



UNIVERSITAT DE VALÈNCIA

PROGRAMA DE DOCTORADO EN FISIOLÒGIA

TESIS DOCTORAL

**EVALUACIÓN DEL POTENCIAL NEUROPROTECTOR DEL MODULADOR SELECTIVO
DE LOS RECEPTORES ESTROGÉNICOS, BAZEDOXIFENO, EN UN MODELO ANIMAL
DE ICTUS ISQUÉMICO CON REPERFUSIÓN: INFLUENCIA DE LA DIABETES**

Presentada por:

ALICIA ALIENA VALERO

Dirigida por:

- Dra. M. Consuelo Burguete López
- Dra. María Castelló Ruiz
- Dra. Teresa Jover Mengual

Julio 2019

Dña. **M. Consuelo Burguete López**, Profesor Contratado Doctor del Dpto. de Fisiología de la Universitat de València,

Dña. **María Castelló Ruiz**, Profesor Ayudante Doctor del Dpto. de Biología Celular, Biología Funcional y Antropología Física de la Universitat de València

Dña. **Teresa Jover Mengual**, Profesor Titular del Dpto. de Fisiología de la Universitat de València.

CERTIFICAN:

Que la presente memoria, titulada “Evaluación del potencial neuroprotector del modulador selectivo de los receptores estrogénicos, Bazedoxifeno, en un modelo animal de ictus isquémico con reperusión: influencia de la diabetes”, corresponde al trabajo realizado bajo su dirección por Dña. Alicia Aliena Valero, 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 23 de Julio de 2019.

Fdo. M. Consuelo Burguete López Fdo. María Castelló Ruiz Fdo. Teresa Jover Mengual

Agradecimientos

En primer lugar, quiero agradecer a la Unidad Mixta de Investigación Cerebrovascular (UMIC) del IIS La Fe, especialmente a mis directoras las Dras. M. Consuelo Burguete López, María Castelló Ruiz y Teresa Jover Mengual, no sólo por su apoyo y ayuda durante este periodo, sino también por ser mis compañeras de laboratorio, acogerme y tener paciencia conmigo, pero sobre todo por todas esas risas que hemos compartido a lo largo de estos años.

También quiero agradecer a los Dres. Germán Torregrosa Bernabé y Juan B. Salom Sanvalero por ayudarme, haberme “sufrido”, escuchado y aconsejado en todo este proceso. A Mika, gracias a ese congreso que nos llevó a ser compañeras de laboratorio, de interminables horas de quirófano y de copuchas desde aquí o desde Miami. Resumiendo, gracias a la UMIC, por darme la oportunidad y sobre todo los ánimos para llegar hasta aquí, pero ante todo, por ser mi familia profesional. Por supuesto, no me puedo olvidar del resto de compañeros, tanto del IIS La Fe como del Departamento de Fisiología. Gracias a todos por adoptarme durante estos años.

Gracias también a todos mis amigos, los de siempre y los nuevos, que durante más de cuatro años habéis escuchado mis problemas, mis emociones y mis debates internos, muchos de vosotros sin entender siquiera de lo que hablaba. Gracias por todo ese apoyo especialmente en ésta última etapa.

Y por supuesto a mi familia, a todos vosotros, en especial a mis padres y a mi hermana, muchas gracias por apoyarme, por estar ahí en todo momento, por escucharme cuando necesito desahogarme y por entender mis locuras.

En definitiva, ¡gracias a todos!

Índice

Abreviaturas	I
Lista de Figuras	III
Lista de Tablas	IX
Introducción	1
1. Adaptaciones anatómicas y funcionales de la vascularización cerebral a la ausencia de reservas energéticas en el tejido neural.....	3
1.1 Adaptaciones anatómicas: circulación colateral	4
1.2 Adaptaciones funcionales (I): autorregulación.....	6
1.3 Adaptaciones funcionales (II): acoplamiento neurovascular. La unidad neurovascular	7
2. Enfermedades cerebrovasculares: ictus	7
2.1 Clasificación y definición.....	7
2.2 Epidemiología y costes socio-sanitarios	9
2.3 Factores de riesgo.....	10
2.4 Ictus isquémico y diabetes.....	10
3. Fisiopatología del ictus isquémico (I): umbrales de FSC.....	12
4. Fisiopatología del ictus isquémico (II): la cascada isquémica	15
4.1 Pérdida de homeostasis iónica: excitotoxicidad.....	16
4.2 Respuesta mitocondrial y estrés oxidativo.....	17
4.3 Inflamación	18
4.4 Muerte celular isquémica: necrosis y apoptosis.....	20
4.5 Evolución temporal de la fisiopatología del ictus isquémico.....	23
5. Terapéutica del ictus.....	25
5.1 Restauración del flujo sanguíneo cerebral	26
5.2 Neuroprotección.....	27
6. Sistema estrogénico.....	28

6.1 Esteroidogénesis	28
6.2 Receptores estrogénicos.....	30
7. Efectos beneficiosos de 17β-estradiol en enfermedades neurológicas .	31
7.1 El estudio Women’s Health Initiative (WHI)	33
8. Moduladores selectivos de los receptores estrogénicos (SERMs).....	35
9. Bazedoxifeno.....	38
Hipótesis y objetivos.....	39
Material y Métodos	43
1. Animales de experimentación	45
2. Modelos experimentales.....	45
2.1 Modelo de isquemia cerebral focal transitoria en rata	45
2.2 Modelo de diabetes en rata.....	50
3. Protocolos experimentales en el modelo de isquemia cerebral focal transitoria en rata.....	50
3.1 Determinación de la cinética de BZA y E2: niveles plasmáticos	50
3.2 Grupos experimentales.....	52
3.3 Evaluación del daño cerebral isquémico.....	55
3.4 Técnicas de análisis histológico.....	57
3.5 Análisis de la expresión de genes mediante PCR cuantitativa.....	60
3.6 Análisis de la expresión proteica mediante Western blot	62
4. Fármacos y reactivos.....	65
5. Análisis estadístico	66
Resultados	67
1. Influencia de la diabetes sobre la fisiología básica de la isquemia-reperfusión	69
2. Influencia de la diabetes sobre el daño cerebral isquémico.....	71
2.1 Valoración neurofuncional.....	71

2.2	Volúmenes de infarto y edema cerebrales.....	72
3.	Efecto de BZA y E2 sobre la respuesta fisiológica durante isquemia-reperusión en condiciones de normoglucemia y diabetes	73
4.	Efecto de BZA y E2 sobre el daño cerebral tras isquemia-reperusión en condiciones de normoglucemia y diabetes.....	77
4.1	Valoración neurofuncional	77
4.2	Volúmenes de infarto y edema cerebrales.....	77
4.3	Muerte celular apoptótica.....	81
5.	Efecto de BZA y E2 sobre la expresión de receptores estrogénicos ER α , ER β y GPER en condiciones de normoglucemia y diabetes.	87
5.1	ER α	87
5.2	ER β	90
5.3	GPER.....	93
6.	Efecto de BZA y E2 sobre la activación de las vías MAPK/ERK1/2 y PI3K/Akt.....	96
6.1	MAPK/ERK1/2	96
6.2	PI3K/Akt	98
Discusión	99
1.	Consideraciones sobre el diseño del estudio.....	101
1.1	Modelo animal de ictus isquémico con reperusión	101
1.2	Modelo animal de diabetes experimental.....	103
1.3	Uso exclusivo de ratas macho.....	105
1.4	Ausencia de grupo con isquemia-reperusión simulada	106
1.5	Pauta terapéutica de BZA y E2.....	107
1.6	Valoración de los puntos finales: 24h.....	108
2.	Influencia de la diabetes sobre la fisiología básica de la isquemia-reperusión.....	109
3.	Influencia de la diabetes sobre el daño cerebral isquémico	110

4. Efecto de BZA y E2 sobre el daño cerebral tras isquemia-reperfusión en condiciones de normogluemia y diabetes	111
4.1 Efecto de BZA y E2 sobre la muerte celular apoptótica.....	114
5. Efecto de BZA y E2 sobre la expresión de receptores estrogénicos ER α , ER β y GPER en condiciones de normogluemia y diabetes.....	115
6. Efecto de BZA y E2 sobre la activación de las vías MAPK/ERK1/2 y PI3K/Akt en condiciones de normogluemia y diabetes	117
7. Consideraciones finales.....	120
Conclusiones.....	121
Bibliografía.....	125

Abreviaturas

[Ca²⁺]_i: Concentración intracelular de calcio

ACM: Arteria cerebral media

AIT: Accidente isquémico transitorio

BBB: Barrera hematoencefálica (*"Blood brain barrier"*)

BZA: Acetato de bazedoxifeno (*"Bazedoxifene Acetate"*)

cDNA: DNA complementario

CW: Círculo de Willis

DM: Diabetes mellitus

DMSO: Dimetilsulfóxido

DMT1: Diabetes mellitus tipo 1

DMT2: Diabetes mellitus tipo 2

E2: 17β-Estradiol

ERE: Elemento de respuesta a estrógenos

ERs: Receptores estrogénicos (*"Estrogen receptors"*)

ERα: Receptor estrogénico α (*"Estrogen receptor α"*)

ERβ: Receptor estrogénico β (*"Estrogen receptor β"*)

FSC: Flujo sanguíneo cerebral

GPGR: Receptor estrogénico acoplado a proteína G (*"G-protein coupled estrogen receptor"*)

LDF: Flujo láser-Doppler (*"Laser-Doppler flow"*)

MCAO: Oclusión de la arteria cerebral media (*“Middle cerebral artery occlusion”*)

MMPs: Metaloproteinasas de matriz (*“Matrix metalloproteinases”*)

mRNA: RNA mensajero

NG: Normoglucemia

P_aCO₂: Presión parcial de CO₂ en sangre arterial

P_aO₂: Presión parcial de O₂ en sangre arterial

PAS: Presión arterial sistémica

PC: Perfusión cerebrocortical

PFA: Paraformaldehído

RNS: Especies reactivas de nitrógeno (*“Reactive nitrogen species”*)

ROS: Especies reactivas de oxígeno (*“Reactive oxygen species”*)

rt-PA: Activador del plasminógeno tisular recombinante (*“Recombinant tissue plasminogen activator”*)

RT-qPCR: *“Quantitative reverse transcription PCR”*

SERMs: Moduladores selectivos de los receptores estrogénicos (*“Selective estrogen receptor modulators”*)

STZ: Estreptozotocina (*“streptozotocin”*)

TH: Terapia hormonal

TTC: Cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolio (*“2,3,5-trifeniltetrazolium chloride”*)

WB: *Western blot*

WHI: *Women’s Health Initiative*

Lista de Figuras

Figura 1. Adaptaciones de la vascularización cerebral a la ausencia de reservas energéticas en el tejido neural.....	3
Figura 2. Representación esquemática del polígono de Willis. Las flechas verdes continuas indican la dirección del flujo sanguíneo en condiciones fisiológicas.....	4
Figura 3. Vista dorsal de un cerebro de rata perfundido con látex.....	5
Figura 4. Autorregulación cerebral.....	6
Figura 5. Representación esquemática de la etiología de los principales tipos de ictus.	8
Figura 6. Modificaciones vasculares causadas por la diabetes y su influencia en el ictus.	11
Figura 7. Representación esquemática de las regiones cerebrales hipoperfundidas tras la oclusión de la arteria cerebral media.....	14
Figura 8. Imágenes radiográficas de secciones transversales del cerebro de un paciente de ictus..	15
Figura 9. Esquema-resumen de los principales mecanismos de daño celular en la isquemia-reperfusión.	16
Figura 10. La isquemia cerebral induce la activación de microglía y astrocitos que reaccionan secretando citoquinas, quimioquinas, ROS y MMPs.....	20
Figura 11. Esquema ilustrativo de las vías de señalización MAPK/ERK1/2 y PI3K/Akt activadas tras la unión de 17β-estradiol (E2) a sus receptores específicos (ER y GPER).....	23
Figura 12. Evolución temporal del ictus isquémico y las terapias asociadas según la ventana terapéutica.	25

Figura 13. Vía de síntesis de los neuroesteroides.	29
Figura 14. Mecanismos genómicos y no genómicos que median el efecto de 17β-estradiol.....	31
Figura 15. Potencia agonista/antagonista relativa sobre los principales tejidos diana relacionados con la menopausia, de diferentes SERMs con respecto a 17β-estradiol.....	36
Figura 16. Cronograma del desarrollo y estructura química de los principales SERMs con aplicaciones en la clínica.	37
Figura 17. Diagrama de localización del soporte de la sonda LDF y tornillos de fijación.	46
Figura 18. Anatomía vascular de la zona ventral derecha del cuello y secuencia quirúrgica de la técnica del filamento intraluminal.....	48
Figura 19. Perfiles plasmáticos concentración-tiempo..	51
Figura 20. Cronograma de los protocolos para el estudio del efecto neuroprotector de BZA y E2 en ratas Wistar macho normoglucémicas.	54
Figura 21. Cronograma de los protocolos para el estudio del efecto neuroprotector de BZA y E2 en ratas Wistar macho diabéticas.	55
Figura 22. Registro representativo de un episodio de isquemia-reperfusión en nuestro modelo experimental de MCAO en una rata normoglucémica.	69
Figura 23. (A) Valores de perfusión cortical y (B) presión arterial sistémica (PAS) registrados durante las tres fases del episodio isquémico: basal, isquemia y perfusión, en animales normoglucémicos y diabéticos.....	70
Figura 24. Puntuación neurofuncional obtenida por los animales normoglucémicos (NG) y diabéticos (DM) a las 24 h tras isquemia-reperfusión.	72

Figura 25. (A) Volúmenes de infarto cortical, subcortical y total, y (B) valores de edema obtenidos en animales normoglucémicos y diabéticos tras 24 h del episodio de isquemia-reperfusión..	73
Figura 26. (A) Valores de perfusión cortical y (B) presión arterial sistémica (PAS) registrados durante isquemia-reperfusión en los tres grupos de animales normoglucémicos.	74
Figura 27. (A) Valores de perfusión cortical y (B) presión arterial sistémica (PAS) registrados durante isquemia-reperfusión en los tres grupos de animales diabéticos	76
Figura 28. Puntuación neurofuncional de ratas normoglucémicas (NG) y diabéticas (DM) sometidas a isquemia-reperfusión y tratadas con el solvente	77
Figura 29. Volumen de infarto cortical, subcortical y total, tras 24 h del episodio isquémico, en ratas normoglucémicas tratadas con el solvente. Área de infarto a lo largo de las 7 secciones coronales.	78
Figura 30. Volumen total del edema de los tres grupos experimentales normoglucémicos:	79
Figura 31. Volumen de infarto cortical, subcortical y total tras 24 h del episodio isquémico, en ratas diabéticas tratadas con el solvente, BZA y E2. Área de infarto a lo largo de las 7 secciones coronales.	80
Figura 32. Volumen total del edema de los tres grupos experimentales diabéticos: solvente, BZA y E2	80
Figura 33. Detección de la fragmentación de DNA mediante la técnica de TUNEL en tejido cerebral de ratas normoglucémicas controles y tratadas con BZA y E2, sometidas a isquemia-reperfusión.	81

Figura 34. Recuento de células TUNEL+ en tejido cerebral de animales normoglucémicos (NG) controles y tratados con BZA y E2	82
Figura 35. Caspasa-3 activada en secciones coronales de ratas normoglucémicas control y tratadas con BZA y E2, sometidas a isquemia-reperfusión.....	83
Figura 36. Detección de la fragmentación de DNA mediante la técnica de TUNEL en tejido cerebral de ratas diabéticas controles y tratadas con BZA y E2, sometidas a isquemia-reperfusión.....	84
Figura 37. Recuento de células TUNEL+ en tejido cerebral de animales diabéticos (DM) controles y tratadas con BZA y E2:	85
Figura 38. Caspasa-3 activada en secciones coronales de ratas diabéticas control y tratadas con BZA y E2, sometidas a isquemia-reperfusión.	86
Figura 39. Expresión de ER α en los hemisferios contralateral e ipsilateral de animales normoglucémicos sometidos a isquemia-reperfusión.....	87
Figura 40. Superposición de imágenes de inmunofluorescencia ER α , TUNEL y DAPI en el cortex ipsilateral en condiciones de normoglucemia	88
Figura 41. Expresión de ER α en los hemisferios contralateral e ipsilateral de animales diabéticos sometidos a isquemia-reperfusión.....	89
Figura 42. Superposición de imágenes de inmunofluorescencia ER α , TUNEL y DAPI en el cortex ipsilateral en condiciones de diabetes.	90
Figura 43. Expresión de ER β en los hemisferios contralateral e ipsilateral de animales normoglucémicos sometidos a isquemia-reperfusión.....	91
Figura 44. Superposición de imágenes de inmunofluorescencia ER α , TUNEL y DAPI en el cortex ipsilateral en condiciones de normoglucemia.....	92
Figura 45. Expresión de ER β en los hemisferios contralateral e ipsilateral de animales diabéticos sometidos a isquemia-reperfusión.....	92

Figura 46. Superposición de imágenes de inmunofluorescencia ER α , TUNEL y DAPI en el cortex ipsilateral en condiciones de diabetes	93
Figura 47. Expresión de GPER en los hemisferios contralateral e ipsilateral de animales normoglucémicos sometidos a isquemia-reperfusión.	94
Figura 48. Superposición de imágenes de inmunofluorescencia GPER, TUNEL y DAPI en el cortex ipsilateral en condiciones de normogluemia	95
Figura 49. Expresión de GPER en los hemisferios contralateral e ipsilateral de animales diabéticos sometidos a isquemia-reperfusión.....	95
Figura 50. Superposición de imágenes de inmunofluorescencia GPER, TUNEL y DAPI en el cortex ipsilateral en condiciones de diabetes.	96
Figura 51. Cantidad relativa de proteína fosforilada ERK1/2 en condiciones de normogluemia (A-C) y diabetes (D-F)..	97
Figura 52. Cantidad relativa de proteína pAkt en condiciones de normogluemia (A,B) y diabetes (C,D).....	98

Lista de Tablas

Tabla 1. Criterios de exclusión aplicados a la población total de animales.	53
Tabla 2. Relación de anticuerpos primarios y sus diluciones utilizados para la detección por inmunofluorescencia.....	60
Tabla 3. Secuencias de los cebadores para la determinación de mRNA mediante RT-qPCR.	62
Tabla 4: Relación de anticuerpos primarios y sus diluciones utilizados para <i>Western blot</i>	64
Tabla 5: Lista de anticuerpos secundarios empleados para western blot	65
Tabla 6: Parámetros fisiológicos en muestras de sangre arterial obtenidas durante las tres fases del procedimiento tMCAO.....	71
Tabla 7. Parámetros fisiológicos en muestras de sangre arterial obtenidas durante el período de la cirugía en los tres grupos experimentales normoglucémicos.....	75
Tabla 8. Parámetros fisiológicos en muestras de sangre arterial obtenidas durante el período de la cirugía en los tres grupos experimentales diabéticos.....	76
Tabla 9. Modelos animales de ictus isquémico	102
Tabla 10. Modelos animales de diabetes	104

Introducción

1. Adaptaciones anatómicas y funcionales de la vascularización cerebral a la ausencia de reservas energéticas en el tejido neural

El cerebro es un órgano complejo y heterogéneo con gran demanda de energía. Representando únicamente el 2% del peso corporal, consume el 20% del O_2 y la glucosa total del organismo para la obtención de la energía necesaria para su normal funcionamiento (1). Puesto que las neuronas no poseen reservas energéticas y los requerimientos de energía son fluctuantes dependiendo del grado de activación neuronal, el cerebro ha desarrollado una serie de soluciones anatómicas y funcionales que tienden a preservar la perfusión tisular (2). Únicamente cuando fallan estos sistemas de seguridad empieza a desarrollarse el daño cerebral.

