2014). Usando un modelo de isquemia focal, en vez de global, este grupo ha descrito una mejoría en la función sensoriomotora a largo plazo, pero sin efectos en el volumen de infarto, tras el tratamiento con U0126 (Ahnstedt et al., 2015). En conjunto, nuestros resultados sugieren que el efecto neuroprotector del ANP ocurre, al menos en parte, por una atenuación de la cascada apoptótica vía regulación a la baja de los niveles de p-ERK2.

3. EFECTO RELAJANTE DEL ANP EN LA ARTERIA BASILAR

En el presente estudio hemos demostrado que el ANP a concentraciones en el rango nanomolar relaja la arteria basilar de conejo aislada. En los vasos sanguíneos cerebrales de rata se ha descrito la localización autoradiográfica de sitios de unión para el ANP (Bianchi et al., 1986). Nuestros resultados muestran la expresión de NPR-A y NPR-C, los dos receptores para ANP (Kerkelä et al., 2015), en la arteria basilar de conejo. El balance entre las interacciones del ANP con el receptor NPR-A acoplado a guanilato ciclasa y con el receptor de aclaramiento NPR-C (Winqvist y Hintze, 1990) resultaría en el efecto relajante observado.

La relajación inducida por ANP en la arteria basilar de conejo está en línea con la relajación producida por este péptido en arteria basilar de mono (Kawai y Ohhashi, 1989), perro (Okamura et al., 1989) y gerbo (Kruuse et al., 2001; Guo et al., 2015) descritas anteriormente. En dos estudios previos, hemos demostrado mayores efectos relajantes de ANP en arteria carótida (Marrachelli et al., 2011) y renal (Marrachelli et al., 2012) de conejo. En conjunto, nuestros resultados muestran diferencias en la magnitud de la relajación inducida por el ANP entre los lechos vasculares de conejo, confirmando la heterogeneidad descrita en arterias de rata (Cohen y Schenck, 1985), perro (Ishikawa et al., 1987) y mono (Kawai y Ohhashi, 1989). Para estudiar los efectos vasoactivos del ANP en vasos sanguíneos cerebrales de pequeño calibre se han utilizado otras aproximaciones metodológicas *in vivo* e *in vitro*. El ANP administrado extraluminalmente no indujo vasodilatación en ramas de las arterias cerebrales posteriores (Osol et al., 1986) y arteriolas penetrantes intracerebrales (Mori et al., 1997) de rata canuladas y presurizadas. En contraste, el ANP tópico indujo dilatación arteriolar pial en preparaciones de ventana craneal en gatos (Macrae et al., 1987) y conejos (Iida et al., 2001).

Hemos demostrado previamente que los niveles plasmáticos de ANP en conejo están en el rango picomolar (Marrachelli et al., 2012), confirmando determinaciones previas (Rankin et al., 1987; Valverde et al., 1992; Yeğen et al., 1995). Estos niveles de ANP son mucho menores que las concentraciones nanomolares que inducen relajación de la arteria basilar. No obstante, se ha confirmado por muchos grupos de investigación una

amplia distribución del ANP en el sistema nervioso central, incluyendo el telencéfalo (Cao y Yang, 2008). Específicamente, se ha encontrado inmunorreactividad a ANP en procesos neuronales asociados con vasos piales (McKenzie et al., 1990). Por tanto, niveles más altos de ANP en el cerebro, en vez de ANP circulante, podrían tener efectos fisiológicos cerebrovasculares paracrinos. Respecto a ANP exógeno, experimentos *in vivo* administrando el ANP mediante inyección local intracarotídea o inyección sistémica intravenosa, han fallado en demostrar efectos en la circulación cerebral (Macrae et al., 1987; Tamaki et al., 1992; Caramelo et al., 1986; Guo et al., 2015), a menos que la barrera hematoencefálica estuviera abierta farmacológicamente (Iida et al., 2001). Esto concuerda con la baja penetración del ANP en la barrera hematoencefálica (Levin et al., 1987), y debería tenerse en cuenta cuando se considere el uso terapéutico de dosis farmacológicas de ANP (Rubattu et al., 2008; Saito, 2010) en enfermedades cerebrovasculares y otras alteraciones neurológicas.

3.1. Endotelio-dependencia de la relajación inducida por ANP

El perfil vasodilatador del ANP fue caracterizado por primera vez en arteria aorta de conejo (Winqvist et al., 1984) y posteriormente se revisaron los mecanismos mediante los cuales el ANP induce la relajación (Winqvist y Hintze, 1990). Sin embargo, los estudios específicos en vasos sanguíneos cerebrales han prestado escasa atención a los mecanismos mediante los cuales se produce la vasodilatación. En el presente estudio, la eliminación del endotelio inhibió fuertemente la respuesta relajante de la

arteria basilar a ANP, en contraste con respuestas a ANP independientes del endotelio descritas previamente en arteria basilar de perro (Okamura et al., 1989) y gerbo (Kruuse et al., 2001). Aunque la vasodilatación inducida por ANP originalmente se vio que era endotelio independiente en aorta de conejo (Winqvist et al., 1984), el endotelio contribuye a la vasodilatación coronaria mediada por ANP (Brunner y Wölkart, 2001). En contraste, la eliminación del endotelio aumentó la respuesta relajante de la arteria carótida de conejo a ANP (Marrachelli et al., 2011). En consecuencia, el rol del endotelio en la relajación inducida por ANP parece depender de la especie, del lecho vascular y quizás del vasoconstrictor con el que se induce el tono activo vascular.

3.2. Papel del óxido nítrico y los prostanoideos en la relajación inducida por ANP

Dado que el endotelio contribuye a la relajación de la arteria basilar de conejo inducida por ANP, hemos explorado la participación del óxido nítrico (NO). La inhibición de la síntesis de NO también disminuyó la relajación a ANP, sugiriendo que dicha relajación está mediada parcialmente por la liberación de NO endotelial. Se ha descrito que la respuesta vasodilatadora a ANP en el antebrazo de humanos sanos está mediada, en parte, por NO derivado del endotelio (Sugamori et al., 2002). Al igual que la dependencia de endotelio, el rol del NO en la vasodilatación inducida por ANP ha mostrado diferencias en otros lechos vasculares y especies. En este sentido, la relajación a ANP independiente de endotelio en arteria pulmonar de gato no fue modificada por la inhibición de la

síntesis de NO (Hyman et al., 2001). Cabe destacar que la relajación a ANP estuvo inesperadamente incrementada en aorta, carótida y arteria pulmonar de ratón al inhibir la síntesis de NO (Sabrane et al., 2009). Previamente hemos descrito que la relajación a ANP, incrementada al eliminar el endotelio, no se modifica por la inhibición de la síntesis de NO en arteria carótida de conejo (Marrachelli et al., 2011), sugiriendo la participación de otros factores endoteliales en la respuesta vascular a ANP. Un hecho interesante es que la dependencia del NO endotelial en la relajación a ANP en arteria aorta de rata se pierde con el envejecimiento (Moritoki et al., 1992).

En el presente estudio hemos investigado también la participación de metabolitos derivados del ácido araquidónico vía ciclooxigenasa (prostanoides) en la modulación de la respuesta relajante de la arteria basilar de conejo a ANP. La información sobre la modulación de los efectos vasoactivos del ANP por los prostanoides es escasa y la mayoría fue publicada poco después del descubrimiento de los péptidos natriuréticos. En este sentido, los primeros estudios mostraron que la indometacina no modificaba la relajación a ANP en diferentes arterias de rata, conejo (García et al., 1984) y perro (Bache et al., 1988). Sin embargo, la redistribución del flujo sanguíneo renal inducida por ANP en la corteza profunda está mediada por prostaglandinas (Salazar et al., 1988). Nuestros resultados en la arteria basilar de conejo muestran cómo el tromboxano A₂ es liberado desde las células musculares lisas y la prostaciclina es liberada tanto desde el endotelio como de las células musculares lisas en presencia de ANP. La indometacina aumentó la respuesta relajante a ANP, sugiriendo

una influencia vasoconstrictora neta por parte de los prostanoideos. Hemos descrito previamente este rol modulador de los prostanoideos en arteria carótida de conejo (Marrachelli et al., 2011), en contraste con la falta de efecto de la indometacina en la relajación a ANP descrita recientemente en arterias carótida y renal de rata (Matsumoto et al., 2015b). Por lo tanto, se deberían realizar más estudios para clarificar la participación de los prostanoideos en la relajación de las arterias cerebrales ejercida por el ANP.