Dichas adaptaciones anatómicas y funcionales de la vascularización cerebral se resumen en la Figura 1.

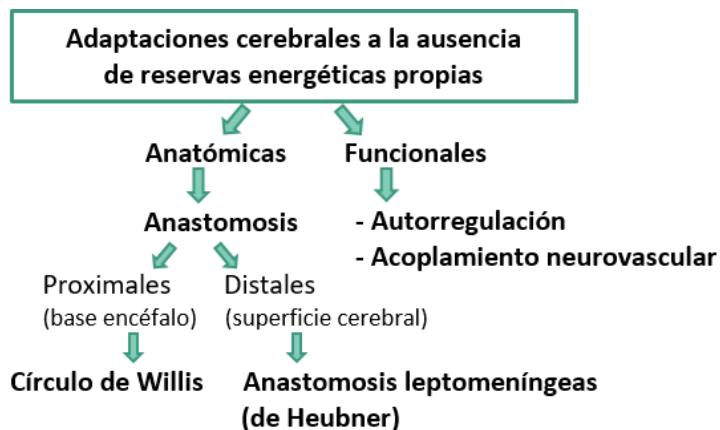


Figura 1. Adaptaciones de la vascularización cerebral a la ausencia de reservas energéticas en el tejido neural.

1.1 Adaptaciones anatómicas: circulación colateral

La circulación colateral puede definirse como un conjunto de vías anastomóticas arteria-arteria capaces de suministrar los nutrientes necesarios a una región cerebral cuya fuente primaria de suministro se vea reducida o comprometida por alguna alteración. Los componentes anatómicos de la circulación colateral son:

- Círculo de Willis (CW). Círculo anastomótico en la base del cerebro que interconecta el flujo sanguíneo de su parte anterior (arterias carótida interna – cerebral media – cerebral anterior) con el de su parte posterior (arterias basilar – cerebrales posteriores) (Figura 2). En condiciones de oclusión vascular extracraneal (arterias carótidas o vertebrales), el CW posibilita el redireccionamiento del flujo desde las zonas con presión arterial normal, hacia las zonas en las que la presión arterial ha descendido a consecuencia de la oclusión. Cabe señalar que el CW está incompleto en la mayor parte de la población (64-75%), por lo que pacientes incluidos en estos porcentajes suelen presentar ictus más graves. Por tanto, un CW completo es un predictor significativo de recuperación favorable (3).

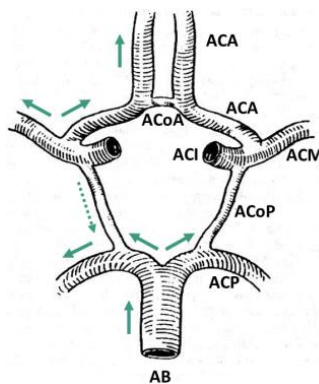


Figura 2. Representación esquemática del polígono de Willis. Las flechas verdes continuas indican la dirección del flujo sanguíneo en condiciones fisiológicas. La flecha con línea discontinua representa,

a modo de ejemplo, el redireccionamiento de flujo sanguíneo desde la vascularización anterior hacia la posterior a través de la arteria comunicante posterior. AB, arteria basilar; ACA, arteria cerebral anterior; ACI, arteria carótida interna; ACM, arteria cerebral media; ACoA, arteria comunicante anterior; ACoP, arteria comunicante posterior.

- Anastomosis leptomeníngeas (de Heubner). Se establecen entre las ramas corticales distales de las tres grandes arterias procedentes del CW (arterias cerebrales media, anterior y posterior). La red conformada determina de forma crítica la extensión y la intensidad del déficit circulatorio por la constricción u oclusión de alguna de las grandes arterias cerebrales. Cuanto mayor sea el número y diámetro de estas anastomosis, más eficiente será el aporte colateral desde los territorios vasculares adyacentes no ocluidos y menor el daño cerebral. La variabilidad de la circulación colateral es la responsable de que en condiciones clínicas la oclusión vascular resulte en un rango muy amplio de daño cerebral (4).

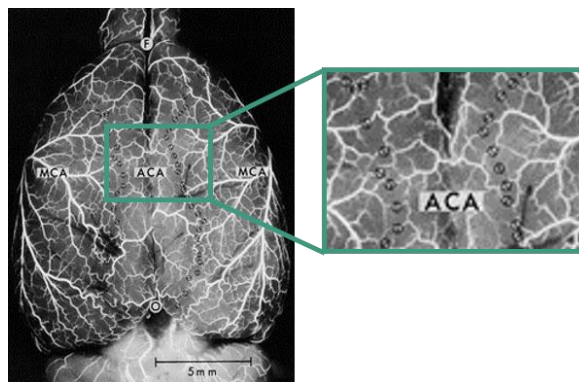


Figura 3. Vista dorsal de un cerebro de rata perfundido con látex. Los círculos indican las anastomosis entre las ramas terminales de las arterias cerebrales media (ACM) y cerebral anterior (ACA).

- Anastomosis carotídeas. También se han descrito anastomosis entre las ramas de la arteria carótida externa (por ejemplo, las arterias facial, maxilar, meníngea media y occipital) y las de la arteria carótida interna (por ejemplo, la arteria oftálmica).

1.2 Adaptaciones funcionales (I): autorregulación

La autorregulación cerebral se define como “la capacidad intrínseca de los vasos cerebrales para mantener constante la perfusión del tejido cerebral”. El concepto original incluía el parámetro de la presión arterial, definiéndose la autorregulación cerebral como “el mecanismo homeostático por el que se mantiene constante el flujo sanguíneo cerebral (FSC) dentro de un rango variable de valores de presión arterial”. La representación gráfica que relaciona ambos parámetros es una curva trifásica (Figura 4).

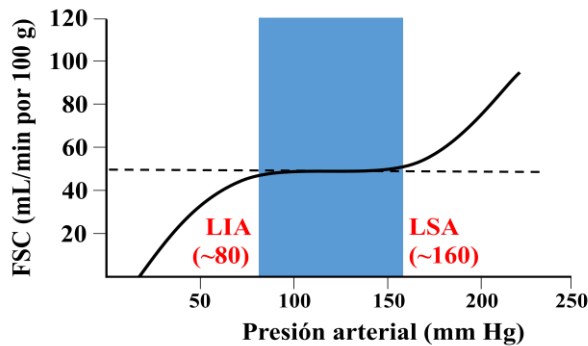


Figura 4. Autorregulación cerebral. El flujo sanguíneo cerebral (FSC) se mantiene constante a pesar de los cambios en los valores de presión arterial comprendidos entre los 80 (“límite inferior de la autorregulación, LIA”) y los 160 (“límite superior de la autorregulación”, LSA) mmHg.

La base de la autorregulación cerebral es la capacidad de los vasos de resistencia cerebrales para modificar su calibre. Cuando aumenta la presión arterial, aumenta la resistencia de los vasos cerebrales (vasoconstricción), con lo cual se mantiene constante el FSC y a la inversa (5). En este sentido, la circulación cerebral está regida por el principio universal de Poiseuille aplicable a la hemodinámica general. Por debajo del límite inferior se produce el déficit circulatorio (isquemia); por encima del límite superior se produce edema vasogénico (3).

1.3 Adaptaciones funcionales (II): acoplamiento neurovascular. La unidad neurovascular

Las neuronas, la glía y los microvasos se organizan en el cerebro formando lo que se ha venido a denominar la “unidad neurovascular”, que representa la integración funcional de las células vasculares (endotelio, células musculares lisas, pericitos) y las células neurales (neuronas, astrocitos, oligodendrocitos y microglía). Según esta disposición, los cuerpos neuronales nunca se encuentran a una distancia superior a 10 μm del capilar más cercano. Es a este nivel donde se produce el acoplamiento neurovascular; es decir, la regulación del aporte sanguíneo de O_2 y glucosa según las demandas metabólicas del tejido cerebral. Se establece así una estrecha conexión entre la actividad funcional, el metabolismo energético y el FSC (2). Llegada al área activada, la glucosa se transfiere desde la sangre hacia las células cerebrales donde se utiliza para generar ATP, convirtiéndose en otras formas de substrato energético o en glucógeno como reserva energética almacenable únicamente en astrocitos (6).

2. Enfermedades cerebrovasculares: ictus

2.1 Clasificación y definición

Con la expresión “enfermedades cerebrovasculares” se hace referencia a “todos aquellos desórdenes en los que una región del cerebro resulta afectada de forma permanentemente o transitoria, bien por isquemia o por hemorragia, y/o en los cuales uno o más vasos sanguíneos están deteriorados por un proceso patológico” (7). Según su evaluación clínica, pueden clasificarse en: 1) desorden cerebrovascular asintomático; 2) disfunción cerebral focal (ictus o accidente isquémico transitorio (AIT)); 3) demencia vascular; y 4) encefalopatía hipertensiva.

El término “ictus” es una denominación genérica que se define como “un síndrome neurológico focal ocasionado por la perturbación aguda del flujo sanguíneo cerebral”. Si esta perturbación, así como sus signos y síntomas clínicos, se resuelven en un plazo inferior a 24 h, se clasifica como AIT. Si la sintomatología persiste más allá de ese período o si se produce el deceso, se clasifica como ictus. Dependiendo de la naturaleza de la lesión engloba una de las siguientes condiciones patológicas: 1) infarto cerebral (ictus isquémico); 2) hemorragia subaracnoidea (ictus hemorrágico extraparenquimatoso); y 3) hemorragia cerebral (ictus hemorrágico intraparenquimatoso) (Figura 5). El ictus isquémico representa el 85% del total, y es en el que se centrará la atención en adelante (8).

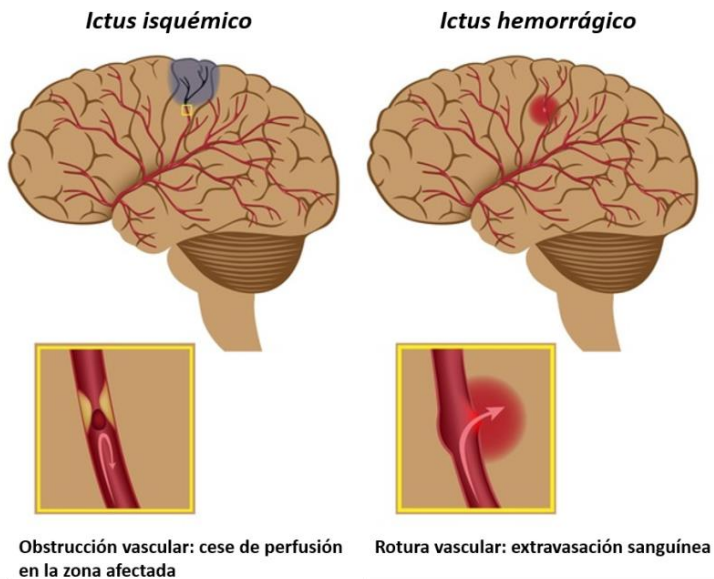


Figura 5. Representación esquemática de la etiología de los principales tipos de ictus.

El ictus isquémico es una enfermedad heterogénea con multitud de causas descritas. A lo largo de los años, diferentes clasificaciones etiológicas han sido propuestas (9). El sistema de clasificación TOAST es el más usado comúnmente en pacientes, clasifica según se deban a aterosclerosis en vaso grande, émbolo

cardíaco, enfermedad de vasos pequeños (lacunar), otras causas o de etiología indeterminada (10,11).

El 65% de ictus isquémicos son consecuencia de la interrupción del flujo sanguíneo por el enclavamiento de un trombo-émbolo, de manera transitoria o permanente, en el territorio de la arteria cerebral media; el 2% en el de la arteria cerebral anterior; y el 9% en el de la arteria cerebral posterior. Por otro lado, las lesiones en el tronco encefálico y en el cerebelo representan un 15%, y el resto en regiones múltiples o limítrofes (12). Puede afirmarse, por lo tanto, que la isquemia cerebral focal en el territorio irrigado por la arteria cerebral media es la causa más frecuente de ictus isquémico.

2.2 Epidemiología y costes socio-sanitarios

El ictus representa la segunda causa de mortalidad en el mundo, siendo responsable de 1 de cada 10 defunciones, lo que equivale a unos 5-6 millones de muertes al año. Además, un número similar de pacientes resultan permanentemente discapacitados, lo que convierte al ictus en la primera causa de discapacidad física permanente (13). En España los accidentes cerebrovasculares son la segunda causa de mortalidad en la población general y la primera en mujeres, así como la primera causa de discapacidad permanente. Pese a que la incidencia tiende a aumentar debido al envejecimiento de la población, la tasa de mortalidad ha descendido en los últimos años debido a una rápida intervención médica. Aun así, en el año 2017 el Instituto Nacional de Estadística registró una incidencia hospitalaria de 229 por cada 100.000 habitantes por enfermedades cerebrovasculares, entre lo que se contabilizaron 26.937 defunciones de las cuales 7.643 fueron por infarto cerebral (14). Entre los años 2010 y 2011 se realizó un estudio en España que determinó que el coste de la enfermedad es de unos

27.000€ paciente/año, suponiendo un coste global de aproximadamente 1.600 millones de euros al año (15).

2.3 Factores de riesgo

Los factores de riesgo en el ictus se han documentado en diferentes estudios epidemiológicos realizados principalmente en los países con niveles de ingresos altos. No obstante, el estudio INTERSTROKE llevado a cabo en 2009 en 22 países ha puesto de manifiesto que los factores de riesgo en el ictus son muy similares en diferentes partes del mundo (16). Los resultados de este estudio sugieren que 10 factores de riesgo modificables o susceptibles de tratamiento médico se asocian con el 90% del riesgo de ictus. Se distinguen factores relacionados con el estilo de vida: tabaquismo, alcoholismo, dieta no saludable y falta de ejercicio físico; y comorbilidades asociadas: diabetes, hipertensión, patologías cardíacas (fibrilación auricular), obesidad, dislipidemias y estrés psicosocial (ansiedad, depresión, estrés...). Los factores de riesgo no modificables son la edad, el género, la raza/etnia y factores genéticos (17).

En el contexto de esta Tesis Doctoral se inscribe la influencia de la diabetes en el ictus isquémico.

2.4 Ictus isquémico y diabetes

La diabetes mellitus (DM) es un desorden del metabolismo de carbohidratos, lípidos y proteínas causado por la incapacidad del organismo para sintetizar insulina o para utilizarla en su totalidad. Tanto la diabetes mellitus de tipo 1 (DMT1, déficit en la producción de insulina) como, la más común, diabetes mellitus de tipo 2 (DMT2, resistencia a la insulina), se caracterizan por la hiperglucemia crónica, la cual origina cambios microvasculares que causan

complicaciones a largo plazo en diferentes tejidos, especialmente aquellos insensibles a la insulina tales como la retina (ceguera), los riñones (insuficiencia renal progresiva) y los nervios (neuropatías debilitantes por daños en nervios aferentes). Además, también se asocian con la diabetes cambios ateroscleróticos macrovasculares (18).

El cerebro no es ajeno a las complicaciones originadas por la diabetes. Por lo que respecta a la vascularización cerebral, se han descrito alteraciones tanto anatómicas como funcionales inducidas por la hiperglucemia (Figura 6) (19).

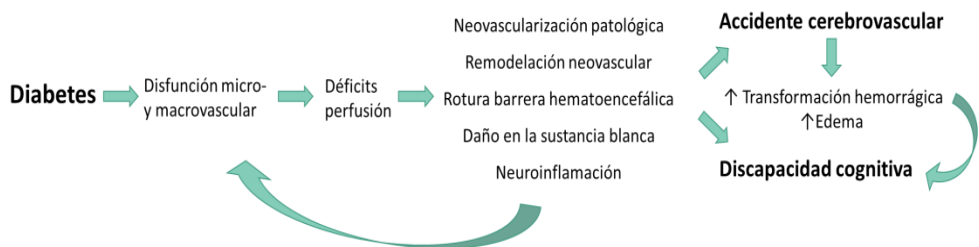


Figura 6. Modificaciones vasculares causadas por la diabetes y su influencia en el ictus. (Modificado de Caplan et al. 2017)

Es importante señalar que dichas alteraciones parecen depender de la intensidad (moderada o severa) y de la duración (crónica o aguda) de la hiperglucemia. La hiperglucemia moderada crónica promueve la neovascularización y la remodelación, desestructura la barrera hemato-encefálica, e incrementa el tono vascular limitando la perfusión cerebral. La hipoxia y/o los cambios metabólicos resultantes median la tolerancia isquémica vía el preconditionamiento neuronal, pero por otra parte reducen la tolerancia isquémica vascular (20). Consideradas conjuntamente, estas circunstancias determinan que en el caso de que acontezca un ictus el volumen del infarto será menor, pero el desarrollo de edema y transformación hemorrágica será mayor. Por su parte, la hiperglucemia severa y/o aguda tiene los mismos efectos

deletéreos sobre la vascularización cerebral, pero por falta de tiempo para estimular los mecanismos adaptativos protectores la magnitud del infarto cerebral será mayor (21).

Son muchas las evidencias de la asociación ictus isquémico-diabetes obtenidas en estudios con modelos animales y en humanos. Principalmente, el riesgo de padecer un ictus en pacientes con DMT2 se incrementa entre 2-6 veces; además, aproximadamente el 30-40% de los pacientes de ictus presentan hiperglucemia en el momento del ingreso, bien como consecuencia de la diabetes (hiperglucemia crónica) o bien como respuesta aguda al ictus (hiperglucemia aguda). Tanto en modelos animales como en la clínica humana, la hiperglucemia exagera el daño cerebral isquémico y se asocia con un pronóstico peor. Sin embargo, los pacientes sin historia previa de diabetes resultan más severamente afectados que los diabéticos. En condiciones de hiperglucemia, la reperfusión del cerebro isquémico (isquemia focal transitoria en modelos animales o terapia trombolítica en humanos), origina mayor daño cerebral que la no reperfusión. Esto sugiere que al conocido daño por reperfusión se añade el daño originado por la hiperglucemia (21,22).

3. Fisiopatología del ictus isquémico (I): umbrales de FSC

Como ya se ha mencionado, el evento subyacente al ictus isquémico es la isquemia cerebral, la cual se define como “la disminución de flujo sanguíneo de forma aguda y de duración y magnitud suficientes en una región determinada del cerebro, que conduce a la muerte del tejido afectado (infarto cerebral) y a la instauración de déficits neurológicos focales (ictus agudo)”.

Tras los primeros segundos de una isquemia cerebral focal completa ocurre el cese de actividad eléctrica neuronal, y al cabo de unos pocos minutos el deterioro de la homeostasis energética e iónica. Si dicha alteración persiste por más de 5-10 minutos, el daño celular es ya irreversible. Por el contrario, si la isquemia es incompleta, es decir, si persiste una cierta perfusión residual posibilitada por la circulación colateral, el resultado final es impredecible, lo cual posee gran relevancia en la clínica de las enfermedades cerebrovasculares, especialmente el ictus isquémico agudo (19). Se plantea, por lo tanto, la cuestión de cuáles son los umbrales de FSC capaces de atender las necesidades energéticas cerebrales.

Tras la interrupción del flujo, la isquemia no es homogénea en todo el territorio afectado, estableciéndose la denominada “lesión de ictus”, consistente en un núcleo central densamente isquémico (*core*) que evolucionará a infarto, rodeado por áreas de isquemia de menor intensidad en las que las células se encuentran estructuralmente intactas, pero funcionalmente alteradas. Esta zona perifocal ha recibido la denominación de “penumbra isquémica”, e incluye áreas isquémicas que se recuperarán espontáneamente (oligohemia benigna), y áreas que progresarán hacia cambios irreversibles a menos que se instaure un tratamiento adecuado (Figura 7) (23). Los factores que determinan la progresión de la penumbra al infarto son: el grado de circulación arterial colateral, la duración de la isquemia, y el estado funcional y metabólico previos del tejido.

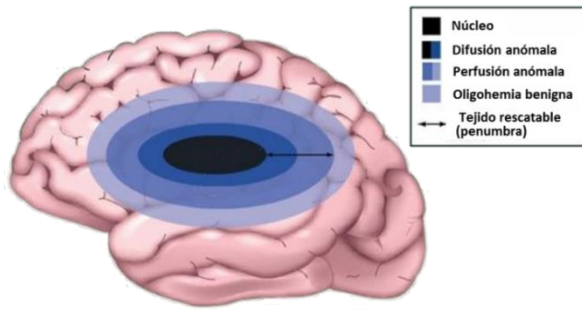


Figura 7. Representación esquemática de las regiones cerebrales hipoperfundidas tras la oclusión de la arteria cerebral media.

Desde el punto de vista clínico, la penumbra es la diana más relevante y el foco de las investigaciones más numerosas. Por lo tanto, se plantea la cuestión acerca de cómo diferenciar la penumbra isquémica y el núcleo del infarto. La solución podría surgir de la confluencia entre las técnicas de imagen basadas en mediciones del FSC, y el concepto de “umbrales de FSC”. Los umbrales de FSC más comúnmente aceptados son aproximadamente 20 y 10 ml 100 g⁻¹ min⁻¹ (40% y 20% del valor control, respectivamente), de forma que el tejido sano (incluyendo la oligoemia benigna) registra tasas de FSC superiores a 20 ml 100 g⁻¹ min⁻¹; la penumbra registra tasas de FSC entre 20 y 10 ml 100 g⁻¹ min⁻¹; por último, el núcleo isquémico registra tasas de FSC inferiores a 10 ml 100 g⁻¹ min⁻¹. Debe destacarse que estos umbrales de FSC se han registrado en experimentos con animales, y su fiabilidad diagnóstica en humanos aún no ha sido establecida (24,25). Una revisión acerca de los umbrales de FSC para la penumbra y el núcleo isquémico en pacientes de ictus, demuestra que la variabilidad de dichos umbrales es muy elevada: entre 14.1 y 35.0 ml 100 g⁻¹ min⁻¹ para la penumbra, y entre 4.8 y 8.4 ml 100 g⁻¹ min⁻¹ para el núcleo isquémico. En su momento diferentes razones explicaron esta dispersión, aunque la conclusión fue que las bases para utilizar los umbrales de viabilidad (valores de perfusión de los tejidos isquémicos) como criterio para seguir o no tratamientos endovasculares

(trombolisis-trombectomía) eran muy débiles, y por lo tanto no se podía recomendar su utilización (26). Contrariamente, estudios más recientes utilizando imagen de perfusión (CTP) en pacientes tratados mediante terapia trombolítica, la extensión de la penumbra que resulta reperfundida es un potente predictor del resultado clínico final tanto a corto como a largo plazo (Figura 8) (27).

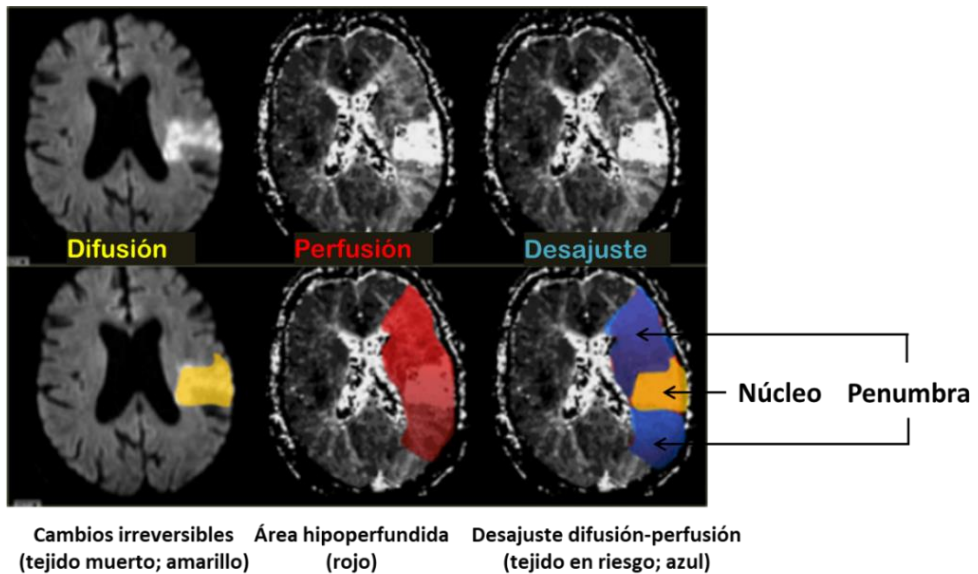


Figura 8. Imágenes radiográficas de secciones transversales del cerebro de un paciente de ictus. Las imágenes de difusión muestran el tejido dañado irreversiblemente (núcleo) por la restricción del movimiento de las moléculas de agua (edema citotóxico). Las imágenes de perfusión por la detección del tránsito de un agente trazador, muestran el tejido en riesgo. La sustracción entre ambas imágenes permite determinar el tamaño del núcleo del infarto, así como de la penumbra isquémica (tejido potencialmente recuperable).

4. Fisiopatología del ictus isquémico (II): la cascada isquémica

El cese de flujo sanguíneo cerebral durante un ictus tiene como resultado una respuesta fisiopatológica resultante en daño neuronal; la sucesión de eventos bioquímicos y moleculares reciben la denominación de “cascada isquémica”. Los

múltiples mecanismos de daño por isquemia-reperfusión incluyen excitotoxicidad, respuesta mitocondrial, estrés oxidativo, cambios inflamatorios y muerte celular (Figura 9) (28,29).

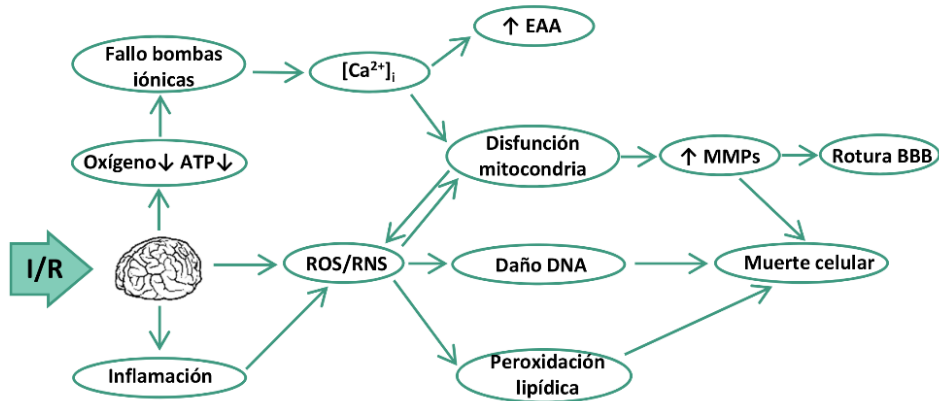


Figura 9. Esquema-resumen de los principales mecanismos de daño celular en la isquemia-reperfusión. $[Ca^{2+}]_i$: concentración de calcio intracelular; EAA: aminoácidos excitadores; ROS/RNS: especies reactivas de oxígeno y nitrógeno; MMPs: metaloproteinasas de matriz; BBB: barrera hematoencefálica (Modificado de Sun y Nan. 2018)

4.1 Pérdida de homeostasis iónica: excitotoxicidad

La consecuencia inmediata de la instauración de la isquemia es el descenso de los niveles de oxígeno y glucosa y, por lo tanto, la pérdida del contenido energético de las células (ATP y fosfocreatina). Las células comienzan a metabolizar la glucosa de forma anaeróbica dando como resultado la producción de ácido láctico (lactoacidosis) y el cese de todas las reacciones y mecanismos dependientes de ATP. Esto provoca que las células sean incapaces de mantener los gradientes iónicos normales por la disfunción de la bomba Na^+/K^+ -ATPasa, lo que provoca la pérdida de la capacidad de las células para captar K^+ y, por lo tanto, que se desencadenen despolarizaciones anóxicas y la entrada masiva de Ca^{2+} , aumentando de esta manera su concentración intracelular ($[Ca^{2+}]_i$) (30).

Además, otros mecanismos como la inhibición de la bomba Mg^{2+}/Ca^{2+} del retículo endoplasmático o la acidosis causada por la acumulación de ácido láctico también contribuyen al incremento de $[Ca^{2+}]_i$.

La despolarización de las neuronas lleva a una liberación de neurotransmisores en la hendidura sináptica, especialmente glutamato, provocando la sobreactivación de sus receptores específicos. El efecto tóxico de este neurotransmisor sobre las células se denomina “excitotoxicidad”; como consecuencia aún se incrementa más la $[Ca^{2+}]_i$. Adicionalmente, los receptores de glutamato promueven la entrada excesiva de Na^+ y agua a la célula, dando lugar a la edematización celular, hinchazón y reducción del espacio extracelular (29,31).

El aumento de $[Ca^{2+}]_i$ provoca la activación masiva de enzimas catabólicos (óxido nítrico sintasas, fosfolipasas, proteasas y endonucleasas) que degradan las principales biomoléculas, conduciendo finalmente a la muerte celular (29,32).

4.2 Respuesta mitocondrial y estrés oxidativo

La mitocondria juega un importante papel en la homeostasis de la energía celular, que está vinculada a la isquemia cuando el balance energético está interrumpido y la síntesis de ATP alterada. La afluencia de Ca^{2+} debida a la excitotoxicidad conlleva su acumulación en la mitocondria, provocando su disfunción, la apertura del poro mitocondrial y por tanto la liberación del citocromo c. Esto intensifica la formación de radicales libres, tanto especies reactivas de nitrógeno (“*reactive nitrogen species*”, RNS) como especies reactivas de oxígeno (“*reactive oxigen species*” ROS), que se ve exacerbada especialmente cuando tiene lugar la reperfusión de la región cerebral afectada. La exposición de

las células a estas concentraciones elevadas de RNS y ROS resulta nociva, fenómeno conocido como “estrés oxidativo” (29,33).

Los principales tipos perjudiciales de ROS incluyen el anión superóxido ($O_2^{\bullet -}$), el radical hidroxilo (OH^{\bullet}) y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2). El exceso de ROS no se genera únicamente en la cadena mitocondrial, sino también en el metabolismo del ácido araquidónico catalizado por la ciclooxigenasa-2 (COX-2), la oxidación de NADPH y la degradación de xantina e hipoxantina vía xantina oxidasa. Los dos RNS principales en el daño por isquemia-reperfusión son óxido nítrico (NO) y peroxinitrito ($ONOO^-$). NO se genera por la acción enzimática de los tres tipos de óxido nítrico sintasa (NOS): endotelial (eNOS), neuronal (nNOS) e inducible (iNOS), estas dos últimas en particular contribuyen al daño por isquemia-reperfusión. La elevada reactividad de $O_2^{\bullet -}$ y NO produce $ONOO^-$, un potente oxidante que contribuye a la rotura de la barrera hematoencefálica (“*blood brain barrier*”, BBB y la disfunción de proteínas esenciales (28,34).

Los radicales libres y los ROS producen, finalmente, daño oxidativo de las principales macromoléculas (lípidos, proteínas y DNA) que derivan en muerte celular (35).

4.3 Inflamación

La inflamación juega un papel importante en la patogénesis del ictus isquémico. Tras el accidente isquémico, los mediadores inflamatorios en el cerebro isquémico se regulan al alza en las células cerebrales e inmunes infiltrantes, que desempeñan un papel complejo en la fisiopatología de la isquemia cerebral (Figura 10) (36). Evidencias cada vez más numerosas sugieren que la respuesta inflamatoria es un arma de doble filo: por una parte contribuye a la lesión cerebral secundaria tras la etapa aguda del accidente cerebrovascular, y

por otra parte contribuye de manera beneficiosa a la recuperación y remodelación cerebral después del ictus (37).

Los neutrófilos son los primeros leucocitos en infiltrarse en el cerebro isquémico para luego desaparecer o disminuir rápidamente con el tiempo. Contribuyen a la inflamación y la lesión cerebral liberando una serie de mediadores proinflamatorios como iNOS y metaloproteinasas de matriz ("*matrix metalloproteinases*", MMPs) (38), almacenadas en sus gránulos y vesículas. Sin embargo, algunos estudios sugieren que la infiltración de neutrófilos también podría disminuir significativamente la lesión cerebral isquémica y mejorar el resultado neurológico del ictus (39).

La microglia constituye el sistema inmunológico de tipo macrófago residente en el sistema nervioso central (SNC). Las células de microglía actúan como células eliminadoras en condiciones de inflamación, isquemia y neurodegeneración, y su activación es rápida en respuesta a la isquemia. También parecen desempeñar un papel dual: pueden producir mediadores inflamatorios como TNF- α (factor de necrosis tumoral α) e IL-1 β (interleuquina 1 β), que conducen al daño celular y la muerte, pero también pueden producir moléculas como TGF- β 1 (factor de crecimiento transformante β) o IL-10 (interleuquina 10), las cuales pueden actuar como neuroprotectores. Estas funciones duales pueden estar relacionadas con el momento de la activación microglial, ya que los datos sugieren que la activación temprana es perjudicial y que la activación posterior es beneficiosa (37,40).

Al igual que la microglía, los astrocitos también desempeñan funciones duales, algunas beneficiosas y otras perjudiciales. Producen una serie de mediadores inflamatorios y desarrollan neuroinflamación al secretar un

“complejo de histocompatibilidad mayor” y moléculas coestimuladoras, que pueden activar respuestas antiinflamatorias (41).

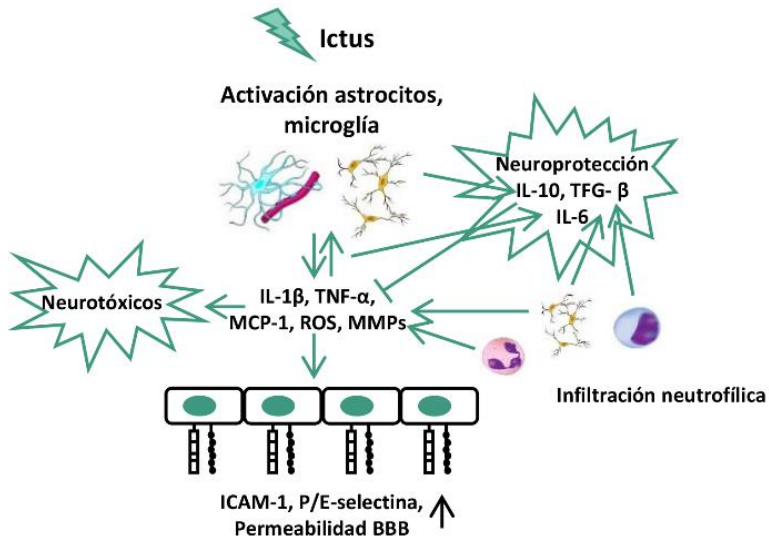


Figura 10. La isquemia cerebral induce la activación de microglía y astrocitos que reaccionan secretando citoquinas, quimioquinas, ROS y MMPs. Estos mediadores aumentan la expresión de moléculas de adhesión en las células endoteliales cerebrales, lo que promueve la adhesión e infiltración de los leucocitos derivados de la sangre (neutrófilos, macrófagos y linfocitos) en el cerebro isquémico. Los leucocitos infiltrantes amplifican aún más la respuesta inflamatoria cerebral al segregar una variedad de mediadores proinflamatorios. Mientras tanto, las células microglía/macrófagos activados y las células T_{reg} infiltradas también secretan algunos factores neuroprotectores (por ejemplo, IL-10, TGF- β) que podrían suprimir la inflamación postisquémica. (Modificado de Jin R et al. 2013).

4.4 Muerte celular isquémica: necrosis y apoptosis

En el *core* isquémico la muerte celular ocurre por necrosis, caracterizada por ser pasiva, incontrolada y muy rápida, resultando en hinchazón celular, rotura de la membrana celular y desarrollo de una respuesta inflamatoria. Por el contrario, en la zona de penumbra la muerte celular ocurre preferentemente por apoptosis (42). El estado metabólico previo, la localización en el cerebro, la intensidad y el tipo de agresión determinarán la ruta de muerte que sigan las células (43). Nos

centraremos en la muerte celular apoptótica, la cual acontece principalmente en la penumbra isquémica.

La apoptosis es un tipo de muerte celular en el que tiene lugar un proceso activo de síntesis de nuevas proteínas. Los componentes necesarios para la señalización apoptótica están codificados genéticamente, y permanecen inactivos hasta que determinados estímulos deletéreos los activan. Dicha activación resulta de la estimulación de las denominadas “vías intrínseca y extrínseca” (44).