3.3. Flujo de K⁺ y canales implicados en la relajación inducida por el ANP

La hiperpolarización debida al flujo saliente de K⁺ desde el músculo liso vascular en respuesta a la activación de canales de K⁺ es un importante mecanismo de vasodilatación (Jackson, 2017). Hemos examinado también si la respuesta relajante de la arteria basilar de conejo a ANP está mediada por este flujo de K⁺, y los subtipos de canales de K⁺ implicados. En arterias precontraídas por despolarización con altas concentraciones de KCl, la relajación a ANP fue prácticamente abolida, indicando la mediación del flujo saliente de K⁺ en la relajación de la arteria basilar de conejo a ANP. Nuestros resultados están en línea con la falta de efecto relajante a ANP originalmente descrito en arterias aorta y renal de conejo precontraídas con KCl (Winqvist et al., 1984; García et al., 1984), y confirma similares hallazgos en arteria basilar de mono (Kawai y Ohhashi, 1989), así como nuestros estudios previos en arteria carótida de conejo (Marrachelli et al., 2011).

Se han descrito cuatros clases principales de canales de K^+ en las células musculares lisas de los vasos sanguíneos: canales de K^+ dependientes de voltaje (K_V), canales de K^+ de alta conductancia activados por calcio (BK_{Ca}), canales de K^+ sensibles a ATP (K_{ATP}) y canales de K^+ rectificadores de entrada (K_{ir}), los cuales se expresan solo en las arterias de pequeño calibre (Ko et al., 2008). Nuestros resultados muestran la expresión de los subtipos K_V , BK_{Ca} y K_{ATP} en la arteria basilar de conejo. Por tanto, usamos inhibidores selectivos de los subtipos de canales de K^+ para estudiar su participación en el flujo saliente de K^+ provocado por el ANP y la subsecuente relajación arterial. Las fuertes inhibiciones de la relajación a ANP producidas por la 4-AP, la iberiotoxina y la glibenclamida apoyan la participación de los canales K_V , BK_{Ca} y K_{ATP} , respectivamente. Hemos mostrado por primera vez la participación de los tres subtipos de canales de K^+ en la relajación de las arterias cerebrales a ANP, en línea con los estudios que describen por separado la contribución de los canales K_V (Tanaka et al., 2006), BK_{Ca} (Tanaka et al., 1998; Otsuka et al., 2002) y K_{ATP} (Kubo et al., 1994) como efectores terminales de la relajación a ANP en otros lechos vasculares.

4. EFECTOS DE LA DIABETES EN LA RELAJACIÓN INDUCIDA POR ANP Y SUS MECANISMOS

La diabetes provoca cambios estructurales y funcionales en el lecho cerebrovascular, por lo que se ven afectadas las respuestas vasoactivas (Ergul et al., 2012). Nuestros resultados en arteria basilar de conejo demuestran que la diabetes ejerce cambios en los mecanismos de

relajación a ANP, que en conjunto provocan aumento de la sensibilidad arterial a ANP. El aumento de la respuesta de la arteria basilar a ANP no está asociado solamente a cambios en el papel del endotelio, del NO, de los prostanoïdes y de los canales de K⁺, sino también a cambios en la expresión de los receptores. Ya que la principal función del receptor NPR-C es eliminar los péptidos natriuréticos de la circulación (Potter et al., 2006; Pandey, 2008), la disminución de la expresión de este receptor, sin haber cambios significativos en la expresión del receptor NPR-A, resultaría en un menor aclaramiento del ANP, que podría contribuir al aumento de la sensibilidad arterial a ANP.

En ausencia de endotelio, la sensibilidad a ANP fue menor en la arteria basilar procedente de conejo diabético sugiriendo que el aumento de la sensibilidad a ANP inducido por la diabetes está relacionado con las células endoteliales.

En nuestro estudio se observó una menor participación del NO endotelial en la mediación de la respuesta relajante de la arteria basilar de conejos diabéticos, que podría contrarrestar parcialmente la mayor sensibilidad a ANP. En contraste a nuestros resultados en arteria basilar, la diabetes mejora el papel modulador del NO en la respuesta relajante de la arteria carótida al ANP (Marrachelli et al., 2011), pero no modifica la liberación de NO endotelial en la respuesta relajante de la arteria carótida a BNP (Centeno et al., 2013), mostrando nuevamente la existencia de importantes diferencias regionales. El NO y el ANP regulan cooperativamente los niveles de cGMP en las arterias ya que ambos funcionan como vasodilatadores por activación de la vía guanilato ciclasa

(GC)/cGMP (Madhani et al., 2003). Dado que la GC particulada, activada por los péptidos natriuréticos, y la GC soluble, activada por el NO, se regulan recíprocamente (Madhani et al., 2003; Madhani et al., 2006), la disminución de la modulación del NO en la acción relajante de ANP podría estar relacionada con un aumento en la activación de la GC particulada acoplada al receptor NPR-A, consecuencia del menor aclaramiento de ANP. La disfunción endotelial y la alteración de los mecanismos nitrérgicos cumplen un rol central en las complicaciones vasculares de la diabetes (Bertoluci et al., 2015). Se podría especular que la alteración del NO endotelial podría ser la principal consecuencia fisiopatológica de la hiperglucemia crónica y que la mayor sensibilidad de la arteria basilar a ANP podría ser la expresión de una implementación de mecanismos compensatorios dirigidos a contrarrestar la disfunción endotelial, y por lo tanto la alteración de los vasodilatadores, en la diabetes.

Por otra parte, está generalmente aceptado que la prostaciclina está regulada a la baja en la diabetes y que, comparado con pacientes sanos, la relación tromboxano A₂/prostaciclina está elevada en pacientes diabéticos (Stitham y Hwa, 2016). En nuestro estudio la inhibición de los prostanoïdes con indometacina aumentó de forma significativa la relajación arterial a ANP, sugiriendo que los prostanoïdes modulan la respuesta de la arteria basilar a ANP en la diabetes con una mayor influencia vasoconstrictora que podría explicarse por la disminución de la liberación de PGI₂ endotelial sin modificaciones en la liberación de TXA₂ observada en los estudios de ELISA.

Finalmente, respecto a los canales de K⁺, la disfunción de los canales BK_{Ca} puede jugar un papel importante en las complicaciones vasculares de

la diabetes (Qian et al., 2014). En arterias cerebrales, la función de los canales BK_{Ca} está regulada a la baja, contribuyendo al tono arterial aumentado durante la hiperglicemia y diabetes (Nystoriak et al., 2014). La incubación con el bloqueador selectivo de canales BK_{Ca} , iberiotoxina, inhibió la respuesta arterial a ANP en arteria basilar de conejos diabéticos, no modificándose esta respuesta respecto del conejo control, sugiriendo, por lo tanto, que los canales BK_{Ca} no están implicados en la mayor sensibilidad de la arteria basilar a ANP. Por otra parte, el bloqueador selectivo de los canales K_{ATP} , glibenclamida, inhibió fuertemente la acción relajante de ANP en arteria basilar de conejo control y la abolió completamente en animales diabéticos, sugiriendo que en la diabetes aumenta la participación de estos canales en la mediación de la respuesta relajante de la arteria basilar a ANP. El aumento de la actividad de los K_{ATP} , que no se debe a cambios en su expresión arterial, podría contribuir al aumento de la sensibilidad de la arteria basilar a ANP en diabetes. Se ha descrito que los canales K_{ATP} están presentes tanto en el endotelio vascular como en las células musculares lisas vasculares, y cambios o mutaciones en las subunidades de este canal de K^+ se han relacionado con patologías cardiovasculares (Nichols et al., 2013). Por otra parte, se ha descrito que la diabetes produce cambios en los canales K_V que regulan el tono arterial (Nieves-Cintrón et al., 2015; Hong et al., 2016). Se ha sugerido que los canales K_V median señales vasodilatadoras provenientes desde el tejido adiposo perivascular y podrían representar una nueva diana en la regulación del tono vascular y en el tratamiento de la obesidad asociada a desordenes cardiovasculares (Gollasch, 2012). Nuestros resultados

muestran que la 4-aminopiridina inhibe fuertemente la relajación a ANP y que en presencia de este inhibidor la mayor sensibilidad a ANP observada en conejos diabéticos desaparece, sugiriendo que los K_v están implicados en el aumento de la sensibilidad de la arteria basilar a ANP. Estos resultados sugieren que la diabetes aumenta el papel modulador de los K_v . Hasta donde sabemos, este estudio muestra por primera vez la participación de los tres subtipos de canales de K^+ en la relajación de arterias cerebrales y sus cambios inducidos por la diabetes.