La vía intrínseca está mediada por señales celulares que convergen a nivel mitocondrial como respuesta a diferentes condiciones de estrés. Estímulos internos como el daño genético irreparable, la hipoxia, el aumento en los niveles de $[Ca^{2+}]_i$ o situaciones de estrés oxidativo severas, dan lugar al inicio de esta cascada (45). Específicamente, los reguladores centrales de esta vía son un grupo de proteínas pertenecientes a la familia Bcl-2 y de los que depende la integridad de la mitocondria. Se encargan de suprimir o promover los cambios en la permeabilidad de la membrana mitocondrial, necesaria para la liberación del citocromo c y proteínas apoptóticas (46). La inducción de la apoptosis depende del equilibrio entre dos clases de familias de proteínas: 1) anti-apoptóticas (Bcl-2, Bcl-xL y Mcl-1), las cuales secuestran a los miembros pro-apoptóticos; y 2) pro-apoptóticas, que se dividen a su vez en dos subgrupos: a) Bax y Bak, los cuales contribuyen directamente a la permeabilización de la mitocondria; y b) PUMA y Bad, que actúan como sensores inhibiendo a las proteínas anti-apoptóticas (46). Por otro lado, la vía extrínseca está mediada por interacciones de receptores transmembrana con determinadas señales celulares extracelulares como pueden ser Ca^{2+} , glutamato, NO, radicales libres, TNF- α , etc. La señalización de receptor-ligando más caracterizadas son: TNFR1-TNF α , FAS (CD95, APO-1)- FasL, TRAILR1 (DR4)-TRAIL, TRAILR2 (DR5)- TRAIL (45,47).

Ambas vías convergen en la activación de caspasa-3, dando lugar a fragmentación del ADN, degradación del citoesqueleto y proteínas nucleares, formación de cuerpos apoptóticos y expresión de ligandos específicos de células fagocíticas para su eliminación (47). Este fenómeno se produce principalmente en la penumbra isquémica, donde aún está preservada la integridad celular y existe energía disponible (42).

Una de las consecuencias de los diferentes estímulos nocivos mencionados es la activación de determinadas vías de señalización intracelular, en las que intervienen diferentes mensajeros secundarios responsables de la transmisión de las señales extracelulares al núcleo. Entre estos mensajeros se encuentran proteína kinasas tales como “proteína kinasas activadas por mitógeno” (MAPKs), “proteína kinasa A” (PKA), “proteína kinasa C” (PKC), y “proteína kinasa B” (PKB, también denominada Akt). La familia de las MAPKs incluye a tres subfamilias: 1) “kinasas reguladas por señal extracelular 1 y 2” (ERK1/2); 2) “kinasas c-Jun N-terminal 1, 2 y 3” (JNK1/2/3), también denominadas “proteína kinasas activadas por estrés” (SAPK); y 3) MAPK p38. Estas kinasas inducen la expresión de los denominados “genes de expresión inmediata” (IEGs) y la subsiguiente formación de determinados factores de transcripción que regulan una gran variedad de respuestas génicas y que son responsables bien de la degeneración, bien de la supervivencia neuronal secundaria a la isquemia (Figura 11) (48,49).

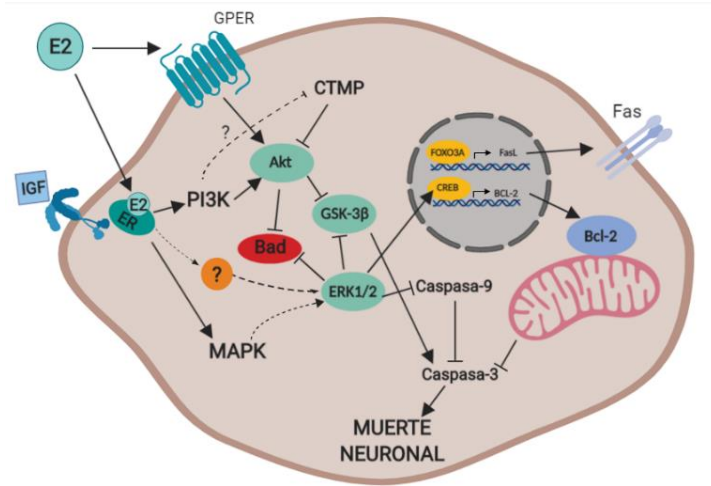


Figura 11. Esquema ilustrativo de las vías de señalización MAPK/ERK1/2 y PI3K/Akt activadas tras la unión de 17β-estradiol (E2) a sus receptores específicos (ER y GPER).

4.5 Evolución temporal de la fisiopatología del ictus isquémico

La evolución del accidente cerebrovascular puede ser dividida en cuatro fases (Figura 12).

- Fase hiperaguda: <12horas

En los últimos años, los resultados obtenidos en numerosos ensayos han determinado esta fase por su importancia como ventana terapéutica para el tratamiento, así como la importancia de diagnóstico clínico temprano gracias a la rápida evaluación de los síntomas mediante el uso de diferentes técnicas de imagen (50,51).

- Fase aguda: 12-24 horas

Durante esta fase tiene lugar el aumento del edema citotóxico y de la $[Ca^{2+}]_i$, la activación de un amplio rango de enzimas (proteasas, lipasas y endonucleasas)

y la producción de ROS y RNS, que dan lugar al daño de las membranas celulares, el DNA y proteínas estructurales de las neuronas que en último término dan lugar a la muerte celular (43,50).

- Fase subaguda: 48 horas – 2 semanas

Debido a la rotura de la BBB y la destrucción de las células edematizadas, se produce un incremento del edema vasogénico por incremento del fluido extracelular. Aunque el edema comienza a desarrollarse de 18 a 24 horas, llega a su punto máximo a las 48-72 horas. En esta fase pueden tener lugar transformaciones hemorrágicas debidas a una combinación de daño vascular, reperfusión y permeabilidad alterada (50).

- Fase crónica: 2 semanas – 2 meses

Esta última fase comienza con la recuperación de la BBB, la resolución del edema vasogénico y la limpieza del tejido necrótico. Esta fase se caracteriza por una atrofia local, gliosis, formación de cavidades, y colapso del ventrículo adyacente. También pueden observarse calcificaciones y deposición de productos de la sangre. En resumen, en esta fase tiene lugar la pérdida de tejido cerebral y su correspondiente función (50).

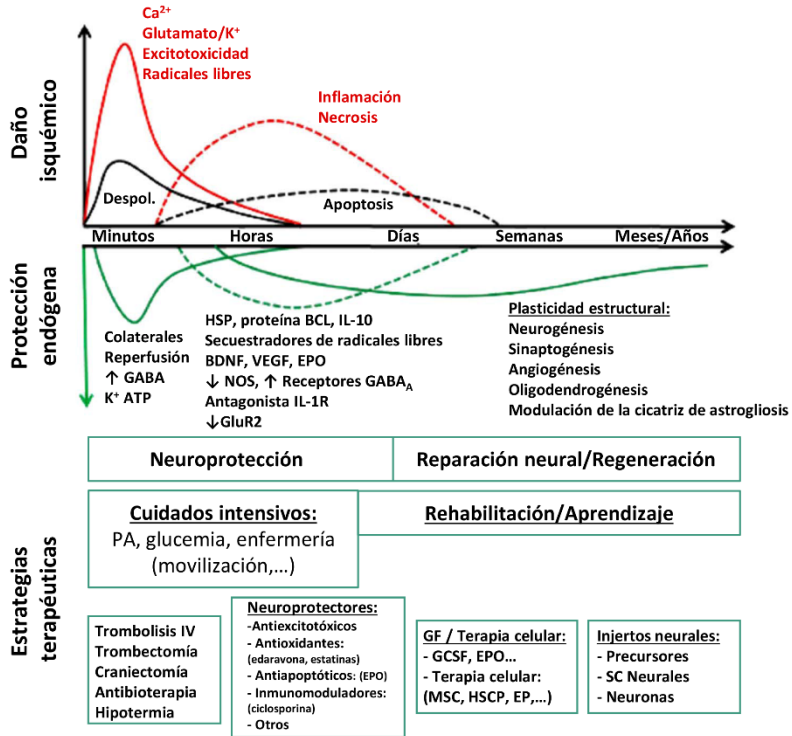


Figura 12. Evolución temporal del ictus isquémico y las terapias asociadas según la ventana terapéutica. BCL: proteína de linfoma de células B; BDNF: factor neurotrófico derivado del cerebro; PA: presión sanguínea; Despol.: despolarización peri-infarto; EP: progenitores endoteliales (CD34+); EPO: eritropoyetina; GCSF: factor estimulador de colonias de granulocitos; GF: factores de crecimiento; GluR2: receptor de glutamato (subunidad 2); HSCP: células madre hematopoyéticas (CD34+); HSP: proteína de choque térmico; IL: interleuquina; IV: intravenoso; MSC: células madre mesenquimales; NOS: NO sintasa; VEGF: factor de crecimiento vascular endotelial.

5. Terapéutica del ictus

El ictus requiere de una intervención inmediata, ya que el infarto se establece de forma progresiva. Las aproximaciones actuales para el tratamiento del ictus se presentan en la siguiente tabla (29):

Restauración del flujo sanguíneo cerebral (FSC) (aguda)
<ul style="list-style-type: none"> - tPA intravenoso o intraarterial - Trombectomía mecánica - Ultrasonidos dirigidos guiados por resonancia magnética
Neuroprotección (aguda)
<ul style="list-style-type: none"> - Hipotermia - PSD-95
Terapia de reemplazo celular (recuperación)
<ul style="list-style-type: none"> - Células madre endógenas - Células madre exógenas - Células madre inducidas
Modulación de circuitos (recuperación)
<ul style="list-style-type: none"> - Estimulación transcraneal mediante corriente directa - Estimulación magnética transcraneal - Estimulación optogenética - Ultrasonidos dirigidos guiados por resonancia magnética - Radioterapia estereotáctica
Interfaz cerebro-máquina (recuperación)
<ul style="list-style-type: none"> - Señales corticales para inducir movimiento - Señales espinales para inducir movimiento

5.1 Restauración del flujo sanguíneo cerebral

Actualmente, el único tratamiento aprobado y eficaz del ictus isquémico consiste en la recanalización y posterior reperfusión de las áreas afectadas, bien por medios farmacológicos o mecánicos. En 1995, el “National Institute of Neurological Disorders and Stroke (NINDS)” realizó un estudio con agentes específicos de fibrina capaces tanto de recanalizar como de provocar una mejora clínica al ser administrados en las 3 primeras horas de aparición de los síntomas. En 1996, la FDA aprobó el uso del “activador del plasminógeno tisular

recombinante” (rt-PA) para el tratamiento del ictus isquémico (25). Ensayos posteriores han conseguido incrementar la ventana terapéutica hasta las 6 horas desde el comienzo de los síntomas, lo que ha dado lugar a la definición de la fase hiperaguda (52,53).

Además de la trombolisis, se ha desarrollado un procedimiento para la eliminación mecánica del trombo por vía endovascular, método denominado “trombectomía mecánica”. Su utilización está indicada en aquellos pacientes que no cumplen los criterios para la terapia trombolítica, o que acuden al hospital superada la ventana terapéutica (54). La extracción mediante los dispositivos de segunda generación (“stent retrievers”) y el rt-PA pueden aplicarse incluso en combinación, duplicando la tasa de recanalización a las 24 horas sin aumentar el riesgo de hemorragia intracerebral (55). Los últimos ensayos multicéntricos realizados intentan ampliar la ventana terapéutica hasta las 24 horas, aunque sólo un pequeño porcentaje de los pacientes (3%) son adecuados para el tratamiento (56,57). Los avances en la trombectomía mecánica ampliarán la ventana terapéutica ofreciendo oportunidades para reconsiderar otras terapias, e. g. agentes neuroprotectores, para mejorar los resultados funcionales a largo plazo (54).

5.2 Neuroprotección

Debido a que sólo un pequeño porcentaje (15%) de los pacientes de ictus es susceptible de recibir los tratamientos endovasculares, y teniendo en cuenta además que no todas las recanalizaciones son eficaces, la neuroprotección ha recibido un nuevo impulso (58).

La neuroprotección intenta minimizar el efecto nocivo de la isquemia a nivel de la neurona o, desde el punto de vista clínico de los pacientes y médicos, mantener el daño cerebral por debajo del umbral de manifestación de los síntomas. Los neuroprotectores eficaces provocan una desaceleración de la muerte celular, útil para prolongar la ventana terapéutica y, por tanto, el manejo del ictus (59). Sin embargo, aún no se ha conseguido trasladar los resultados obtenidos en el laboratorio a la clínica. Parte del fracaso se debe a las estrategias seguidas que pretendían bloquear los mecanismos deletéreos que llevaban a la muerte rápida e irreversible que tiene lugar en el *core*. Sin embargo, estas estrategias han ido cambiando en busca de una aproximación más realista, la de interferir en los mecanismos moleculares implicados en que el área de penumbra progrese a infarto (60). Es en este contexto donde el sistema estrogénico surge como un posible tratamiento farmacológico potencial como terapia coadyudante en pacientes de ictus.

6. Sistema estrogénico

6.1 Esteroidogénesis

Las hormonas esteroideas se sintetizan en las gónadas y en menor medida en la corteza adrenal y otros tejidos y órganos periféricos tales como el tejido adiposo y el cerebro. Todas ellas se sintetizan en una serie de pasos enzimáticos consecutivos a partir del colesterol (esteroidogénesis). Estas hormonas desempeñan un papel crucial en funciones tan importantes como la regulación de la función reproductora, regulación de los carbohidratos, respuesta inflamatoria, respuestas de estrés y metabolismo óseo (61). Las hormonas esteroideas gonadales incluyen a los andrógenos como la testosterona, los progestágenos

como la progesterona, y los estrógenos como la estrona (E1), el 17β -estradiol (E2) y el estriol (E3) (62).

A principios de los años 70, con el descubrimiento de la presencia en el cerebro de la aromatasas, enzima responsable de la síntesis de estradiol a partir de la testosterona, y posteriormente la identificación de la maquinaria enzimática de síntesis de esteroides en el cerebro (Figura 13) (63), se acepta que las funciones cerebrales de los esteroides no están mediadas exclusivamente por las hormonas esteroideas sintetizadas periféricamente y liberadas al cerebro tras cruzar la BBB, sino que son sintetizadas *de novo* en el propio tejido neural. Por ello actualmente reciben la denominación de “neuroesteroides” (63,64). Las hormonas esteroideas regulan importantes funciones cerebrales: desarrollo del sistema nervioso central y periférico, regulación de sistemas de neurotransmisores, conectividad sináptica, ramificación dendrítica y mielinización. También están implicadas en procesos cognitivos, emoción, estado de ánimo y comportamientos sexual y social (65). Sin embargo, su completo significado funcional en el cerebro aún está por definir.

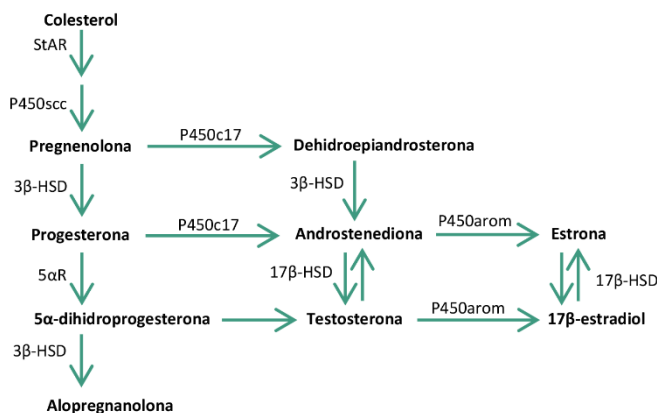


Figura 13. Vía de síntesis de los neuroesteroides. StAR: proteína reguladora esteroidogénica aguda; P450scc: escisión de la cadena lateral del citocromo P450; 3β-HSD: 3β-hidroxiesteroide deshidrogenasa/D5-D4-isomerasa; P450c17: citocromo P450 17α-hidroxilasa/c17,20-liasa; 5αR: esteroide 5α-reductasa; 3α-HSD: 3α-hidroxiesteroide deshidrogenasa, 17β-HSD: 17β-

hidroxiesteroide deshidrogenasa; y P450arom: citocromo P450arom. Los astrocitos expresan P450scc, P450c17, 3 β -HSD, 3 α -HSD, 17 β -HSD, 5 α R y P450arom, produciendo pregnenolona (Preg), progesterona, dehidroepiandrosterona (DHEA), androstenediona, testosterona, allopregnanolona (Allop). Los oligodendrocitos expresan P450scc, 5 α reductasa y 3 β -HSD y producen Preg, progesterona y Allop. Las neuronas expresan P450scc, P450c17, 3 β -HSD, 5 α -reductasa y P450arom y producen Preg, DHEA, androstenediona, Allop y E2 (Modificado de Rossetti et al. 2016)

E2 es probablemente la molécula simple más potente en el organismo humano, ya que exhibe un amplio abanico de efectos fisiológicos prácticamente en todos los órganos, y parece utilizar más vías de señalización que cualquier otra molécula (66).

6.2 Receptores estrogénicos

Las respuestas celulares producidas por los estrógenos, particularmente 17 β -estradiol, pueden atribuirse a la activación de las dos isoformas clásicas de los receptores estrogénicos (ERs): ER α y ER β , los cuales funcionan como factores de transcripción (63). Según la teoría clásica, el dímero ligando-receptor se une a través del dominio de unión a DNA al “elemento de respuesta a estrógenos” (ERE) en la región promotora de genes específicos, lo que resulta en el reclutamiento de co-activadores y co-represores que activan o reprimen la transcripción génica, respectivamente. Sin embargo, este mecanismo no explica las respuestas celulares que se producen de manera inmediata tras su exposición a E2 (Figura 14). Una posibilidad es que, a diferencia de lo que se postula en la teoría genómica clásica, E2 sea secuestrado por un (o varios) ER asociado a membrana capaz de transportar a la hormona a su través. Uno de los candidatos más sólidos es GPER (“G protein-coupled estrogen receptor”), receptor acoplado a la proteína G cuya denominación inicial fue la de GPER30, y cuya distribución en el cerebro es muy amplia (67–70). Por otra parte, y quizás de mayor relevancia, son las

evidencias de que ER α y ER β también se expresan en la membrana plasmática (63,71).

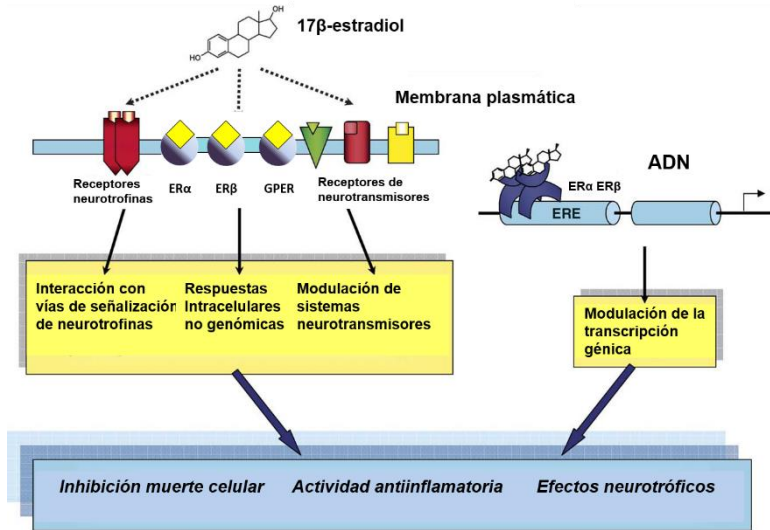


Figura 14. Mecanismos genómicos y no genómicos que median el efecto de 17 β -estradiol. La unión de la hormona a los ERE ("elementos de respuesta al estrógeno") modula la transcripción génica (mecanismos genómicos). La interacción de la hormona con los receptores localizados en la membrana plasmática activa determinadas vías de señalización intracelular. La activación de ambos mecanismos, junto con el efecto antioxidante de la hormona, son los responsables de sus efectos beneficiosos sobre la función celular.