5. LIMITACIONES DEL ESTUDIO Y DIRECTRICES FUTURAS

Nuestro estudio tiene algunas limitaciones de tipo metodológico. Se utilizaron dos especies diferentes en los modelos animales. Los efectos del ANP sobre el daño cerebral isquémico se estudiaron en ratas Wistar, mientras que los efectos vasoactivos se estudiaron en conejos Nueva Zelanda. El tratamiento con ANP se administró localmente vía intracerebroventricular, lo cual permitió comprobar su efecto neuroprotector, pero con un limitado valor traslacional en comparación con la administración sistémica. Finalmente, los efectos vasoactivos del ANP se han estudiado en la arteria basilar, un vaso intracraneal de conductancia, en conejos no sujetos a isquemia cerebral. No obstante, los resultados obtenidos, que indican el efecto beneficioso del ANP reduciendo el daño cerebral isquémico y sus efectos vasodilatadores en arterias cerebrales, aunque alterados por la diabetes, nos animan a plantear proyectos que contemplen el estudio de los efectos protectores del ANP mediante su administración intravenosa, asumiendo

razonablemente que la ruptura de la barrera hematoencefálica asociada al ictus facilitará el paso del péptido. La coadministración de antagonistas selectivos de los receptores de aclaramiento NPR-C podría incrementar los efectos protectores del ANP, que deberían estudiarse también en animales diabéticos. En la medida que los efectos cerebrovasculares del ANP pudieran contribuir a la protección, deberían estudiarse los efectos vasoactivos en arterias de resistencia y sobre la perfusión cerebral, así como en condiciones postisquémicas.

Conclusiones

1. El péptido atrial natriurético (ANP) reduce el daño cerebral isquémico provocado por el ictus en ratas. Cuando se administra localmente y de forma precoz tras un episodio de isquemia focal transitoria, el ANP mejora el deterioro neurofuncional, reduce el volumen de infarto y disminuye la muerte celular apoptótica.
2. La disminución de la expresión de los receptores para el ANP (NPR-A y NPR-C) puede tener un rol en la fisiopatología del ictus isquémico, pero no hay un efecto del ANP sobre la expresión de sus receptores en el tejido cerebral isquémico que contribuya a la neuroprotección inducida por el péptido.
3. El ictus reduce la expresión de los canales de K^+ sensibles a ATP (K_{ATP}) en el tejido cerebral isquémico, y la recuperación parcial de la expresión de estos canales por el ANP podría contribuir al efecto neuroprotector del péptido.
4. El ictus regula al alza en el tejido cerebral isquémico las vías de señalización PI3K/Akt y MAPK/ERK1/2, implicadas en la apoptosis. El ANP no modifica la vía PI3K/Akt, pero sí produce una reducción en la expresión de p-ERK2 que, al atenuar la cascada apoptótica, podría contribuir a la neuroprotección.
5. El ANP relaja de forma endotelio-dependiente la arteria basilar de conejo, probablemente por la interacción con los receptores NPR-A y NPR-C que expresa.
6. El óxido nítrico media la relajación inducida por el ANP. Por otro lado, prostanoïdes vasoconstrictores como el tromboxano A_2 y vasodilatadores como la prostaciclina también modulan la respuesta

relajante a ANP con una contribución neta vasoconstrictora. El flujo saliente de K^+ en el músculo liso media la relajación, con los tres subtipos de canales de K^+ estudiados (K_V , BK_{Ca} y K_{ATP}) como efectores.

7. La diabetes produce un aumento en la sensibilidad de la arteria basilar a ANP. Esta mayor sensibilidad resulta de la reducción en la expresión del receptor NPR-C y de una mayor participación de los canales K_{ATP} y K_V . Además, la diabetes disminuye la liberación endotelial de óxido nítrico y prostaciclina.
8. Tanto el efecto antiapoptótico del ANP en el tejido cerebral como su efecto relajante en las arterias cerebrales contribuirían a la neuroprotección que reduce el daño cerebral isquémico provocado por el ictus. No obstante, la diabetes es una comorbilidad frecuente en el ictus, y sus efectos tanto sobre la reactividad cerebrovascular, así como eventualmente sobre la capacidad antiapoptótica del ANP, deben tenerse en cuenta.

Bibliografía

Adams HP Jr, Bendixen BH, Kappelle LJ, Biller J, Love BB, Gordon DL, Marsh EE 3rd. Classification of subtype of acute ischemic stroke. Definitions for use in a multicenter clinical trial. TOAST. Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment. *Stroke*. 1993;24:35-41.

Agnati LF, Zoli M, Kurosawa M, Benfenati F, Biagini G, Zini I, Hallstrom A, Ungerstedt U, Toffano G, Fuxe K. A new model of focal brain ischemia based on the intracerebral injection of endothelin-1. *Italian J Neurol Sci*. 1991;12:49–53.

Ahnstedt H, Mostajeran M, Blixt FW, Warfvinge K, Ansar S, Krause DN, Edvinsson L. U0126 attenuates cerebral vasoconstriction and improves long-term neurologic outcome after stroke in female rats. *J Cereb Blood Flow Metab* 2015;35:454-460.

Akdemir G, Luer MS, Dujovny M, Misra M. Intraventricular atrial natriuretic peptide for acute intracranial hypertension. *Neurol Res* 1997;19:515-520.

Alexander SPH, Mathie A, Peters JA. Guide to Receptors and Channels (GRAC), 5th edition. *Br J Pharmacol* 2011;164:S1–S324.

Amarenco P, Bogousslavsky J, Caplan LR, Donnan GA, Wolf ME, Hennerici MG. The ASCOD phenotyping of ischemic stroke (Updated ASCO Phenotyping). *Cerebrovasc Dis*. 2013;36: 1–5.

Andrew PS, Kaufman S. Guanylyl cyclase mediates ANP-induced vasoconstriction of murine splenic vessels. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2003;284: R1567-71.

Ay H, Benner T, Arsava EM, Furie KL, Singhal AB, Jensen MB, Ayata C, Towfighi A, Smith EE, Chong JY, Koroshetz WJ, Sorensen AG. A computerized algorithm for etiologic classification of ischemic stroke: the Causative Classification of Stroke System. *Stroke.* 2007;38:2979-84.

Bache RJ, Dai XZ, Schwartz JS, Chen DG. Effects of atrial natriuretic peptide in the canine coronary circulation. *Circ Res* 1988; 62:178-183.

Bamford J, Sandercock P, Dennis M, Burn J, Warlow C. Classification and natural history of clinically identifiable subtypes of cerebral infarction. *Lancet.* 1991;337:1521–26.

Berntsson J, Zia E, Borné Y, Melander O, Hedblad B, Engström G. Plasma natriuretic peptides and incidence of subtypes of ischemic stroke. *Cerebrovasc Dis.* 2014;37:444-450.

Bertoluci MC, Cé GV, da Silva AM, Wainstein MV, Boff W, Puñales M. Endothelial dysfunction as a predictor of cardiovascular disease in type 1 diabetes. *World J Diabetes.* 2015;6:679-92.

Bhatraju P, Crawford J, Hall M, Lang JD Jr. Inhaled nitric oxide: Current clinical concepts. *Nitric Oxide.* 2015;50:114-128.

Bianchi C, Gutkowska J, Ballak M, Thibault G, Garcia R, Genest J, Cantin M. Radioautographic localization of ¹²⁵I-atrial natriuretic factor binding sites in the brain. *Neuroendocrinology*. 1986; 44: 365-72.

Blanco M, Castillo J. Stroke in 2012: Major advances in the treatment of stroke. *Nat Rev Neurol*. 2013;9:68-70.

Brunner F, Wölkart G. Endothelial NO/cGMP system contributes to natriuretic peptide-mediated coronary and peripheral vasodilation. *Microvasc Res*. 2001; 61: 102-10.

Burg ED, Remillard CV, Yuan JX. K⁺ channels in apoptosis. *J Membr Biol* 2006; 209:3-20.

Callaway JK, Knight MJ, Watkins DJ, Beart PM, Jarrott B. Delayed treatment with AM-36, a novel neuroprotective agent, reduces neuronal damage after endothelin-1-induced middle cerebral artery occlusion in conscious rats. *Stroke*. 1999;30:2704–12.

Candelario-Jalil E. Injury and repair mechanisms in ischemic stroke: considerations for the development of novel neurotherapeutics. *Curr Opin Investig Drugs*. 2009;10:644-54.

Cao LH, Yang XL. Natriuretic peptides and their receptors in the central nervous system. *Prog Neurobiol*. 2008;84:234-248.

Caramelo C, Fernandez-Cruz A, Villamediana LM, Sanz E, Rodriguez-Puyol D, Hernando L, López-Novoa JM. Systemic and regional

haemodynamic effects of a synthetic atrial natriuretic peptide in conscious rats. *Clin Sci (Lond)*. 1986; 71: 323-5.

Centeno JM, Marrachelli VG, Miranda L, Castelló-Ruiz M, Burguete MC, Jover-Mengual T, Salom JB, Torregrosa G, Miranda FJ, Alborch E. Involvement of prostacyclin and potassium channels in the diabetes-induced hyporeactivity of the rabbit carotid artery to B-type natriuretic peptide. *Eur J Pharmacol*. 2013;701: 159-67.

Chamorro Á, Dirnagl U, Urra X, Planas AM. Neuroprotection in acute stroke: targeting excitotoxicity, oxidative and nitrosative stress, and inflammation. *Lancet Neurol*. 2016;15: 869–81.

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

Chaudhuri A. Vascular reactivity in diabetes mellitus. *Curr Diab Rep*. 2002;2: 305-10.