7. Efectos beneficiosos de 17 β -estradiol en enfermedades neurológicas

Los efectos neuroprotectores de E2 han sido avalados por numerosas investigaciones, y han sido objeto de diferentes revisiones (72,73). Estudios epidemiológicos sugieren que la aparición tardía de los síntomas de la enfermedad de Parkinson en mujeres, quizás sea debida a dichos efectos neuroprotectores. También se ha sugerido que la reducción de los niveles de estrógenos tras la menopausia quizás sea la responsable de la más alta prevalencia y la mayor gravedad de la enfermedad de Alzheimer en mujeres que

en hombres. Las evidencias obtenidas en modelos animales también confirman los efectos neuroprotectores de 17β -estradiol. La inhibición de aromatasa (enzima que cataliza la conversión de andrógenos aromatizables en estrógenos) así como el empleo de ratones *knock out* para la aromatasa, reducen drásticamente los niveles de 17β -estradiol, lo cual se asocia con la deposición alterada de la proteína β -amiloide y cuadros más severos en modelos de enfermedad de Alzheimer.

La ovariectomía (OVX) es un modelo animal de menopausia quirúrgica empleado ampliamente para el estudio del papel de los esteroides sexuales en la neurodegeneración y el envejecimiento. Es una práctica estándar en los estudios sobre la terapia hormonal (TH), ya que se tiene un mayor control sobre los niveles plasmáticos de las hormonas sexuales. Diferentes estudios han demostrado que el descenso de los niveles de estrógenos potencia los procesos neurodegenerativos incrementando el daño cerebral (74,75). Como confirmación, el restablecimiento de los niveles de estrógenos revierte el daño cerebral (74,75).

En cuanto al ictus, Simpkins y colaboradores (1997) aportaron la primera evidencia de que los estrógenos, concretamente 17β -estradiol, ejercía efecto neuroprotector en el ahora popular modelo de oclusión de la arteria cerebral media (“middle cerebral artery occlusion”, MCAO) en roedores. Los autores sugirieron que E2 podría ser de utilidad en la terapéutica del ictus. Como el mismo grupo ha revisado recientemente, después de dos décadas de intensa investigación el efecto neuroprotector de E2 en modelos experimentales de ictus isquémico agudo está firmemente establecido (76). Sin embargo, el tratamiento de determinados desórdenes neurológicos, incluyendo el ictus, con estrógenos exógenos está lejos de ser factible, a lo cual han contribuido, entre otras causas, las conclusiones del programa *Women’s Health Initiative* (WHI).

7.1 El estudio *Women's Health Initiative* (WHI)

El *Women's Health Initiative* (WHI) es un programa de salud nacional a largo plazo que se desarrolla en los Estados Unidos de América, y que está orientado a la prevención de la enfermedad cardíaca, el cáncer de mama y colorrectal, y las fracturas osteoporóticas en mujeres postmenopáusicas. Lanzado en 1993, el estudio WHI incluyó a 161.808 mujeres de edades comprendidas entre 50 y 79 años en uno o más ensayos clínicos aleatorizados, para determinar los efectos sobre la salud de las siguientes intervenciones: 1) terapia hormonal (TH); 2) modificaciones dietéticas; 3) suplementación con calcio y vitamina D; ó 4) un estudio observacional. Al final del estudio en 2005, se determinó su extensión (2005-2010 y 2010-2020) como seguimiento de todas las mujeres que habían expresado su consentimiento. Nuestro interés se centra en los estudios sobre los efectos de la TH (77).

Como parte de la iniciativa WHI se han realizado dos estudios aleatorizados para objetivar los riesgos y los beneficios de la TH. El primero incluyó alrededor de 16.000 mujeres postmenopáusicas tratadas con estrógenos equinos conjugados (CEE) con acetato de medroxiprogesterona (MPA) o placebo. Después de un seguimiento de 5 años, el estudio hubo de interrumpirse por no poderse confirmar los beneficios esperados, especialmente en lo que se refiere a la prevención de la enfermedad cardiovascular. El estudio reveló, por el contrario, un mayor riesgo en el grupo de mujeres con más de 20 años desde la menopausia al inicio del estudio (78).

El segundo estudio incluyó mujeres postmenopáusicas histerectomizadas tratadas únicamente con CEE o placebo. Tras 7 años de seguimiento, el estudio no sólo no evidenció aumento alguno del riesgo coronario, sino que puso de

manifiesto el aumento de riesgo de ictus (79). Los resultados de ambos ensayos desaconsejaron el uso de la TH para la prevención de las enfermedades crónicas en mujeres postmenopáusicas. No obstante, análisis posteriores demostraron no sólo la interacción entre la aparición de eventos coronarios y la edad de las mujeres al inicio del tratamiento (la denominada “timing hypothesis”), sino también el efecto perjudicial de la asociación CEE-MPA sobre el riesgo de enfermedad coronaria. De hecho, otros estudios post-WHI apoyan la seguridad de la TH cuando se instaura de forma temprana en mujeres postmenopáusicas sanas, y han influido en las directrices recientes sobre la menopausia, incluyendo la declaración de la posición de la “North American Menopause Society” de 2017 (80).

Desde la perspectiva de las enfermedades neurológicas, los ensayos clínicos incluidos en el WHI acerca del efecto de los estrógenos (combinados o no con progestina) sobre el ictus, demencia y función cognitiva, son probablemente los más amplios (27.341 mujeres reclutadas) realizados hasta la fecha. Un metaanálisis de 29 artículos publicados en el marco del WHI concluye que el tratamiento con estrógeno, sólo o en combinación con progestina, resultó en un aumento del 50% del riesgo de ictus isquémico, y en un incremento del 76% del riesgo de demencia en mujeres mayores de 65 años. La conclusión es que la TH ejerce efectos adversos sobre el cerebro que se manifiestan en un mayor riesgo de ictus y demencia (77,81). Una alternativa prometedora podría ser la utilización de los denominados “moduladores selectivos de los receptores estrogénicos” (SERMs).

8. Moduladores selectivos de los receptores estrogénicos (SERMs)

El concepto SERM surgió de estudios preclínicos sobre tamoxifeno, una molécula que mostraba actividad agonista sobre los receptores estrogénicos (82). Los SERMs son compuestos, naturales o sintéticos, cuya indicación es la de prevenir y tratar las enfermedades derivadas de la deprivación (quirúrgica o natural) de estrógenos. El planteamiento subyacente es el de identificar moléculas que reproduzcan el papel beneficioso de E2 y que carezcan de sus efectos perjudiciales. Idealmente, un SERM debe demostrar efectos agonistas (beneficiosos) en hueso (osteoporosis), cerebro (estado cognitivo) y sistema cardiovascular (síntomas vasomotores, enfermedad coronaria) y efectos antagonistas (neutros) en los tejidos mamarios y uterinos (cáncer) (Figura 15) (83). Entre los SERMs naturales, las isoflavonas derivadas de la soja (genisteína, daidzeína, equol) han recibido una atención particular. Estudios previos de nuestro grupo han demostrado que determinadas dietas basadas en la soja con altas concentraciones de isoflavonas, así como el uso individual de genisteína, reduce el tamaño del infarto cerebral en un modelo transitorio de MCAO (tMCAO) en rata (84,85).

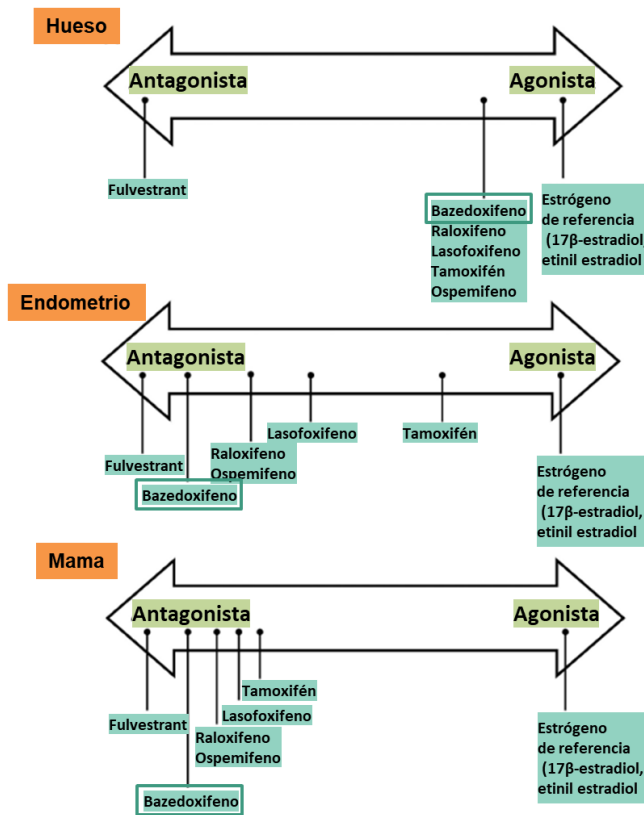


Figura 15. Potencia agonista/antagonista relativa sobre los principales tejidos diana relacionados con la menopausia, de diferentes SERMs con respecto a 17β-estradiol. La mayor potencia antagonista de bazedoxifeno en endometrio y mama y sus efectos agonistas en hueso, le confieren el perfil farmacológico más favorable.

Por lo que respecta a los SERMs sintéticos, a mediados de 1970 se caracterizó el primero de ellos, el tamoxifeno, indicado para el tratamiento del cáncer de mama. Sin embargo, fue el raloxifeno el primer SERM en ser aprobado para el tratamiento de la osteoporosis (Figura 16) (86). Diferentes estudios han demostrado que los SERMs sintéticos tienen una acción neuroprotectora en varios paradigmas de daño neuronal incluido el ictus isquémico (89–91). Entre los mecanismos de acción responsables de los efectos beneficiosos atribuidos a los SERMs sintéticos, los más relevantes son: 1) la regulación de la inflamación; 2) la

reducción de la astrogliosis y de la activación microglial; 3) la prevención de la excitotoxicidad; y 4) la prevención de la muerte neuronal. En condiciones patológicas, los mecanismos de acción de los SERMs implican la activación de los ER y las dos vías anteriormente mencionadas: la genómica y la no genómica. Se desencadenan entonces señales neuroprotectoras tales como el aumento de antioxidantes o la activación de las vías de supervivencia mediadas por kinasas (90). A pesar de los avances en el conocimiento de las vías activadas por los SERMs, sus mecanismos de acción aún no se conocen enteramente y se han suscitado algunas controversias. No obstante, el desarrollo de SERMs con mejor perfil farmacológico no se ha detenido, y fruto de esta actividad es la aparición de nuevos SERMs como el bazedoxifeno.

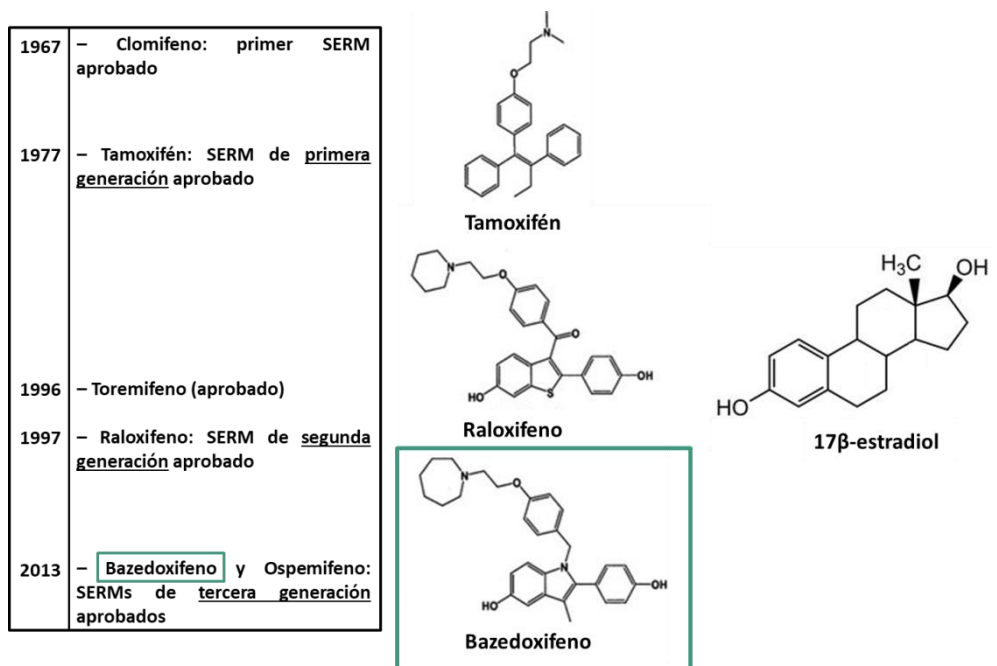


Figura 16. Cronograma del desarrollo y estructura química de los principales SERMs con aplicaciones en la clínica.

9. Bazedoxifeno

El acetato de bazedoxifeno (BZA) es el primer SERM de tercera generación aprobado para el tratamiento de la osteoporosis postmenopáusica en la UE y Japón (91). Ensayos clínicos previos con esta molécula han puesto de manifiesto efectos beneficiosos en la densidad ósea y marcadores de recambio óseo con ligera estimulación o sin ella en tejido mamario y endometrial (92). Debido a su perfil preclínico favorable, BZA ha sido seleccionado para terapia conjunta con estrógenos conjugados como nueva opción para la TH libre de progestina (93).

Al igual que el estradiol, BZA también es un ligando con gran afinidad por los receptores estrogénicos ER α y ER β , siendo un inhibidor competitivo del estradiol. Por ser estructuralmente diferente de otros SERMs; muestra un perfil único específico de tejido de la actividad de los receptores estrogénicos (94). Dependiendo del tejido, BZA posee efectos agonistas o antagonistas, efectos atribuibles a su afinidad por cada receptor estrogénico, su cambio conformacional y la diferencia de distribución de los receptores en cada tipo de tejido (95–97). Sin embargo, posee menos efectos secundarios que las terapias conjugadas con estrógeno.

Diversos estudios específicos en el tejido neuronal mostraron que BZA previene la pérdida neuronal en el hipocampo de ratas expuestas al ácido kaínico (98), disminuye la respuesta inflamatoria de los astrocitos expuestos a lipopolisacáridos (99), y atenúa la discapacidad cognitiva en ratas con daño cerebral traumático por su acción anti-inflamatoria bloqueando la vía de señalización de las MAPK (100).

Hipótesis y objetivos

Aunque los tratamientos endovasculares (trombolisis y trombectomía) constituyen el tratamiento de elección en la fase hiperaguda del ictus isquémico, sus limitaciones han evidenciado la necesidad de proporcionar simultáneamente protección farmacológica frente al daño inducido por isquemia-reperfusión (“neuroprotección coadyuvante”). En este contexto, los efectos neuroprotectores de la hormona 17 β -estradiol (E2) han sido puestos de manifiesto en modelos experimentales de daño neurológico, incluido el ictus isquémico. Sin embargo, su acción feminizante y sus efectos adversos a largo plazo determinan que su uso en humanos sea inviable. Los fármacos “moduladores selectivos de los receptores estrogénicos” (SERMs), concretamente bazedoxifeno (BZA), podría constituir una alternativa de interés por estar desprovisto de los efectos indeseables de E2, pero manteniendo sus propiedades beneficiosas. La hipótesis que se plantea, por lo tanto, es la siguiente: ***“BZA es un neuroprotector tan eficaz como E2, pero con un perfil farmacológico más favorable, en el ictus isquémico agudo con perfusión cuando se administra simultáneamente con la eliminación mecánica del coágulo ocluser. Este efecto neuroprotector se mantiene incluso en una situación más desfavorable como es aquella en la que concurre uno de los principales factores de riesgo en el ictus: la diabetes”***.

Los objetivos que se plantean son los siguientes:

1.- Analizar la influencia de la diabetes mellitus (DM) sobre la perfusión cerebrocortical así como sobre la fisiología básica de la isquemia-reperfusión, en el modelo de oclusión transitoria de la arteria cerebral media (tMCAO) mediante la técnica del filamento intraluminal en rata.

2.- Analizar la influencia de la DM sobre el daño cerebral inducido por isquemia-reperfusión en términos de valoración neurofuncional y volúmenes de infarto y edema cerebrales.

3.- Evaluar comparativamente los efectos de BZA y E2 sobre el daño cerebral inducido por isquemia-reperfusión en los términos de valoración neurofuncional y volúmenes de infarto y edema cerebrales, en condiciones de normogluemia y DM.

4.- Analizar el posible efecto de BZA y E2 sobre la expresión de receptores estrogénicos ER α , ER β y GPER en condiciones de normogluemia y DM, como mecanismo presuntamente implicado en el efecto neuroprotector de ambos ligandos estrogénicos.

5.- Analizar el posible efecto de BZA y E2 sobre la actividad de las vías de supervivencia celular, MAPK/ERK1/2 y PI3K/Akt, en condiciones de normogluemia y DM, como mecanismo presuntamente implicado en el efecto neuroprotector de ambos ligandos estrogénicos.

Material y Métodos

1. Animales de experimentación

Para este estudio se han empleado ratas Wistar macho de 300-350 g de peso (Charles River Laboratories, Barcelona, España). Las condiciones de estabulación y los procedimientos experimentales utilizados se aprobaron por el Comité de Ética en Experimentación Animal del Instituto de Investigación Sanitaria La Fe de Valencia, respetando la normativa española (RD 53/2013) que regula el uso de animales en la investigación científica. Todos los animales se mantuvieron estabulados en ciclos de 12 h luz/oscuridad, con agua y comida *ad libitum* a excepción del período de ayuno requerido para la inducción de la diabetes.

2. Modelos experimentales

2.1 Modelo de isquemia cerebral focal transitoria en rata

La preparación del modelo se lleva a cabo en dos días consecutivos. En el primer día, el animal se anestesia mediante inyección i.p. de 5 mg/kg de diazepam y 100 mg/kg de ketamina, y además se le proporciona analgesia mediante inyección s.c. de 0,1 mg/kg de buprenorfina. 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 para la separación de la piel y el periostio y exposición del cráneo. Con la ayuda de un microscopio quirúrgico se realizan una serie de trépanos para colocar el soporte de la sonda láser-Doppler: un trépano de 1 mm de diámetro situado 2 mm posterior a bregma y 3,5 mm a la derecha de la sutura sagital (coordenadas para la sonda LDF), y otros dos trépanos (T) de 0,8 mm de diámetro, uno situado 2,5 mm posterior a LDF, y otro situado 2 mm posterior a bregma y 1 mm a la izquierda de la sutura

sagital en los cuales se enroscan sendos minitornillos de acero inoxidable (Fine Science Tools) (Figura 17). Sobre el trépano LDF se coloca un cono de aguja de 21 G truncada y limada que servirá de guía para insertar la fibra óptica que se conecta a la sonda láser-Doppler, lo cual permite registrar la perfusión cerebrocortical (flujo láser-Doppler, LDF). El cono se fija al cráneo con cemento dental aprovechando el anclaje que ofrecen los tornillos. Finalmente se sutura la herida, se recupera al animal de la anestesia y se estabula.