Cheng Chew SB, Leung PY, Fiscus RR. Preincubation with atrial natriuretic peptide protects NG108-15 cells against the toxic/proapoptotic effects of the nitric oxide donor S-nitroso- N-acetylpenicillamine. *Histochem Cell Biol* 2003;120:163-171.

Choi KC, Park HC, Lee J. Attenuated release of atrial natriuretic peptide and vasorelaxation in streptozotocin-induced diabetic rats. *J Korean Med Sci*. 1994;9:101-6.

Christophe M, Nicolas S (2006) Mitochondria: a target for neuroprotective interventions in cerebral ischemia-reperfusion. *Curr Pharm Des* 12:739-757.

Cohen ML, Schenck KW. Atriopeptin II: differential sensitivity of arteries and veins from the rat. *Eur J Pharmacol.* 1985; 108: 103-4.

Collins R, Reith C, Emberson J, Armitage J, Baigent C, Blackwell L, Blumenthal R, Danesh J, Smith GD, DeMets D, Evans S, Law M, MacMahon S, Martin S, Neal B, Poulter N, Preiss D, Ridker P, Roberts I, Rodgers A, Sandercock P, Schulz K, Sever P, Simes J, Smeeth L, Wald N, Yusuf S, Peto R. Interpretation of the evidence for the efficacy and safety of statin therapy. *Lancet.* 2016;388:2532-2561.

Crowell RM, Marcoux FW, DeGirolami U. Variability and reversibility of focal cerebral ischemia in unanesthetized monkeys. *Neurology.* 1981;31:1295–302.

De Paolis P, Nobili V, Lombardi A, Tarasi D, Barbato D, Marchitti S, Ganten U, Brunetti E, Volpe M, Rubattu S. Role of a molecular variant of rat atrial natriuretic Peptide gene in vascular remodeling. *Ann Clin Lab Sci* 2007; 37:135-140.

De Vito P. Atrial natriuretic peptide: an old hormone or a new cytokine? *Peptides.* 2014; 58:108-16.

Deprez I, Darmon ME, Hira M, Adam M, Sanquer S, Teiger E, Chetboul V, Eloit M, Adnot S, Pham I. Adenovirus-mediated transfer of the atrial

natriuretic peptide gene in rat pulmonary vascular smooth muscle cells leads to apoptosis. *J Lab Clin Med.* 2001;137:155-64.

Dineva J, Wojtowicz AK, Augustowska K, Vangelov I, Gregoraszczuk EL, Ivanova MD. Expression of atrial natriuretic peptide, progesterone, apoptosis-related proteins and caspase-3 in in vitro luteinized and leptin-treated porcine granulosa cells. *Endocr Regul* 2007;41:11-18.

Ding H, Triggle CR. Endothelial dysfunction in diabetes: multiple targets for treatment. *Pflugers Arch.* 2010;459: 977-94.

Dirnagl U, Endres M. Found in translation: preclinical stroke research predicts human pathophysiology, clinical phenotypes, and therapeutic outcomes. *Stroke.* 2014;45:1510-1518.

Domingueti CP, Dusse LM, Carvalho Md, de Sousa LP, Gomes KB, Fernandes AP. Diabetes mellitus: The linkage between oxidative stress, inflammation, hypercoagulability and vascular complications. *J Diabetes Complications.* 2016;30:738-45.

Dong DL, Bai YL, Cai BZ. Calcium-Activated Potassium Channels: Potential Target for Cardiovascular Diseases. *Adv Protein Chem Struct Biol.* 2016;104:233-61.

Doyle KP, Simon RP, Stenzel-Poore MP. Mechanisms of ischemic brain damage. *Neuropharmacology.* 2008;55:310-318.

Ellinsworth DC, Shukla N, Fleming I, Jeremy JY. Interactions between thromboxane A₂, thromboxane/prostaglandin (TP) receptors, and endothelium-derived hyperpolarization. *Cardiovasc Res.* 2014;102:9-16.

Elmore S. Apoptosis: A review of programmed cell death. *Toxicol Pathol.* 2007;35:495-516.

Ergul A, Kelly-Cobbs A, Abdalla M, Fagan SC. Cerebrovascular complications of diabetes: focus on stroke. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets.* 2012;12:148-58.

Faison EP, Siegl PK, Morgan G, Winquist RJ. Regional vasorelaxant selectivity of atrial natriuretic factor in isolated rabbit vessels. *Life Sci.* 1985;37: 1073-9.

Feigin VL, Forouzanfar MH, Krishnamurthi R, for the Global Burden of Diseases, Injuries, and Risk Factors Study 2010 (GBD 2010) and the GBD Stroke Experts Group.. Global and regional burden of stroke during 1990–2010: findings from the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet.* 2014;383: 245–54.

Feigin VL, Roth GA, Naghavi M, for the Global Burden of Diseases, Injuries and Risk Factors Study 2013 and Stroke Experts Writing Group.. Global burden of stroke and risk factors in 188 countries, during 1990–2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *Lancet Neurol.* 2016;15: 913–24.

Félétoú M, Huang Y, Vanhoutte P. Endothelium-mediated control of vascular tone: COX-1 and COX-2 products. *Br J Pharmacol.* 2011;164:894-912.

Félétoú M, Vanhoutte PM. EDHF: an update. *Cli Sci (Lond).* 2009;117:139-55.

Fischer M, Katan M, Morgenthaler NG, Seiler M, Müller B, Lackner P, Errath M, Helbok R, Pfausler B, Beer R, Schmutzhard E, Broessner G. The prognostic value of midregional proatrial natriuretic peptide in patients with hemorrhagic stroke. *Cerebrovasc Dis.* 2014;37:128-33.

Fiscus RR, Tu AW, Chew SB. Natriuretic peptides inhibit apoptosis and prolong the survival of serum-deprived PC12 cells. *Neuroreport.* 2001;12:185-189.

Fox G, Gallacher D, Shevde S, Loftus J, Swayne G. Anatomic variation of the middle cerebral artery in the Sprague-Dawley rat. *Stroke.* 1993;24:2087-92.

Garcia R, Thibault G, Cantin M, Genest J. Effect of a purified atrial natriuretic factor on rat and rabbit vascular strips and vascular beds. *Am J Physiol.* 1984; 247: R34-9.

Gardner DG, Chen S, Glenn DJ, Grigsby CL. Molecular biology of the natriuretic peptide system: implications for physiology and hypertension. *Hypertension.* 2007;49:419-26.

Garland CJ, Dora KA. EDH: endothelium-dependent hyperpolarization and microvascular signalling. *Acta Physiol (Oxf)*. 2017;219:152-161.

George PM, Steinberg GK. Novel Stroke Therapeutics: Unraveling Stroke Pathophysiology and Its Impact on Clinical Treatments. *Neuron*. 2015;87:297-309.

Gerwig T, Meissner H, Bilzer M, Kiemer AK, Arnholdt H, Vollmar AM, Gerbes AL. Atrial natriuretic peptide preconditioning protects against hepatic preservation injury by attenuating necrotic and apoptotic cell death. *J Hepatol*. 2003;39:341-8.

Ginsberg MD, Belayev L, Zhao W, Huh PW, Busto R. The acute ischemic penumbra: topography, life span, and therapeutic response. *Acta Neurochir Suppl*. 1999;73, 45–50.

Gokina NI, Bonev AD, Phillips J, Gokin AP, Veilleux K, Oppenheimer K, Goloman G. Impairment of IKCa channels contributes to uteroplacental endothelial dysfunction in rat diabetic pregnancy. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2015;309:H592-604.

Gollasch M. Vasodilator signals from perivascular adipose tissue. *Br J Pharmacol*. 2012;165:633-42.

Gruden G, Landi A, Bruno G. Natriuretic peptides, heart, and adipose tissue: new findings and future developments for diabetes research. *Diabetes Care*. 2014;37:2899-908.

Guo S, Barringer F, Zois NE, Goetze JP, Ashina M. Natriuretic peptides and cerebral hemodynamics. *Regul Pept.* 2014;192-193:15-23.

Guo S, Goetze JP, Jeppesen JL, Burnett JC, Olesen J, Jansen-Olesen I, Ashina M. Effect of natriuretic peptides on cerebral artery blood flow in healthy volunteers. *Peptides.* 2015;74:33-42.

Hafez S, Coucha M, Bruno A, Fagan SC, Ergul A. Hyperglycemia, acute ischemic stroke, and thrombolytic therapy. *Transl Stroke Res.* 2014;5:442-53.

Hankey GJ. *Stroke.* *Lancet.* 2017;389:641-654.

Hart RG, Diener HC, Coutts SB, Easton JD, Granger CB, O'Donnell MJ, Sacco RL, Connolly SJ; Cryptogenic Stroke/ESUS International Working Group.. Embolic strokes of undetermined source: the case for a new clinical construct. *Lancet Neurol.* 2014;13:429-38.

Hart RG, Pearce LA, Aguilar MI. Meta-analysis: antithrombotic therapy to prevent stroke in patients who have nonvalvular atrial fibrillation. *Ann Intern Med.* 2007;146: 857–67.

Hebert D, Lindsay MP, McIntyre A, Kirton A, Rumney PG, Bagg S, Bayley M, Dowlatshahi D, Dukelow S, Garnhum M, Glasser E, Halabi ML, Kang E, MacKay-Lyons M, Martino R, Rochette A, Rowe S, Salbach N, Semenko B, Stack B, Swinton L, Weber V, Mayer M, Verrilli S, DeVeber G, Andersen J, Barlow K, Cassidy C, Dilenge ME, Fehlings D, Hung R, Iruthayarajah J, Lenz L, Majnemer A, Purtzki J, Rafay M, Sonnenberg LK,

Townley A, Janzen S, Foley N, Teasell R. Canadian stroke best practice recommendations: Stroke rehabilitation practice guidelines, update 2015. *Int J Stroke*. 2016;11:459-84.

Heinisch BB, Vila G, Resl M, Riedl M, Dieplinger B, Mueller T, Luger A, Pacini G, Clodi M. B-type natriuretic peptide (BNP) affects the initial response to intravenous glucose: a randomised placebo-controlled cross-over study in healthy men. *Diabetologia*. 2012;55:1400-5.

Hodes A, Lichtstein D. Natriuretic hormones in brain function. *Front Endocrinol*. 2014;5:201.

Hong DH, Li H, Kim HW, Kim HS, Son YK, Yang SR, Park JR, Ha KS, Han ET, Hong SH, Firth AL, Na SH, Park WS. Alterations of voltage-dependent K⁺ channels in the mesenteric artery during the early and chronic phases of diabetes. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2016;43:808-17.

Horowitz JD, Chong CR, Ngo DT, Sverdllov AL. Effects of acute hyperglycaemia on cardiovascular homeostasis: does a spoonful of sugar make the flow-mediated dilatation go down? *J Thorac Dis*. 2015;7:E607-11.

Howells DW, Porritt MJ, Rewell SS, O'Collins V, Sena ES, van der Worp HB, Traystman RJ, Macleod MR. Different strokes for different folks: the rich diversity of animal models of focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2010;30:1412-31.

Huang C, Pollock CA, Chen XM. KCa3.1: a new player in progressive kidney disease. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2015;24:61-6.

Huang H, Al-Shabrawey M, Wang MH. Cyclooxygenase- and cytochrome P450-derived eicosanoids in stroke. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 2016;122:45-53.

Humphries ES, Dart C. Neuronal and Cardiovascular Potassium Channels as Therapeutic Drug Targets: Promise and Pitfalls. *J Biomol Screen.* 2015;20:1055-73.

Hwang M, Kim S. Type 2 diabetes: endothelial dysfunction and exercise. *J Exerc Nutr Biochem.* 2014;18:239-247.

Hyman AL, De Witt BJ, Gumusel B, Hao Q, Kadowitz PJ, Lipton HL. L-NAME enhances responses to atrial natriuretic peptide in the pulmonary vascular bed of the cat. *J Appl Physiol* 2001; 90:2101-2108.

Iida H, Iida M, Takenaka M, Oda A, Uchida M, Fujiwara H, Dohi S. The effects of alpha-human atrial natriuretic peptide and milrinone on pial vessels during blood-brain barrier disruption in rabbits. *Anesth Analg.* 2001; 93: 177-82.

Jackson WF. Potassium Channels in Regulation of Vascular Smooth Muscle Contraction and Growth. *Adv Pharmacol.* 2017; 78: 89-144.

Johansson SE, Larsen SS, Povlsen GK, Edvinsson L. Early MEK1/2 inhibition after global cerebral ischemia in rats reduces brain damage and improves outcome by preventing delayed vasoconstrictor receptor upregulation. *PLoS One* 2014;9:e92417.

Kang YJ, Zhou ZX, Wu H, Wang GW, Saari JT, Klein JB. Metallothionein inhibits myocardial apoptosis in copper-deficient mice: role of atrial natriuretic peptide. *Lab Invest.* 2000;80:745-57.

Katan M, Fluri F, Schuetz P, Morgenthaler NG, Zweifel C, Bingisser R, Kappos L, Steck A, Engelter ST, Müller B, Christ-Crain M. Midregional proatrial natriuretic peptide and outcome in patients with acute ischemic stroke. *J Am Coll Cardiol.* 2010;56:1045-1053.

Katan M, Moon YP, Paik MC, Mueller B, Huber A, Sacco RL, Elkind MS. Procalcitonin and midregional proatrial natriuretic peptide as markers of ischemic stroke: the Northern Manhattan study. *Stroke.* 2016;47:1714-1719.

Kawai Y, Ohhashi T. Heterogeneity in responses of isolated monkey arteries and veins to atrial natriuretic peptide. *Can J Physiol Pharmacol.* 1989; 67: 326-30.

Kerkelä R, Ulvila J, Magga J. Natriuretic Peptides in the Regulation of Cardiovascular Physiology and Metabolic Events. *J Am Heart Assoc.* 2015; 4: e002423.

Kernan WN, Viscoli CM, Furie KL, Young LH, Inzucchi SE, Gorman M, Guarino PD, Lovejoy AM, Peduzzi PN, Conwit R, Brass LM, Schwartz GG, Adams HP Jr, Berger L, Carolei A, Clark W, Coull B, Ford GA, Kleindorfer D, O'Leary JR, Parsons MW, Ringleb P, Sen S, Spence JD, Tanne D, Wang D,

Winder TR; IRIS Trial Investigators. Pioglitazone after Ischemic Stroke or Transient Ischemic Attack. *N Engl J Med*. 2016;374:1321-31.

Kim SF. The role of nitric oxide in prostaglandin biology; update. *Nitric Oxide*. 2011;25:255-64.

King A, Bowe J. Animal models for diabetes: Understanding the pathogenesis and finding new treatments. *Biochem Pharmacol*. 2016;99:1-10.

Kizub IV, Klymenko KI, Soloviev AI. Protein kinase C in enhanced vascular tone in diabetes mellitus. *Int J Cardiol*. 2014 Jun 15;174:230-42.

Ko EA, Han J, Jung ID, Park WS. Physiological roles of K⁺ channels in vascular smooth muscle cells. *J Smooth Muscle Res*. 2008; 44: 65-81.

Koh SH, Lo EH. The Role of the PI3K Pathway in the Regeneration of the Damaged Brain by Neural Stem Cells after Cerebral Infarction. *J Clin Neurol*. 2015;11:297-304.

Koizumi J, Yoshida Y, Nakazawa T, Ooneda G. Experimental studies of ischemic brain edema. 1. A new experimental model of experimental embolism in rats in which recirculation can be reintroduced in the ischemic area. *Jpn J Stroke*. 1986;8:1-8.

Komarek M, Bernheim A, Schindler R, Steden R, Kiowski W, Brunner-La Rocca HP. Vascular effects of natriuretic peptides in healthy men. *J Cardiovasc Pharmacol Ther*. 2004;9: 263-70.

Kruuse C, Rybalkin SD, Khurana TS, Jansen-Olesen I, Olesen J, Edvinsson L. The role of cGMP hydrolysing phosphodiesterases 1 and 5 in cerebral artery dilatation. *Eur J Pharmacol.* 2001; 420: 55-65.

Kubo M, Nakaya Y, Matsuoka S, Saito K, Kuroda Y. Atrial natriuretic factor and isosorbide dinitrate modulate the gating of ATP-sensitive K⁺ channels in cultured vascular smooth muscle cells. *Circ Res.* 1994; 74: 471-6.

Kulhanek-Heinze S, Gerbes AL, Gerwig T, Vollmar AM, Kiemer AK. Protein kinase A dependent signalling mediates anti-apoptotic effects of the atrial natriuretic peptide in ischemic livers. *J Hepatol.* 2004;41:414-20.

Kuribayashi K, Kitaoka Y, Kumai T, Munemasa Y, Kitaoka Y, Isenoumi K, Motoki M, Kogo J, Hayashi Y, Kobayashi S, Ueno S. Neuroprotective effect of atrial natriuretic peptide against NMDA-induced neurotoxicity in the rat retina. *Brain Res.* 2006;1071:34-41.

Lai TW, Zhang S, Wang YT. Excitotoxicity and stroke: identifying novel targets for neuroprotection. *Prog Neurobiol.* 2014;115:157-88.

Lenzen S. The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes. *Diabetologia.* 2008;51:216-26.

Levin ER, Frank HJ, Weber MA, Ismail M, Mills S. Studies of the penetration of the blood brain barrier by atrial natriuretic factor. *Biochem Biophys Res Commun.* 1987; 147: 1226-31.

Levin ER, Gardner DG, Samson WK. Natriuretic peptides. *The New Engl J Med.* 1998;339:321-8.