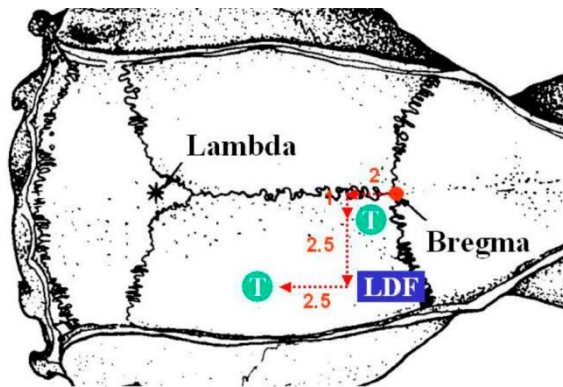


Figura 17. Diagrama de localización del soporte de la sonda LDF y tornillos de fijación. LDF: soporte para la sonda láser-Doppler; T: tornillos de fijación.

En el segundo día, el animal se anestesia con una inyección i.p. de la misma mezcla lítica a la que se añade sulfato de atropina (0,3 mg/Kg) para permitir la intubación orotraqueal con una cánula de 16 G. Al animal se le proporciona además protección analgésica mediante inyección s.c. de buprenorfina (0,1 mg/kg). Una vez intubado el animal, se posiciona en decúbito supino en 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 en N₂O y O₂ (70:30, respectivamente), un volumen corriente de 2,5 ml y una frecuencia respiratoria inicial de 55-60 ciclos/min. Bajo estas condiciones 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. La proporción de gases y frecuencia respiratoria se regulan en la fase inicial hasta alcanzar los valores fisiológicos.

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 contacto con la corteza cerebral. El otro extremo se conecta a una sonda láser-Doppler (Probe 418, Perimed AB), conectada a su vez a un medidor láser-Doppler (Periflux 4001 Master, Perimed AB). La temperatura corporal se mide mediante una sonda rectal conectada a una manta calefactora homeotérmica y se mantiene a 37 °C durante todo el experimento. 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 obtener muestras de sangre arterial (0,2 mL) para monitorizar PaO_2 , PaCO_2 y pH con un analizador de gases (ABL™5, Radiometer Medical A/S) y de 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 reperusión) del episodio de isquemia-reperusión. 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 mediante la técnica del filamento intraluminal (101), esquematizada en la Figura 18.

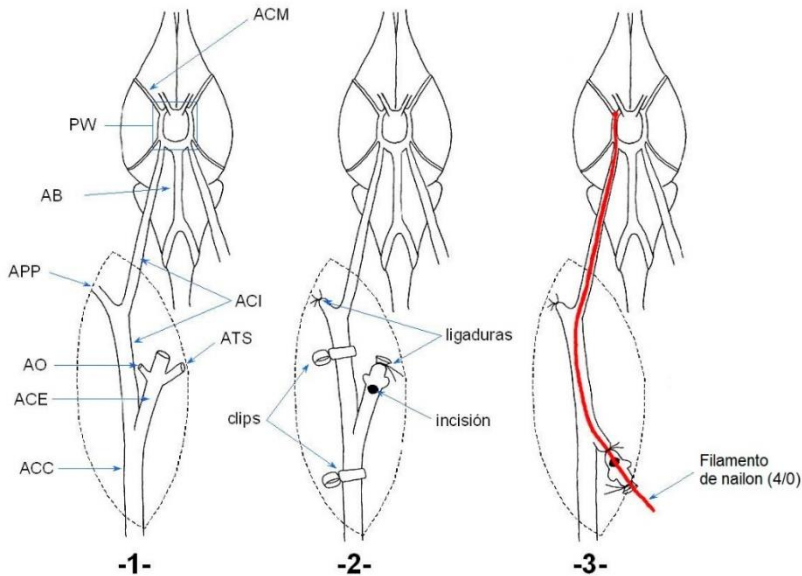


Figura 18. Anatomía vascular de la zona ventral derecha del cuello y secuencia quirúrgica de la técnica del filamento intraluminal. La línea discontinua delimita el campo quirúrgico. 1. Arteria basilar (AB); arteria carótida común (ACC); arteria carótida externa (ACE); arteria carótida interna (ACI); 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 nailón con la cabeza redondeada hasta la base de la ACM en el polígono de Willis.

Para la exposición de la arteria carótida común derecha se practica una incisión longitudinal en la línea media ventral del cuello y posteriormente se separan, por disección roma, los músculos omohioideo y esternohioideo de las glándulas submaxilares. A continuación, 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, la cual se liga en su parte distal. A continuación, 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. El siguiente paso es introducir un filamento de nilón (4/0) con la punta redondeada (por acercamiento a una fuente de calor); que avanza hasta la arteria cerebral media en su origen en el polígono de Willis. Después de comprobar que el filamento se encuentra en la luz arterial se coloca una ligadura para evitar el sangrado por la incisión, se retiran los clips y se restaura la circulación normal de la sangre.

Tras 5-10 min de registro se realiza la extracción de la primera muestra de sangre arterial (muestra control) y, si procede, se modifican los parámetros ventilatorios. De este modo se obtienen los valores basales para todas las variables. A continuación, se hace avanzar el filamento hasta que el registro de PC sufre un brusco descenso, indicativo de la oclusión de la ACM. La oclusión se mantiene durante 60 min, extrayéndose una nueva muestra de sangre arterial (muestra de isquemia) inmediatamente antes de retirar el filamento. Tras ésta maniobra tiene lugar la recuperación de los valores de PC, indicativa de la reperfusión cerebral. Tras 30 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 se estabula el animal.

2.2 Modelo de diabetes en rata

Tras un ayuno de 24 horas, se induce la diabetes mediante inyección intraperitoneal del tóxico selectivo de las células β -pancreáticas, estreptozotocina (STZ) (40 mg/kg). Los animales permanecen estabulados durante cuatro semanas en las que se les realizan controles de peso y glucemia semanalmente, partiendo de unos valores medios de glucemia de $102,6 \pm 58,9$ mg/dl y peso de $306,5 \pm 21,3$ g. Tras 4 semanas los animales alcanzaron $322,5 \pm 32,1$ g de peso y una glucemia media de $449 \pm 137,8$ mg/dl.

3. Protocolos experimentales en el modelo de isquemia cerebral focal transitoria en rata

3.1 Determinación de la cinética de BZA y E2: niveles plasmáticos

Con el fin de establecer la dosis adecuada para el tratamiento con BZA y E2, se realizaron mediciones de su concentración plasmática a diferentes tiempos. Se establecieron cuatro grupos experimentales, dos para cada tratamiento, a los que se les administró una única dosis subcutánea seguida por la implantación intraperitoneal de una bomba osmótica (Alzet modelo 2ML1 con una tasa de bombeo de 10 μ l/h, Durect Corp., Cupertino, CA, USA). Las dosis estudiadas en los grupos son: 1) bomba osmótica con E2 100 μ g/kg (n=6); 2) bomba osmótica con E2 100 μ g/kg + bolo subcutáneo E2 30 μ g/kg (n=3); 3) bomba osmótica con BZA 1 mg/kg + bolo subcutáneo BZA 1 mg/kg (n=4); y 4) bomba osmótica con BZA 1 mg/kg + bolo subcutáneo BZA 3 mg/kg (n=4).

Las muestras de plasma se obtienen a 0, 30 min, 2, 4, 8 y 24 h tras la implantación de la bomba osmótica, mediante catéter intravenoso en la vena

caudal. Las concentraciones de E2 se determinaron mediante el procedimiento IMMULITE 1000 estradiol (Siemens Healthcare España, Getafe, Madrid, España). Por otro lado, las concentraciones plasmáticas de BZA se determinaron mediante la técnica cromatografía líquida-ionización por electrospray-espectrometría de masas (LC-ESI-MS) (Figura 19).

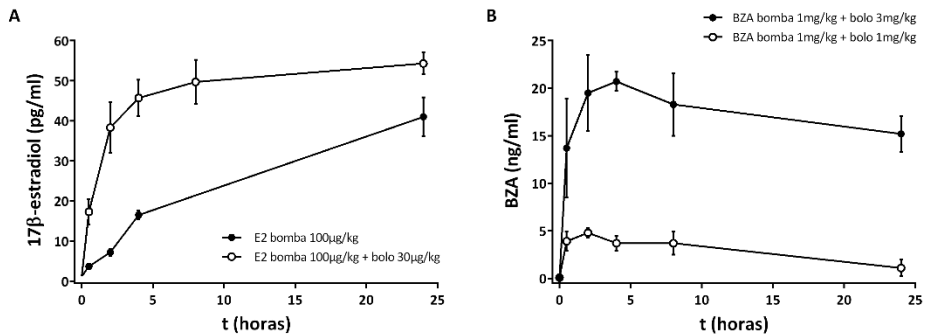


Figura 19. Perfiles plasmáticos concentración-tiempo. A) 17β-estradiol (E2) de los grupos bomba 100 µg/kg (n=6) y E2 bomba 100 µg/kg + bolo 30 µg/kg (n=3). B) BZA de los grupos bomba 1 mg/kg + bolo 1 mg/kg (n=4) y BZA bomba 1 mg/kg + bolo 3 mg/kg (n=4). Los valores se representan como la media ± EEM.

Puesto que E2 y BZA se disuelven en 100% de dimetilsulfóxido (DMSO) (1 mg/ml stock), los animales de los tres grupos experimentales recibieron la misma cantidad de DMSO: 1 mg/kg en el bolo inicial, más 10 µl/h durante 24 h mediante la bomba osmótica. Esto representa un total de 500-600 µl.

Finalmente, las dosis seleccionadas para el tratamiento fueron para BZA 1 mg/kg en la bomba osmótica más inyección de bolo subcutáneo 3 mg/kg, y para E2 100 µg/kg en la bomba osmótica más inyección de bolo subcutáneo 30 µg/kg.

3.2 Grupos experimentales

3.2.1 Criterios de exclusión

Para este estudio se utilizaron 259 ratas Wistar macho, que fueron distribuidas de manera aleatoria en seis grupos experimentales: 1) 48 ratas control, NG; 2) 34 ratas tratadas con BZA, NG; 3) 35 ratas tratadas con E2, NG; 4) 41 ratas control, DM; 5) 36 ratas tratadas con BZA, DM y 6) 44 ratas tratadas con E2, DM.

Los criterios de exclusión así como el número final de animales incluidos en cada grupo se recogen en la Tabla 1.

1. Tras la inyección de STZ los niveles de glucosa pasados tres días son inferiores a 300 mg/dl.
2. Al introducir el filamento la PC experimenta un descenso inferior al 50% del nivel basal, o no se mantiene estable durante los 60 min.
3. Al retirar el filamento la PC no recupera los valores control.
4. Muerte del animal antes de la finalización del procedimiento (24 h).
5. Pese a un patrón correcto de isquemia-reperfusión, no se observa infarto cerebral con la técnica del TTC (cloruro 2,3,5-trifeniltetrazolio).

Tabla 1. Criterios de exclusión aplicados a los diferentes grupos experimentales, con las correspondientes “n” inicial y final.

	1	Grupo	Inicial	2	3	4	5	Final	
Normoglucémicas	117	-	Control	48	6	6	8	5	23
			BZA	34	1	6	1	3	23
			E2	35	5	5	7	0	18
Diabéticas	142	21	Control	41	4	3	12	2	20
			BZA	36	1	5	5	2	23
			E2	44	1	3	13	7	20

3.2.2 Diseño del estudio

El diseño del estudio para cada uno de los grupos, normoglucémico y diabético, se ilustra en la Figura 20 y la Figura 21, respectivamente.

Una hora previa a la inducción de la isquemia se administró el tratamiento asignado a cada uno de los animales mediante un bolo subcutáneo e implantación simultánea de bomba osmótica Alzet intraperitoneal, de acuerdo a las siguientes dosis: 1) bolo subcutáneo BZA (3 mg/kg) + BZA (1 mg/kg, bomba osmótica); 2)

bolo subcutáneo E2 (30 µg/kg) + E2 (100 µg/kg, bomba osmótica); y 3) bolo subcutáneo DMSO (100 %) + DMSO (100 %, bomba osmótica).

A continuación, se indujo la isquemia-reperfusión durante 60 min. Tras 24 h se realizó la valoración neurofuncional, y los animales fueron eutanasiados siguiendo el protocolo adecuado en cada caso, para la obtención del cerebro.

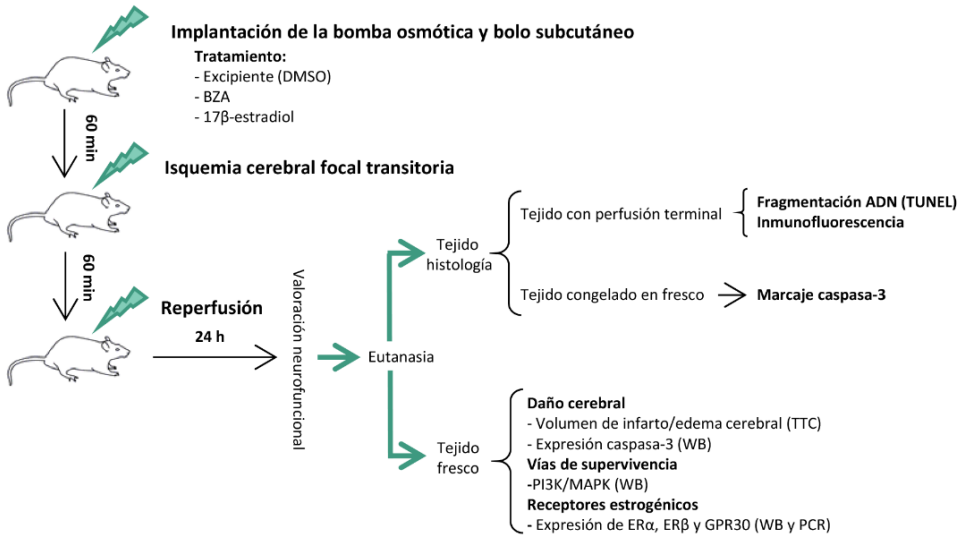


Figura 20. Cronograma de los protocolos para el estudio del efecto neuroprotector de BZA y E2 en ratas Wistar macho normoglucémicas.

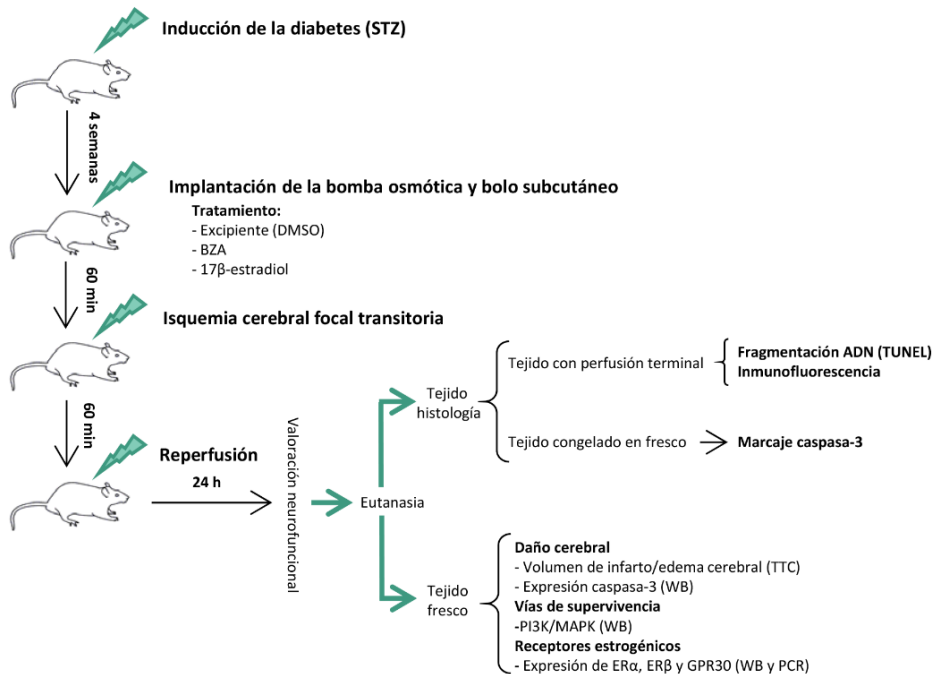


Figura 21. Cronograma de los protocolos para el estudio del efecto neuroprotector de BZA y E2 en ratas Wistar macho diabéticas.

3.3 Evaluación del daño cerebral isquémico

3.3.1 Valoración del estado neurofuncional

La afectación neurológica 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

3.3.2 Cálculo del volumen de infarto y edema cerebrales

El volumen de infarto se determina mediante tinción con cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolio (TTC) (102). 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 anestesió mediante inyección intraperitoneal de una mezcla de clorhidrato de ketamina (100 mg/Kg) y diazepam (5 mg/Kg) y se sacrificó por inyección intracardíaca de una solución de KCl (200 mg/Kg). Rápidamente se extrajo el cerebro, se sumergió en solución salina fisiológica fría (4 °C) durante 5 min y se cortó en secciones coronales de 2 mm de grosor con un cortador de tejido (Stoelting mod. 51425). Se obtuvieron 7 secciones que fueron incubadas durante 10 min a 37 °C en una solución de TTC al 2% en salino fisiológico y se fijaron durante 24 h en una solución de formaldehído al 10% en tampón fosfato sódico (PBS; 0,1 M, pH 7,4). Posteriormente, se fotografiaron con una cámara

digital (Olympus C-5050, Olympus Optical Co.LTD) ambas caras de cada sección y se cuantificó 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 dicha 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 y se calcula el porcentaje de tejido infartado respecto al tamaño total del hemisferio contralateral. Por último, se obtienen los valores de edema mediante la resta entre los valores brutos y los corregidos.

3.4 Técnicas de análisis histológico

3.4.1 Preparación del tejido

Para el estudio histológico se realizó perfusión intracardiaca bajo anestesia, con solución salina (0,9%) más heparina (1%) seguida de paraformaldehído (PFA) al 4%. Una vez concluida la perfusión se extrajo el cerebro el cual se post fijo por inmersión durante 24 h en el mismo fijador. Pasadas 24 h se realizaron lavados en tampón fosfato (PB) 0,1 M pH 7,4, y las muestras se crioprotegieron en sacarosa al 30% durante 24-48 h a 4 °C, para posteriormente encastrarlas en OCT (VWR) y congelarlas. Con el micrótopo (Microm HM440E) se realizaron cortes coronales de 50 μm en 6 series, que se mantuvieron en flotación con PBS-azida hasta su uso.