Liu Y, Xie A, Singh AK, Ehsan A, Choudhary G, Dudley S, Sellke FW, Feng J. Inactivation of Endothelial Small/Intermediate Conductance of Calcium-Activated Potassium Channels Contributes to Coronary Arteriolar Dysfunction in Diabetic Patients. *J Am Heart Assoc.* 2015;4:e002062.

Lo EH, Dalkara T, Moskowitz MA. Mechanisms, challenges and opportunities in stroke. *Nat Rev Neurosci.* 2003;4:399-415.

Loader J, Montero D, Lorenzen C, Watts R, Méziat C, Reboul C, Stewart S, Walther G. Acute Hyperglycemia Impairs Vascular Function in Healthy and Cardiometabolic Diseased Subjects: Systematic Review and Meta-Analysis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2015;35:2060-72.

Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, Cummins R. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *Stroke.* 1989;20:84-91.

Luitse MJ, Biessels GJ, Rutten GE, Kappelle LJ. Diabetes, hyperglycaemia, and acute ischaemic stroke. *Lancet Neurol.* 2012;11:261-71.

Luo W, Liu B, Zhou Y. The endothelial cyclooxygenase pathway: Insight from mouse arteries. *Eur J Pharmacol.* 2016; 780:148-58.

Ma J, Yu W, Wang Y, Cao G, Cai S, Chen X, Yan N, Yuan Y, Zeng H, Fleenor DL, Liu X, Pang IH. Neuroprotective effects of C-type natriuretic peptide on rat retinal ganglion cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2010;5:3544-3553.

Macrae IM, Graham DI, McCulloch J. Vasomotor effects of atrial natriuretic peptides on feline pial arterioles. *Brain Res.* 1987; 435: 195-201.

Madhani M, Scotland RS, MacAllister RJ, Hobbs AJ. Vascular natriuretic peptide receptor-linked particulate guanylate cyclases are modulated by nitric oxide-cyclic GMP signalling. *Br J Pharmacol.* 2003;139:1289-96.

Madhani M, Okorie M, Hobbs AJ, MacAllister RJ. Reciprocal regulation of human soluble and particulate guanylate cyclases in vivo. *Br J Pharmacol.* 2006;149:797-801.

Mahinrad S, de Craen AJ, Yasar S, van Heemst D, Sabayan B. Natriuretic peptides in the central nervous system: Novel targets for cognitive impairment. *Neurosci Biobehav Rev.* 2016;68:148-156.

Mäkikallio AM, Mäkikallio TH, Korpelainen JT, Vuolteenaho O, Tapanainen JM, Ylitalo K, Sotaniemi KA, Huikuri HV, Myllylä VV. Natriuretic peptides and mortality after stroke. *Stroke.* 2005;36:1016-1020.

Maljevic S, Lerche H. Potassium channels: a review of broadening therapeutic possibilities for neurological diseases. *J Neurol.* 2013;260:2201-11.

Manea MM, Comsa M, Minca A, Dragos D, Popa C. Brain-heart axis— Review Article. *J Med Life*. 2015;8:266-71.

Marin-Grez M, Fleming JT, Steinhausen M. Atrial natriuretic peptide causes pre-glomerular vasodilatation and post-glomerular vasoconstriction in rat kidney. *Nature*. 1986;324: 473-6.

Markgraf CG, Kraydieh S, Prado R, Watson BD, Dietrich WD, Ginsberg MD. Comparative histopathologic consequences of photothrombotic occlusion of the distal middle cerebral artery in Sprague-Dawley and Wistar rats. *Stroke*. 1993;24:286–92.

Marrachelli VG, Centeno JM, Miranda I, Castelló-Ruiz M, Burguete MC, Jover-Mengual T, Salom JB, Torregrosa G, Miranda FJ, Alborch E. Diabetes impairs the atrial natriuretic peptide relaxant action mediated by potassium channels and prostacyclin in the rabbit renal artery. *Pharmacol Res*. 2012;66:392-400.

Marrachelli VG, Miranda FJ, Centeno JM, Miranda I, Castelló-Ruiz M, Burguete MC, Jover-Mengual T, Salom JB, Torregrosa G, Alborch E. Mechanisms underlying the diabetes-induced hyporeactivity of the rabbit carotid artery to atrial natriuretic peptide. *Pharmacol Res*. 2011;63: 190-8.

Matsumoto T, Goulopolou S, Taguchi K, Tostes R, Kobayashi T. Constrictor prostanoids and uridine adenosine tetraphosphate: vascular mediators and therapeutic targets in hypertension and diabetes. 2015a;172:3980-4001.

Matsumoto T, Watanabe S, Yamada K, Ando M, Iguchi M, Taguchi K, Kobayashi T. Relaxation Induced by Atrial Natriuretic Peptide Is Impaired in Carotid but Not Renal Arteries from Spontaneously Hypertensive Rats Due to Reduced BKCa Channel Activity. *Biol Pharm Bull.* 2015b; 38: 1801-8.

McKenna K, Smith D, Sherlock M, Moore K, O'Brien E, Tormey W, Thompson CJ. Elevated plasma concentrations of atrial and brain natriuretic peptide in type 1 diabetic subjects. *Ir J Med Sci.* 2005;174:53-7.

McKenna K, Smith D, Tormey W, Thompson CJ. Acute hyperglycaemia causes elevation in plasma atrial natriuretic peptide concentrations in Type 1 diabetes mellitus. *Diabet Med.* 2000;17:512-7.

McKenzie JC, Cowie RJ, Inagami T. ANP-like immunoreactivity in neuronal perikarya and processes associated with vessels of the pia and cerebral parenchyma in dog. *Neurosci Lett.* 1990; 117: 253-8.

Misono KS, Philo JS, Arakawa T, Ogata CM, Qiu Y, Ogawa H, Young H. Structure, signaling mechanism and regulation of the natriuretic peptide receptor guanylate cyclase. *FEBS J.* 2011;278:1818-29.

Mitchell JA, Ahmetaj-Shala B, Kirkby NS, Wright WR, Mackenzie LS, Reed DM, Mohamed N. Role of prostacyclin in pulmonary hypertension. *Glob Cardiol Sci Pract.* 2014;2014:382-93.

Mons U, Müezzini A, Gellert C, Schöttker B, Abnet CC, Bobak M, de Groot L, Freedman ND, Jansen E, Kee F, Kromhout D, Kuulasmaa K, Laatikainen T, O'Doherty MG, Bueno-de-Mesquita B, Orfanos P, Peters A,

van der Schouw YT, Wilsgaard T, Wolk A, Trichopoulou A, Boffetta P, Brenner H; CHANCES Consortium. Impact of smoking and smoking cessation on cardiovascular events and mortality among older adults: meta-analysis of individual participant data from prospective cohort studies of the CHANCES consortium. *BMJ*. 2015;350:h1551.

Morand EF, Leech M. Hypothalamic-pituitary-adrenal axis regulation of inflammation in rheumatoid arthritis. *Immunol Cell Biol*. 2001;79:395–9.

Mori Y, Takayasu M, Suzuki Y, Shibuya M, Yoshida J, Hidaka H. Vasodilator effects of C-type natriuretic peptide on cerebral arterioles in rats. *Eur J Pharmacol*. 1997;320: 183-6.

Moritoki H, Yoshikawa T, Hisayama T, Takeuchi S. Possible mechanisms of age-associated reduction of vascular relaxation caused by atrial natriuretic peptide. *Eur J Pharmacol*. 1992;210: 61-8.

Nakao N, Itakura T, Yokote H, Nakai K, Komai N. Effect of atrial natriuretic peptide on ischemic brain edema: changes in brain water and electrolytes. *Neurosurgery*. 1990;27:39-43.

Nakayama T. The genetic contribution of the natriuretic peptide system to cardiovascular diseases. *Endocr J*. 2005;52:11-21.

Nannipieri M, Seghieri G, Catalano C, Prontera T, Baldi S, Ferrannini E. Defective regulation and action of atrial natriuretic peptide in type 2 diabetes. *Horm Metab Res*. 2002;34:265-270.

Naruse S, Aoki Y, Takei R, Horikawa Y, Ueda S. Effects of atrial natriuretic peptide on ischemic brain edema in rats evaluated by proton magnetic resonance method. *Stroke*. 1991;22:61-65.

Nichols CG, Singh GK, Grange DK. KATP channels and cardiovascular disease: suddenly a syndrome. *Circ Res*. 2013;112:1059-72.

Nicotera P, Leist M, Fava E, Berliocchi L, Volbracht C. Energy requirement for caspase activation and neuronal cell death. *Brain Pathol*. 2000;10:276–282.

Nieves-Cintrón M, Nystoriak MA, Prada MP, Johnson K, Fayer W, Dell'Acqua ML, Scott JD, Navedo MF. Selective down-regulation of KV2.1 function contributes to enhanced arterial tone during diabetes. *J Biol Chem*. 2015;290:7918-29.

Nogami M, Shiga J, Takatsu A, Endo N, Ishiyama I. Immunohistochemistry of atrial natriuretic peptide in brain infarction. *Histochem J*. 2001;33:87-90.

Nystoriak MA, Nieves-Cintrón M, Nygren PJ, Hinke SA, Nichols CB, Chen CY, Puglisi JL, Izu LT, Bers DM, Dell'acqua ML, Scott JD, Santana LF, Navedo MF. AKAP150 contributes to enhanced vascular tone by facilitating large-conductance Ca²⁺-activated K⁺ channel remodeling in hyperglycemia and diabetes mellitus. *Circ Res*. 2014;114:607-15.

O'Brien MD, Waltz AG. Transorbital approach for occluding the middle cerebral artery without craniectomy. *Stroke*. 1973;4:201–6.

Obineche E, Chandranath I, Adeghate E, Benedict S, Fahim M, Adem A. Alterations in atrial natriuretic peptide and its receptors levels in long-term, streptozotocin-induced, diabetes in rats. *Ann NY Acad Sci.* 2006;1084:223-34.

O'Donnell MJ, Chin SL, Rangarajan S, Xavier D, Liu L, Zhang H, Rao-Melacini P, Zhang X, Pais P, Agapay S, Lopez-Jaramillo P, Damasceno A, Langhorne P, McQueen MJ, Rosengren A, Dehghan M, Hankey GJ, Dans AL, Elsayed A, Avezum A, Mondo C, Diener HC, Ryglewicz D, Czlonkowska A, Pogosova N, Weimar C, Iqbal R, Diaz R, Yusoff K, Yusufali A, Oguz A, Wang X, Penaherrera E, Lanas F, Ogah OS, Ogunniyi A, Iversen HK, Malaga G, Rumboldt Z, Oveisgharan S, Al Hussain F, Magazi D, Nilanont Y, Ferguson J, Pare G, Yusuf S; INTERSTROKE investigators. Global and regional effects of potentially modifiable risk factors associated with acute stroke in 32 countries (INTERSTROKE): a case-control study. *Lancet.* 2016;20;388:761-75.

Okamura T, Inoue S, Toda N. Action of atrial natriuretic peptide (ANP) on dog cerebral arteries: evidence that neurogenic relaxation is not mediated by release of ANP. *Br J Pharmacol.* 1989; 97: 1258-64.

Oliff HS, Weber E, Eilon G, Marek P. The role of strain/vendor differences on the outcome of focal ischemia induced by intraluminal middle cerebral artery occlusion in the rat. *Brain Res.* 1995;675:20-6.

Oliveira-Paula GH, Lacchini R, Tanus-Santos JE. Endothelial nitric oxide synthase: From biochemistry and gene structure to clinical implications of NOS3 polymorphisms. *Gene*. 2016;575:584-99.

Orasanu G, Plutzky J. The pathologic continuum of diabetic vascular disease. *J Am Coll Cardiol*. 2009;53:S35-42.

Ortola FV, Ballermann BJ, Anderson S, Mendez RE, Brenner BM. Elevated plasma atrial natriuretic peptide levels in diabetic rats. *J Clin Invest*. 1987;80:670-4.

Osol G, Halpern W, Tesfamariam B, Nakayama K, Weinberg D. Synthetic atrial natriuretic factor does not dilate resistance-sized arteries. *Hypertension*. 1986; 8: 606-10.

Otsuka K, Tanaka H, Horinouchi T, Koike K, Shigenobu K, Tanaka Y. Functional contribution of voltage-dependent and Ca²⁺ activated K⁺ (BK(Ca)) channels to the relaxation of guinea-pig aorta in response to natriuretic peptides. *J Smooth Muscle Res*. 2002; 38: 117-29.

Pandey KN. Emerging roles of natriuretic peptides and their receptors in pathophysiology of hypertension and cardiovascular regulation. *J Am Soc Hypertens*. 2008;2:210-26.

Pandey KN. Guanylyl cyclase/atrial natriuretic peptide receptor-A: role in the pathophysiology of cardiovascular regulation. *Can J Physiol Pharmacol*. 2011;89:557-73.

Pekna M, Pekny M, Nilsson M. Modulation of Neural Plasticity as a Basis for Stroke Rehabilitation. *Stroke*. 2012;43:2819-2828.

Pereira NL, Tosakulwong N, Scott CG, Jenkins GD, Prodduturi N, Chai Y, Olson TM, Rodeheffer RJ, Redfield MM, Weinshilboum RM, Burnett JC Jr. Circulating ANP Genetic Association Study Identifies a Novel Gene Cluster Associated with Stroke in Caucasians. *Circ Cardiovasc Genet*. 2015;8:141-9.

Peters SA, Huxley RR, Woodward M. Diabetes as a risk factor for stroke in women compared with men: a systematic review and meta-analysis of 64 cohorts, including 775 385 individuals and 12 539 strokes. *Lancet*. 2014;383: 1973–80.

Petkov GV. Ion channels (chapter 16). En: *Pharmacology, Principles and Practice*. Miles Hacker, William Messer and Kenneth Bachmann (Eds.). Elsevier Inc. 2009.

Pinzón CE, Serrano ML, Sanabria MC. Role of phosphatidylinositol 3-kinase pathway (PI3K/Akt) in humans. *Rev. Cienc. Salud*. Bogotá. 2009;7:47-66.

Plotnikov A, Zehorai E, Procaccia S, Seger R. The MAPK cascades: Signaling components, nuclear roles and mechanisms of nuclear translocation. *Biochimica and Biophysica acta*. 2011; 1813:1619-1633.

Poggesi A, Pasi M, Pescini F, Pantoni L, Inzitari D. Circulating biologic markers of endothelial dysfunction in cerebral small vessel disease: a review. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2016;36:72-94.

Pollock A, Baer G, Campbell P, Choo PL, Forster A, Morris J, Pomeroy VM, Langhorne P. Physical rehabilitation approaches for the recovery of function and mobility following stroke. *Cochrane Database Syst Rev*. 2014;CD001920.

Poredos P, Jezovnik MK. Testing endothelial function and its clinical relevance. *J Atheroscler Thromb*. 2013;20:1-8.

Potter LR, Abbey-Hosch S, Dickey DM. Natriuretic peptides, their receptors, and cyclic guanosine monophosphate-dependent signaling functions. *Endocr Rev* 2006; 27:47-72.

Potter LR. Natriuretic peptide metabolism, clearance and degradation. *FEBS J*. 2011;278:1808-17.

Prabhakaran S, Ruff I, Bernstein RA. Acute Stroke Intervention. A Systematic Review. *JAMA*. 2015;313:1451-1462.

Pradeep H, Diya JB, Shashikumar S, Rajanikant GK. Oxidative stress—assassin behind the ischemic stroke. *Folia Neuropathol*. 2012;50(3):219-30.

Qian L, Liu X, Wang R. Role of BKCa channels in diabetic vascular complications. *Chin Med J (Engl)*. 2014;127:1775-81.

Raman G, Moorthy D, Hadar N, Dahabreh IJ, O'Donnell TF, Thaler DE, Feldmann E, Lau J, Kitsios GD. Management strategies for asymptomatic carotid stenosis: a systematic review and meta-analysis. *Ann Intern Med*. 2013;158:676-85.

Rankin AJ, Wilson N, Ledsoe JR. Influence of isoproterenol on plasma immunoreactive atrial natriuretic peptide and plasma vasopressin in the anesthetized rabbit. *Pflugers Arch.* 1987; 408: 124-8.

Rees DA, Alcolado JC. Animal models of diabetes mellitus. *Diabet Med.* 2005;22:359-70.

Rosenberg GA, Estrada EY. Atrial natriuretic peptide blocks hemorrhagic brain edema after 4-hour delay in rats. *Stroke.* 1995;26:874-877.

Rubattu S, Lee-Kirsch MA, DePaolis P, Giliberti R, Gigante B, Lombardi A, Volpe M, Lindpaintner K. Altered structure, regulation, and function of the gene encoding the atrial natriuretic peptide in the stroke-prone spontaneously hypertensive rat. *Circ Res.* 1999;85:900-5.

Rubattu S, Stanzione R, Di Angelantonio E, Zanda B, Evangelista A, Tarasi D, Gigante B, Pirisi A, Brunetti E, Volpe M. Atrial natriuretic peptide gene polymorphisms and risk of ischemic stroke in humans. *Stroke.* 2004;35:814-818.

Sabrane K, Kruse MN, Gazinski A, Kuhn M. Chronic endothelium-dependent regulation of arterial blood pressure by atrial natriuretic peptide: role of nitric oxide and endothelin-1. *Endocrinology* 2009; 150:2382-2387.