Por otro lado, para el estudio funcional de la caspasa-3 se utiliza tejido sin fijar por lo que, previa anestesia del animal, se sacrificó por inyección intracardíaca de cloruro potásico (200 mg/kg), se extrajo el cerebro, y se congeló en metilbutano (Sigma-Aldrich, Madrid, España) enfriado a $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ con nitrógeno líquido. Se cortaron secciones coronales de $18\text{ }\mu\text{m}$ de grosor, de la zona ubicada entre 0,2 y -1,8 mm desde bregma. Los cortes se depositaron sobre portas gelatinizados y conservaron a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su utilización.

3.4.2 Fragmentación de DNA: detección de apoptosis por el método de TUNEL

El método de TUNEL se ha utilizado para estudiar la fragmentación de DNA apoptótico. Consiste en marcar, con nucleótidos modificados, el extremo libre 3'-OH de los fragmentos de DNA 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 DNA con fluorescencia de color rojo.

Cada sección se incubó con Tritón X-100 (0,1%) y citrato sódico (0,1%), para permeabilizar y desenmascarar el antígeno, tras lo cual se incubó con $50\text{ }\mu\text{L}$ del kit de TUNEL durante 1 h a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ en ambiente húmedo. Posteriormente, las secciones se incubaron con $50\text{ }\mu\text{L}$ de 4',6-diamino-2-fenilindol (DAPI; 1:5.000, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) para marcar los núcleos celulares y, finalmente, se montaron con ProLong Gold (Thermo Fisher Scientific) y se dejaron secar durante toda la noche en oscuridad. Posteriormente las secciones se visualizaron al microscopio de fluorescencia (LEICA DM 4500B) y se

adquirieron imágenes para su análisis. Se cuantificó mediante el programa Image J, el número de células TUNEL+ respecto a células teñidas con DAPI.

3.4.3 Cuantificación de la actividad caspasa-3

En este caso se utilizó 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 DEVD-fluorometilcetona (DEVD-FMK), inhibidor selectivo de caspasa-3. El reactivo FAM-DEVD-FMK entra en las células y se une irreversiblemente a caspasa-3 activada, visualizándose de color verde al microscopio de fluorescencia.

Cada sección se incubó con 50 μ L de FAM-DEVD-FMK (1,5X) durante 2 horas a 37 °C en ambiente húmedo, se lavó 3 veces con el correspondiente tampón (*wash buffer*, 1X), se fijó con PFA 4% durante 1 h con 100 μ L de la solución correspondiente, se montó con ProLong Gold (Thermo Fisher Scientific) y se dejó solidificar durante la noche en oscuridad. Posteriormente las secciones se visualizaron al microscopio de fluorescencia (LEICA DM 4500B) y se adquirieron imágenes para su análisis. Se cuantificó mediante programa Image J, la intensidad de fluorescencia respecto al área de la imagen.

3.4.4 Inmunofluorescencia

Los ensayos de inmunofluorescencia se emplearon para determinar la localización celular de los antígenos de interés mediante el uso de anticuerpos altamente sensibles y de gran especificidad.

Se emplearon muestras de tejido fijado que se incubaron con tampón citrato sódico pH 6 durante 30 min a 80 °C para desenmascarar el antígeno; para

bloquear las uniones inespecíficas se empleó un tampón de bloqueo (PBS al 75%, 5% de BSA (seroalbúmina bovina), 10% de saponina al 0,2% y 10% NGS (*normal goat serum*)). Posteriormente, dichas muestras se incubaron durante toda la noche con los anticuerpos primarios en cámara húmeda a 4 °C (Tabla 2). Tras la incubación se lavaron las muestras con PBS frío. A continuación, el anticuerpo secundario con un fluorocromo conjugado se diluyó 1:200 en el tampón anterior y la muestra se incubó durante 1 h a temperatura ambiente en oscuridad. Para el marcaje de los núcleos, las muestras se incubaron las muestras 5 min con DAPI 1:5.000 (Thermo Fisher Scientific). Por último, las muestras se montaron con medio de montaje (Prolong Gold Antifade Mountant, ThermoFisher Scientific). Una vez secas las preparaciones se visualizaron con microscopio de fluorescencia (LEICA DM 4500B, Leica Microsystems, Barcelona, Spain), equipado con sistema de análisis de imagen (LEICA DFC 300 FX camera con LEICA application suite V4).

Tabla 2. Relación de anticuerpos primarios y sus diluciones utilizados para la detección por inmunofluorescencia

Proteína diana	Dilución	Especie origen	Proveedor
Receptor estrogénico α	1:400	Policlonal conejo	Abcam
Receptor estrogénico β	1:250	Policlonal conejo	Thermo Scientific
GPER30	1:200	Policlonal conejo	Abcam

3.5 Análisis de la expresión de genes mediante PCR cuantitativa

3.5.1 Aislamiento de RNA

Para el análisis de expresión génica (sección de cerebro entre 0,2 y -1,8 mm desde bregma), se extrajo mRNA homogenizando las muestras con reactivo

TRIZOL (Sigma-Aldrich), mediante protocolo sugerido por la casa comercial. Las muestras se centrifugaron a 12.000 g durante 10 min, la fase superior se recogió y mezcló con cloroformo para centrifugar de nuevo; la fase acuosa se mezcló con isopropanol para la precipitación de RNA. El RNA se eluyó con 50 μ l de agua libre de RNAsas. La pureza del RNA aislado se valoró por espectrofotometría, midiendo la absorbancia de los ácidos nucleicos a 260 nm y del material proteico a 280 nm. El cociente entre los dos, A260/A280, se utilizó como índice de la contaminación de la muestra proteica. El RNA se considera puro cuando la ratio está comprendido entre 1,8 y 2 (103).

3.5.2 Retro-transcripción y amplificación del RNA

Para el estudio de la expresión de los genes de interés, una vez extraído el RNA mensajero (mRNA) total, se realizó una retrotranscripción para obtener su DNA complementario (cDNA).

Para realizar la retrotranscripción de RNA a cDNA son necesarias un tipo de DNA polimerasas particulares llamadas transcriptasas inversas o retrotranscriptasas. Las enzimas utilizadas proceden de algunos retrovirus, que son virus que presentan RNA como genoma, en lugar de DNA. El kit que se utilizó es *RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit*[®] de Thermo Scientific (Waltham, USA) a 42 °C durante 50 min, utilizando como cebadores hexámeros aleatorios. Para inactivar la enzima se incubó la muestra a 70 °C durante 15 min.

3.5.3 Análisis de DNA complementario por PCR cuantitativa

Posteriormente, mediante PCR se amplificaron 10 ng de cDNA utilizando cebadores (“primers”) para cada uno de los genes. Todas las muestras se procesaron por triplicado y se trataron de forma simultánea.

La expresión de los genes se cuantificó mediante análisis por PCR en tiempo real (RT-qPCR) utilizando un termo-ciclador con un sistema de detección de fluorescencia iQTM5 Multicolor Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad, California, EEUU). Como gen de referencia se utilizó *Rplp0* (Tabla 3).

Las condiciones de amplificación fueron 1 ciclo de desnaturalización de 10 min a 95 °C, 40 ciclos de 15 segundos de desnaturalización a 95 °C, 30 segundos a 60-64 °C como temperatura de anillamiento, y 30 segundos de elongación a 72 °C.

Tabla 3. Secuencias de los cebadores para la determinación de mRNA mediante RT-qPCR.

Gen diana	Especie	Secuencia forward (5'-3')	Secuencia reverse (5'-3')
<i>Esr1</i>	Rata	TACGAAGTGGGCATGATGAA	GGCGGGGCTATTCTTCTTAG
<i>Esr2</i>	Rata	CTCACGTCAGGCACATCAGT	GGTTCTGGGAGCTCTCTTTG
<i>Gper1</i>	Rata	GCTGCAACTACTCCAGCACA	TGTTCCAGAGAGGTCCCCAGT
<i>Rplp0</i>	Rata	CAGCAGGTGTTTGACAATGG	CCCTCTAGGAAGCGAGTGTG

3.6 Análisis de la expresión proteica mediante Western blot

3.6.1 Extracción y cuantificación de proteínas

Para la obtención de los extractos proteicos se empleó la sección de cerebro entre 0,2 y -1,8 mm desde bregma, que se dividió en hemisferios ipsilateral y contralateral. Cada uno de los hemisferios se homogeneizó mediante Ultra-Turrax (mod. T8, IKA-WERKE) en tampón de lisis (ProteoJet™ mammalian cell lysis reagent, Fermentas), suplementado con inhibidores de proteasas y fosfatasa al 1 % (Sigma-Aldrich). A continuación, la muestra se centrifugó a 15.000 g, 15 min, 4

°C. La concentración de proteínas de los sobrenadantes se determinó según el método colorimétrico de BCA (Thermo Scientific) y midiendo la absorbancia de las muestras a 562 nm. Los valores obtenidos se interpolaron en una recta patrón de BSA (Roche) de rango 0,01 mg/ml-20 mg/ml.

3.6.2 Electroforesis y transferencia

Las proteínas se separaron en función de su peso molecular mediante electroforesis desnaturizante (SDS-PAGE). Para ello, se mezclaron 40 µg de proteína con el volumen adecuado de tampón de carga (NuPAGE LDS, Invitrogen) y se incubaron a 70 °C durante 10 min.

Una vez desnaturalizadas, las muestras se cargan en geles comerciales de gradiente de poliacrilamida en gradiente del 4-12 % (NuPAGE Bis-Tris, Invitrogen) y se someten a electroforesis utilizando el sistema Invitrogen Precast Gel System en un tampón NuPAGE MOPS SDS (Invitrogen). Así mismo, se utilizó un marcador de peso molecular (Precision Plus Protein™ Standards Dual Color, Bio-Rad).

Una vez realizada la electroforesis, las proteínas presentes en el gel se transfieren en seco a membranas de nitrocelulosa de 0,2 µm utilizando el sistema Trans-Blot® Turbo Transfer System de Dry Blotting System (Bio-Rad) durante 10 min a 25 V (2.5 A).

3.6.3 Inmunodetección

Para la inmunodetección, en primer lugar se bloquearon las uniones inespecíficas con una solución de bloqueo de leche desnatada al 5 % en TBS-Tween (0,05 %) durante 60 min en agitación suave a temperatura ambiente. A continuación, se incubaron durante toda la noche a 4 °C con los anticuerpos

primarios diluidos en leche al 5 % en TBS-Tween, dirigidos contra las proteínas especificadas en la Tabla 4.

Para la detección de la proteína, tras varios lavados, las membranas se incubaron con el anticuerpo secundario correspondiente (Tabla 5) conjugado a peroxidasa (“*horseradish peroxidase*”, HRP).

Tabla 4: Relación de anticuerpos primarios y sus diluciones utilizados para *Western blot*

Proteína diana	Peso molecular	Dilución	Especie origen	Proveedor
Receptor estrogénico α	68 kDa	1:500	Policlonal conejo	Abcam
Receptor estrogénico β	60 kDa	1:250	Policlonal conejo	Thermo scientific
GPER30	55 kDa	1:500	Policlonal conejo	Abcam
Caspasa-3 activada	19/17 kDa	1:500	Policlonal conejo	Cell Signaling
p-ERK1/2	44/42 kDa	1:2.000	Monoclonal conejo	Cell Signaling
ERK1/2	44/42 kDa	1:5.000	Monoclonal conejo	Millipore
p-Akt	60 kDa	1:5.00	Monoclonal conejo	Cell Signaling
Akt	60 kDa	1:1.000	Monoclonal conejo	Millipore
β -actina	42 kDa	1:10.000	Monoclonal conejo	Sigma

Tabla 5: Lista de anticuerpos secundarios empleados para *Western blot*

Anticuerpo secundario	Dilución	Especie origen	Proveedor
Anti-rabbit	1:2.000	Cabra	Bio-Rad
Anti-mouse	1:2.000	Cabra	Bio-Rad

Por último, tras lavar en agitación con TBS-Tween para eliminar el exceso de anticuerpo secundario, las membranas se incubarán con el reactivo comercial ECL (Pierce, Thermo Scientific), que permite la detección por quimioluminiscencia de los anticuerpos conjugados con HRP. El luminol del ECL, en presencia de peróxido de hidrógeno, se transforma por la HRP en un dianión excitado el cual emite luz al volver al estado fundamental, y esta luz es captada por una cámara de quimioluminiscencia. En nuestro caso utilizamos el sistema ChemiDoc™ XRS+ de Bio-Rad. La señal obtenida se analizó mediante densitometría utilizando el software Scion Image beta 4.0.3.

4. Fármacos y reactivos

BZA (1-[[4-[2-(hexahidro-1H-azepin-1-il) etoxi] fenil] metil]-2-(4-hidroxifenil)-3-metil-1H-indol-5-ol, acetato) (Axon Medchem, Groningen, Países Bajos); E2 (Sigma-Aldrich, Madrid, España); DMSO (Merck, Darmstadt, Alemania); STZ (Sigma-Aldrich, Madrid, España); diazepam (Valium®, Roche Pharma, Basilea, Suiza); ketamina (Ketolar®, Parke-Davis, Detroit, EEUU); buprenorfina (Buprex®, Schering-Plough, Kenilworth, EEUU); atropina (B. Braun, Melsungen, Alemania); sevoflurano (Sevorane®, Abbot, Chicago, EEUU); 2,3,5-trifeniltetrazolio (Sigma-Aldrich, Madrid, España); paraformaldehído 4% (VWR, Radnor, EEUU); heparina (Laboratorios farmacéuticos Rovi, España); 2-metilbutano (Merck, Darmstadt, Alemania); sacarosa (Sigma-Aldrich, Madrid, España).

5. Análisis estadístico

Los valores de PC se expresan porcentualmente respecto de los valores basales. Los valores de PAS, P_aO_2 y P_aCO_2 se expresan en valores absolutos (mmHg). Los valores de glucemia se expresan en valores absolutos (mg/dl). Todos estos valores se representan como media aritmética \pm desviación estándar de la media (DEM) (Tablas) o media aritmética \pm error estándar de la media (EEM) (Figuras). Los volúmenes de infarto y edema, la actividad caspasa-3, el recuento de células TUNEL+, y los resultados de WB se representan como media aritmética \pm EEM. La valoración neurofuncional se representa como la mediana y el rango intercuartil.

El análisis de los datos se realizó con el programa GraphPad InStat 3.06. Las comparaciones estadísticas se realizaron mediante análisis de la varianza (ANOVA) para muestras independientes seguido del post test Dunnet (parámetros fisiológicos, volumen de infarto, edema, TUNEL, actividad caspasa 3, WB); 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. Influencia de la diabetes sobre la fisiología básica de la isquemia-reperfusión

En la Figura 22 se muestra el registro representativo de un episodio de isquemia-reperfusión en nuestro modelo experimental de tMCAO. Con el deslizamiento del filamento a través de la carótida interna hasta el origen de la ACM, se produce un descenso inmediato de la señal de PC (isquemia). Transcurridos 60 min se retira el filamento y se recupera la señal de PC (reperfusión) hasta niveles que pueden superar transitoriamente al nivel basal (hiperemia reactiva). Dichas deflexiones en el registro no se acompañaron de cambios en la PAS ni en la temperatura corporal.

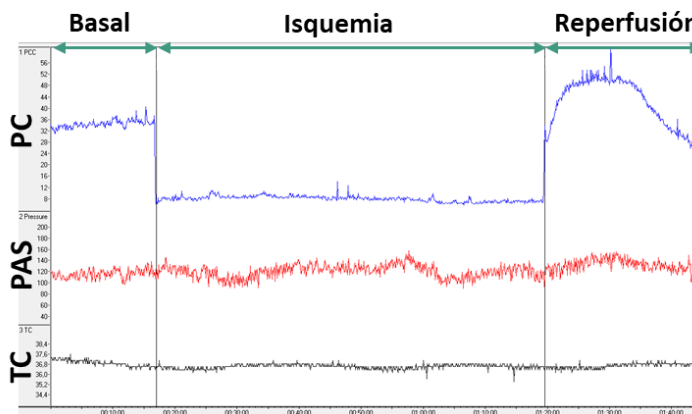


Figura 22. Registro representativo de un episodio de isquemia-reperfusión en nuestro modelo experimental de tMCAO en una rata normoglucémica. PC = perfusión cerebrocortical (%; trazado azul); PAS = presión arterial sistémica (mmHg; trazado rojo); TC = temperatura corporal (°C; trazado negro), durante las tres fases del procedimiento MCAO: pre-oclusión (basal), oclusión (isquemia) y perfusión.

La cuantificación de PC y PAS se presenta en la Figura 23. Los valores de PC durante los 60 min de oclusión fueron significativamente menores que los valores basales, con una reducción aproximada del 60% tanto para animales normoglucémicos como diabéticos. Durante los primeros 30 min de perfusión,

la PC aumentó a valores hiperémicos con un incremento del 70% respecto a los valores basales tanto para animales normoglucémicos como diabéticos (Figura 23A). No se objetivaron cambios en los valores de PAS entre las tres fases del episodio de isquemia-reperfusión para cada uno de los grupos experimentales (Figura 23B). De hecho, el análisis estadístico no reveló diferencias significativas en el patrón de isquemia-reperfusión entre los animales normoglucémicos y diabéticos.

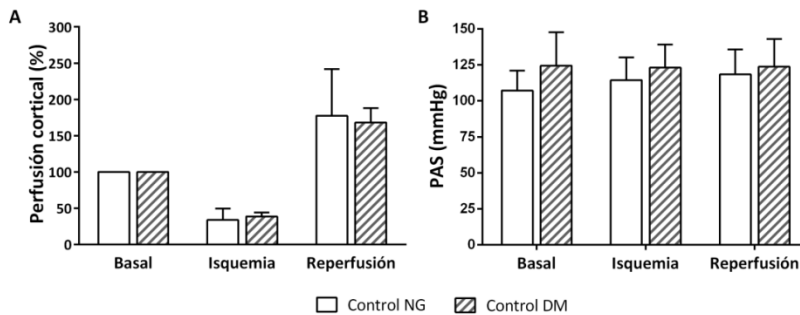


Figura 23. (A) Valores de perfusión cortical y (B) presión arterial sistémica (PAS) registrados durante las tres fases del episodio isquémico: basal, isquemia y reperfusion, en animales normoglucémicos (NG, n=23) y diabéticos (DM, n=16). Los valores de PC se expresan como porcentaje de los valores basales, y los de PAS en unidades de presión absolutas (mmHg). Los datos se representan como media±EEM.