Sacco RL, Kasner SE, Broderick JP, Caplan LR, Connors JJ, Culebras A, Elkind MS, George MG, Hamdan AD, Higashida RT, Hoh BL, Janis LS, Kase

CS, Kleindorfer DO, Lee JM, Moseley ME, Peterson ED, Turan TN, Valderrama AL, Vinters HV; American Heart Association Stroke Council, Council on Cardiovascular Surgery and Anesthesia.; Council on Cardiovascular Radiology and Intervention.; Council on Cardiovascular and Stroke Nursing.; Council on Epidemiology and Prevention.; Council on Peripheral Vascular Disease.; Council on Nutrition, Physical Activity and Metabolism.. An updated definition of stroke for the 21st century: a statement for healthcare professionals from the American Heart Association/American Stroke Association. *Stroke*. 2013;44(7):2064-89.

Saito Y. Roles of atrial natriuretic peptide and its therapeutic use. *J Cardiol*. 2010; 56: 262-70.

Salazar FJ, Bolterman R, Fiksen-Olsen MJ, Quesada T, Romero JC. Role of prostaglandins in mediating the renal effects of atrial natriuretic factor. *Hypertension* 1988; 12:274-278.

Sawe N, Steinberg G, Zhao H. Dual roles of the MAPK/ERK1/2 cell signaling pathway after stroke. *J Neurosci Res* 2008;86:1659-1669.

Schach C, Resch M, Schmid PM, Riegger GA, Endemann DH. Type 2 diabetes: increased expression and contribution of IKCa channels to vasodilation in small mesenteric arteries of ZDF rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2014;307:H1093-102.

Schlueter N, de Sterke A, Willmes DM, Spranger J, Jordan J, Birkenfeld AL. Metabolic actions of natriuretic peptides and therapeutic potential in the metabolic syndrome. *Pharmacol Ther.* 2014;144:12-27.

Song W, Wang H, Wu Q. Atrial Natriuretic Peptide in Cardiovascular Biology and Disease (NPPA). *Gene.* 2015; 569: 1-6.

Sorensen CM, Braunstein TH, Holstein-Rathlou NH, Salomonsson M. Role of vascular potassium channels in the regulation of renal hemodynamics. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2012;302:F505-18.

Spratt NJ, Fernandez J, Chen M, Rewell S, Cox S, van Raay L, Hogan L, Howells DW. Modification of the method of thread manufacture improves stroke induction rate and reduces mortality after thread-occlusion of the middle cerebral artery in young or aged rats. *J Neurosci Methods.* 2006;155:285–90.

Stitham J, Hwa J. Prostacyclin, Atherothrombosis and Diabetes Mellitus: Physiologic and Clinical Considerations. *Curr Mol Med.* 2016;16:328-42.

Sugamori T, Ishibashi Y, Shimada T, Sakane T, Takahashi N, Ohata S, Kodani N, Kunizawa Y, Inoue S, Ohta Y, Nakamura K, Shimizu H, Katoh H, Murakami Y. Nitric oxide-mediated vasodilatory effect of atrial natriuretic peptide in forearm vessels of healthy humans. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2002; 29:92-97.

Sun HS, Feng ZP. Neuroprotective role of ATP-sensitive potassium channels in cerebral ischemia. *Acta Pharmacol Sin.* 2013;34:24-32.

Sun J, Nan G. The mitogen-activated protein kinase (MAPK) signaling pathway as a discovery target in stroke. *J Mol Neurosci* 2016; 59: 90-98.

Sutherland BA, Neuhaus AA, Couch Y, Balami JS, DeLuca GC, Hadley G, Harris SL, Grey AN, Buchan AM. The transient intraluminal filament middle cerebral artery occlusion model as a model of endovascular thrombectomy in stroke. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2016;36:363-9.

Tamaki K, Saku Y, Ogata J. Effects of angiotensin and atrial natriuretic peptide on the cerebral circulation. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1992; 12: 318-25.

Tamura A, Asano T, Sano K, Tsumagari T, Nakajima A. Protection from cerebral ischemia by a new imidazole derivative (Y-9179) and pentobarbital. A comparative study in chronic middle cerebral artery occlusion in cats. *Stroke.* 1979;10:126–34.

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

Tanaka Y, Aida M, Tanaka H, Shigenobu K, Toro L. Involvement of maxi-K(Ca)channel activation in atrial natriuretic peptide-induced vasorelaxation. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 1998; 357: 705-8.

Tanaka Y, Tang G, Takizawa K, Otsuka K, Eghbali M, Song M, Nishimaru K, Shigenobu K, Koike K, Stefani E, Toro L. Kv channels contribute to nitric oxide- and atrial natriuretic peptide-induced relaxation of a rat conduit artery. *J Pharmacol Exp Ther.* 2006; 317: 341-54

Terasaki Y, Liu Y, Hayakawa K, Pham LD, Lo EH, Ji X, Arai K. Mechanisms of neurovascular dysfunction in acute ischemic brain. *Curr Med Chem.* 2014;21:2035-42.

Valverde J, Martínez-Ródenas F, Pereira JA, Carulla X, Jiménez W, Gubern JM, Sitges-Serra A. Rapid increase in plasma levels of atrial natriuretic peptide after common bile duct ligation in the rabbit. *Ann Surg.* 1992; 216: 554-9.

van der Zander K, Houben AJ, Kroon AA, de Leeuw PW. Effects of brain natriuretic peptide on forearm vasculature: comparison with atrial natriuretic peptide. *Cardiovasc Res.* 1999; 44: 595-600.

Wang J, Wan R, Mo Y, Zhang Q, Sherwood LC, Chien S. Creating a long-term diabetic rabbit model. *Exp Diab Res.* 2010; 2010:289614.

Welsh P, McMurray JJ. B-type natriuretic peptide and glycaemia: an emerging cardiometabolic pathway? *Diabetologia.* 2012;55:1240-1243.

Wengenmayer C, Krikov M, Mueller S, Lucht K, Villringer A, Hoher B, Unger T, Thoene-Reineke C. Novel therapy approach in primary stroke prevention: simultaneous inhibition of endothelin converting enzyme and

neutral endopeptidase in spontaneously hypertensive, stroke-prone rats improves survival. *Neurol Res.* 2011;33:201-7.

Wiggins AK, Shen PJ, Gundlach AL. Atrial natriuretic peptide expression is increased in rat cerebral cortex following spreading depression: possible contribution to sd-induced neuroprotection. *Neuroscience.* 2003;118:715-726.

Winquist RJ, Faison EP, Nutt RF. Vasodilator profile of synthetic atrial natriuretic factor. *Eur J Pharmacol.* 1984; 102: 169-73.

Winquist RJ, Hintze TH. Mechanisms of atrial natriuretic factor-induced vasodilation. *Pharmacol Ther.* 1990; 48: 417-26.

Wu CF, Bishopric NH, Pratt RE. Atrial natriuretic peptide induces apoptosis in neonatal rat cardiac myocytes. *J Biol Chem* 1997;272:14860-14866.

Xie X, Atkins E, Lv J, et al. Effects of intensive blood pressure lowering on cardiovascular and renal outcomes: updated systematic review and meta-analysis. *Lancet.* 2016;387: 435–43.

Xing C, Arai K, Lo EH, Hommel M. Pathophysiologic cascades in ischemic stroke. *Int J Stroke.* 2012;7:378-85.

Xu RS. Pathogenesis of diabetic cerebral vascular disease complication. *World J Diabetes.* 2015;6:54-66.

Yeğen E, Akçay F, Yiğitoğlu MR, Celik I, Suzek H, Odabaşioğlu F. Plasma atrial natriuretic peptide levels in rabbits with alloxan monohydrate-induced diabetes mellitus. *Jpn Heart J.* 1995;36:789-95.

Yu SP, Choi DW. Ions, cell volume, and apoptosis. *Proc. Natl Acad. Sci.* 2000;97:9360–9362.

Yu SP, Yeh C, Strasser U, Tian M, Choi DW. NMDA receptor-mediated K⁺ efflux and neuronal apoptosis. *Science.* 1999;284:336–339.

Yuan J, Yanker BY. Apoptosis in the nervous system. *Nature.* 2000;407:802–809.

Zhang C, Qin YY, Chen Q, Jiang H, Chen XZ, Xu CL, Mao PJ, He J, Zhou YH. Alcohol intake and risk of stroke: a dose-response meta-analysis of prospective studies. *Int J Cardiol.* 2014;174:669-77.

Zhao EY, Efendizade A, Cai L, Ding Y. The role of Akt (protein kinase B) and A dependent signalling mediates anti-apoptotic effects of the atrial natriuretic peptide in ischemic livers. *J Hepatol* 2004;41:414-20.

Zhao LM, Su XL, Wang Y, Li GR, Deng XL. KCa3.1 channels mediate the increase of cell migration and proliferation by advanced glycation end products in cultured rat vascular smooth muscle cells. *Lab Invest.* 2013;93:159-67.

Zhao Y, Vanhoutte PM, Leung SW. Vascular nitric oxide: Beyond eNOS. *J Pharmacol Sci.* 2015;129:83-94.