En cuanto al resto de parámetros fisiológicos, la variación de los valores de $P_a\text{CO}_2$ y pH durante el episodio de isquemia-reperfusión mostró diferencias dependiendo del estado glucémico de los animales. Durante el período de isquemia en el grupo de animales normoglucémicos, se produjo un descenso en los niveles de pH (acidosis) y un incremento en los niveles de $P_a\text{CO}_2$ (hipercapnia). En contraste, en el grupo de animales diabéticos las diferencias no fueron significativas para ambos parámetros. En los valores de $P_a\text{O}_2$ tampoco se registraron diferencias significativas ni entre las diferentes fases ni entre ambos grupos. Los valores de glucemia no difirieron significativamente en las diferentes

etapas en cada uno de los grupos experimentales. Todos estos valores se muestran en la Tabla 6.

Tabla 6: Parámetros fisiológicos en muestras de sangre arterial obtenidas durante las tres fases del procedimiento tMCAO.

	Control NG (n=23)			Control DM (n=16)		
	Basal	Isquemia	Reperusión	Basal	Isquemia	Reperusión
pH	7,38±0,12	7,29±0,12**	7,30±0,10*	7,41±0,1	7,39±0,08	7,41±0,08
P _a O ₂ (mmHg)	96,8±24,1	89,9±33,8	104,5±31,6	86,6±25,5	108,5±28,7	126,4±40,7
P _a CO ₂ (mmHg)	43,8±16,1	52,8±17,3**	51,5±13,8	43,7±13,5	42,3±10,4	38,3±10,4
Glucosa (mg/dl)	107,4±29,2	110,0±19,0	114,7±25,9	364,9±167,3 ^{###}	356,5±178,9	378,1±166,6

Los datos se expresan en valores absolutos y se representan como media±DEM. *p<0,05 y **p<0,01, significativamente diferente del correspondiente valor basal. ^{###}p<0,001, significativamente diferente del correspondiente valor basal del grupo de animales normoglucémicos.

2. Influencia de la diabetes sobre el daño cerebral isquémico

2.1 Valoración neurofuncional

La valoración neurofuncional tras 24 h del episodio isquémico dio como resultado una puntuación significativamente mayor en los animales diabéticos (6[4,6]) que en los normoglucémicos (2[2,3]), indicativa de un mayor déficit neurológico en condiciones de diabetes (Figura 24).

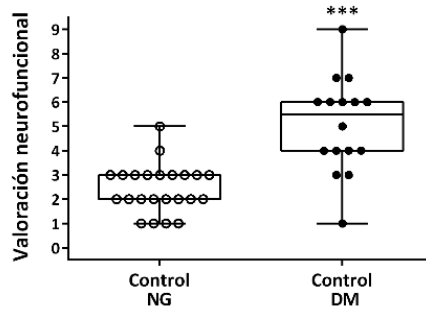


Figura 24. Puntuación neurofuncional obtenida por los animales normoglucémicos (NG) (n=23) y diabéticos (DM) (n=16) a las 24 h tras isquemia-reperfusión. Los datos se expresan como la mediana con su rango intercuartil. *** $p < 0,001$, significativamente diferente de los animales normoglucémicos.

2.2 Volúmenes de infarto y edema cerebrales

Pese a sus diferencias en el estado neurofuncional, los valores medios de volumen de infarto cerebral no fueron estadísticamente diferentes entre animales normoglucémicos y diabéticos. Esto se objetiva tanto para el infarto considerado en su conjunto, como para el infarto considerado separadamente en las regiones cortical y subcortical (Figura 25A). Los valores de edema entre los dos grupos tampoco mostraron diferencias significativas (Figura 25B).

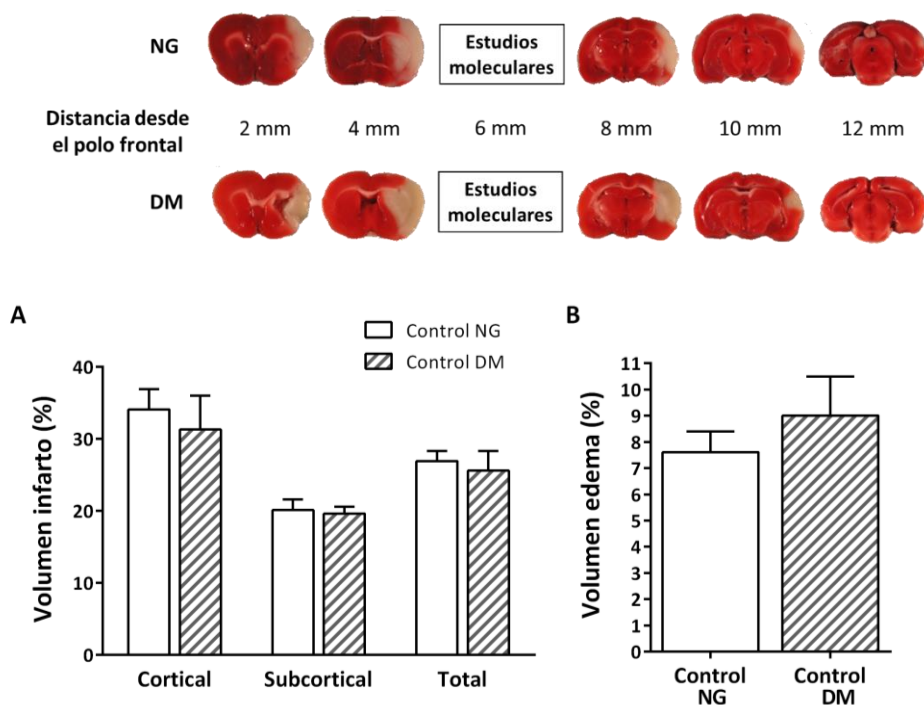


Figura 25. (A) Volúmenes de infarto cortical, subcortical y total, y (B) valores de edema obtenidos en animales normoglucémicos (NG, n=23) y diabéticos (DM, n=16) tras 24 h del episodio de isquemia-reperusión. Los valores de volumen de infarto se expresan porcentualmente respecto a la correspondiente región contralateral, y los de edema se obtienen de la sustracción entre los volúmenes de infarto brutos y corregidos. Los datos se representan como media±EEM. Las imágenes insertadas corresponden a las secciones cerebrales y muestran el área de infarto representativa de cada uno de los grupos experimentales. El tejido infartado muestra ausencia de coloración, mientras que el tejido sano presenta coloración roja tras su exposición a TTC.

3. Efecto de BZA y E2 sobre la respuesta fisiológica durante isquemia-reperusión en condiciones de normoglucemia y diabetes

En el epígrafe 1.1 anterior se ha descrito la respuesta fisiológica a isquemia-reperusión en animales normoglucémicos y diabéticos exentos del tratamiento con BZA y E2, establecidos por tanto como controles. Con el fin de determinar las posibles diferencias entre dichos controles y los grupos tratados, en el presente apartado se consignan separadamente los resultados obtenidos en los tres grupos

de animales normoglucémicos por una parte (Figura 26, Tabla 7) y en los tres grupos de animales diabéticos por otra (Figura 27, Tabla 8), para cada una de las fases del episodio isquémico: basal, isquemia y reperfusión.

En cuanto a los animales normoglucémicos, los perfiles fisiológicos básicos durante la isquemia-reperfusión fueron muy similares, con reducciones de PC en la fase de oclusión (isquemia) del 60%, 55% y 60% aproximadamente para los grupos control, destinado a tratamiento con BZA y destinado a tratamiento con E2, respectivamente (Figura 26A). Durante la reperfusión, los incrementos de PC fueron aproximadamente del 70%, 100% y 90%, respectivamente. Los valores medios de PAS no presentaron diferencias significativas ni entre el correspondiente grupo control y los grupos destinados a tratamiento, ni entre las tres fases del episodio isquemia-reperfusión (Figura 26B). Por lo que respecta al resto de parámetros fisiológicos y valorados globalmente, se observó reducción de pH (acidosis) y elevación de $P_a\text{CO}_2$ (hipercapnia) durante la fase isquémica, sin cambios significativos en los valores de $P_a\text{O}_2$ y glucemia en ninguna de las tres fases (Tabla 7).

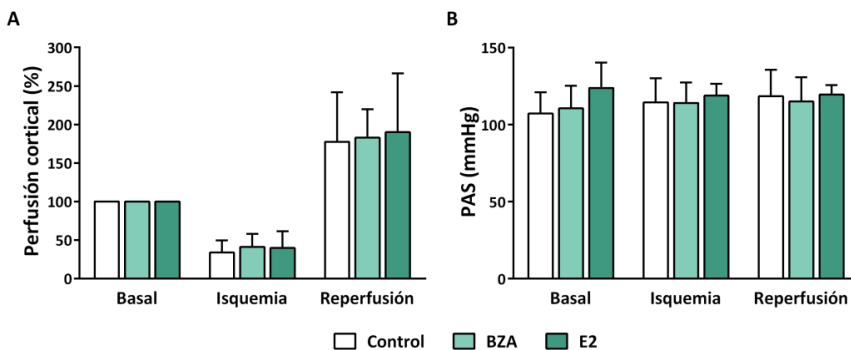


Figura 26. (A) Valores de perfusión cortical y (B) presión arterial sistémica (PAS) registrados durante isquemia-reperfusión en los tres grupos de animales normoglucémicos: Control (n=23), BZA (n=22) y E2 (n=18). Los valores de PC se expresan porcentualmente respecto de los valores basales, y los de PAS en valores absolutos (mmHg). Los datos representan la media±EEM.

Tabla 7. Parámetros fisiológicos en muestras de sangre arterial obtenidas durante el procedimiento quirúrgico en los tres grupos experimentales normoglucémicos.

	Control (n=23)			BZA (n=22)			E2 (n=18)		
	Basal	Isquemia	Reperusión	Basal	Isquemia	Reperusión	Basal	Isquemia	Reperusión
pH	7,38±0,12	7,29±0,12**	7,30±0,10*	7,38±0,05	7,26±0,08**	7,29±0,09*	7,48±0,04	7,26±0,07**	7,25±0,10**
P _a O ₂ (mmHg)	96,8±24,1	89,9±33,8	104,5±31,6	89,1±23,0	103,8±40,8	125,4±50,1	108,3±20,8	86,0±17,5	106,04±37,9
P _a CO ₂ (mmHg)	43,8±16,1	52,8±17,3**	51,5±13,8	41,7±6,2	53,8±17,6**	41,9±14,3	34,0±3,8	62,0±13,7**	56,0±23,2
Glucosa (mg/dl)	107,4±29,2	110,0±19,0	114,7±25,9	118,1±22,4	131,9±22,6	131,8±31,8	104,7±19,7	121,0±11,5	139,3±27,7

Los datos se expresan en valores absolutos y se representan como media±DEM. *p<0,05 y **p<0,01, significativamente diferente del correspondiente valor basal.

En cuanto a los animales diabéticos, los resultados fueron similares a los obtenidos en animales normoglucémicos: 1) reducciones significativas de PC durante la isquemia (Control 60%, BZA 58% y E2 60%) e incrementos significativos de PC durante la reperusión (Control 70%, BZA 35% y E2 40%), ambas de magnitudes similares entre los tres grupos experimentales (Figura 27A); y 2) ausencia de cambios significativos en los valores de PAS entre los tres grupos experimentales y entre las tres fases (Figura 27B). Sin embargo, ninguno de los tres grupos experimentales presentó acidosis e hipercapnia durante la fase isquémica, a diferencia de los animales normoglucémicos (Tabla 8).

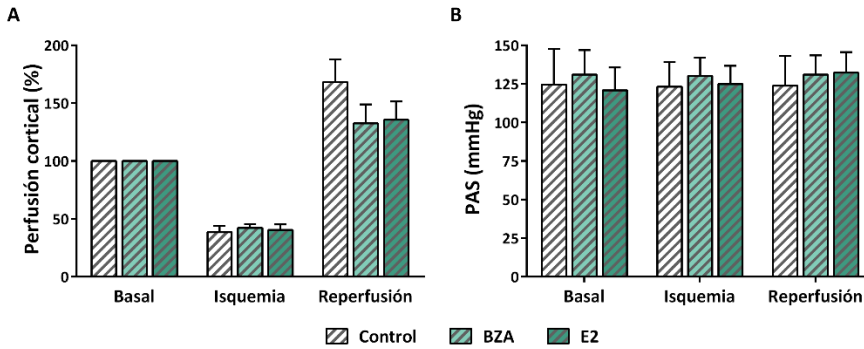


Figura 27. (A) Valores de perfusión cortical y (B) presión arterial sistémica (PAS) registrados durante isquemia-reperusión en los tres grupos de animales diabéticos: Control (n=16), BZA (n=19) y E2 (n=16). Los valores de PC se expresan porcentualmente respecto de los valores basales, y los de PAS en valores absolutos (mmHg). Los datos representan la media±EEM.

Tabla 8. Parámetros fisiológicos en muestras de sangre arterial obtenidas durante el período de la cirugía en los tres grupos experimentales diabéticos.

	Control (n=16)			BZA (n=19)			E2 (n=16)		
	Basal	Isquemia	Reperusión	Basal	Isquemia	Reperusión	Basal	Isquemia	Reperusión
pH	7,41±0,10	7,39±0,08	7,41±0,08	7,39±0,08	7,39±0,07	7,42±0,09	7,41±0,1	7,40±0,08	7,39±0,07
P _a O ₂ (mmHg)	86,6±25,5	108,5±28,7	126,4±40,7	91,1±29,8	106,6±35,3	122,7±30,9**	145,7±129,9	146,6±129,3	135,7±92,9
P _a CO ₂ (mmHg)	43,7±13,5	42,3±10,4	38,3±10,4	47,0±13,3	45,9±10,7	39,2±9,85	47,0±19,1	48,0±21,4	48,7±24,2
Glucosa (mg/dl)	364,9±167,3	356,5±178,9	378,1±166,56	488,1±142,6	487,0±144,6	489,3±153,7	452,6±125,9	443,7±139,2	480,8±119,3

Los datos se expresan en valores absolutos y se representan como media±DEM. **p<0,01, significativamente diferente del correspondiente valor basal.

4. Efecto de BZA y E2 sobre el daño cerebral tras isquemia-reperfusión en condiciones de normoglucemia y diabetes

4.1 Valoración neurofuncional

A las 24 h del episodio isquémico, el deterioro neurofuncional de las ratas normoglucémicas tratadas con E2 tendió a disminuir, mientras que en aquellas tratadas con BZA fue significativamente menor respecto a los controles (Figura 28A). Por el contrario, la puntuación neurofuncional fue significativamente menor tanto en animales diabéticos tratados con BZA como con E2 (Figura 28B).

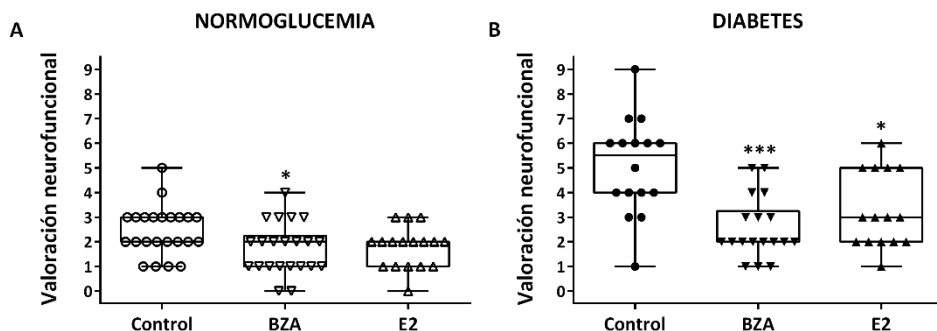


Figura 28. Puntuación neurofuncional de ratas normoglucémicas (NG) (A) y diabéticas (DM) (B) sometidas a isquemia-reperfusión y tratadas con el solvente (Control, n=23 NG, n=16 DM), BZA (n=22 NG, n=18 DM) y E2 (n=17, n=15 DM). Los datos se expresan como la mediana con su rango intercuartil. * $p < 0,05$, y *** $p < 0,001$, significativamente diferente del grupo control.

4.2 Volúmenes de infarto y edema cerebrales

En cuanto al grupo de animales normoglucémicos, el análisis morfométrico puso de manifiesto que los grupos tratados con BZA y E2 experimentaron una disminución significativa de los valores totales de infarto cerebral al ser comparados con el grupo control (26,9% versus 18% y 18,2%, respectivamente). El análisis por regiones mostró una reducción significativa del infarto en la zona

cortical del grupo tratado con BZA, mientras que en el grupo de los animales tratados con E2 la reducción del tamaño de infarto fue estadísticamente significativa en la región subcortical (Figura 29A). En la Figura 29B se muestra el volumen de infarto en las siete secciones coronales. La reducción del tamaño de infarto en los grupos tratados resultó significativamente estadística en las secciones 2, 3 y 5 para BZA, y 2 y 3 para E2. Por otro lado, el volumen del edema no mostró diferencias significativas en ninguno de los grupos tratados (Figura 30).

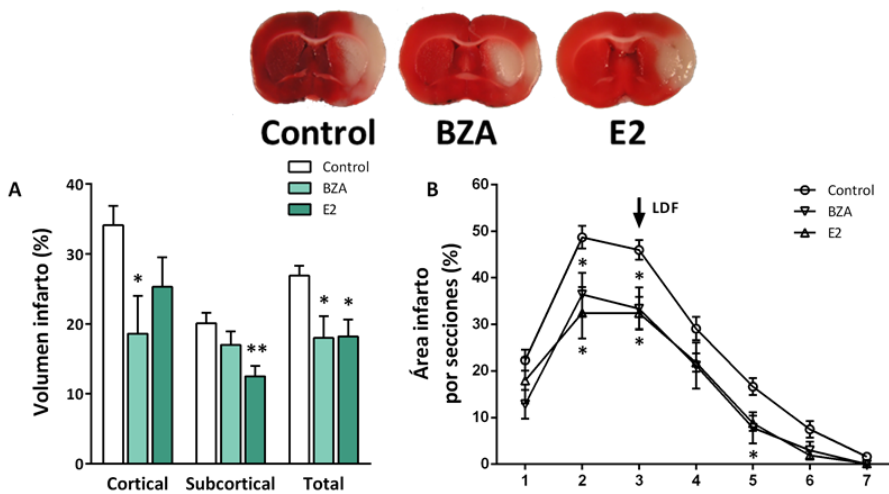


Figura 29. (A) Volumen de infarto cortical, subcortical y total, tras 24 h del episodio isquémico, en ratas normoglucémicas tratadas con el solvente (Control, n=12), BZA (n=11) y E2 (n=8). (B) Área de infarto a lo largo de las 7 secciones coronales. Los datos se expresan porcentualmente respecto del volumen de la correspondiente región contralateral, y se representan como media±EEM. *p<0,05 y **p<0,01, significativamente diferente del control. La flecha indica la sección cerebral sobre la cual se realiza la medición de perfusión cortical mediante láser-Doppler (LDF). Las imágenes insertadas corresponden a la tercera sección cerebral y muestran el área de infarto representativa de cada uno de los grupos experimentales. El tejido infartado muestra ausencia de coloración, mientras que el tejido sano presenta coloración roja tras su exposición a TTC.

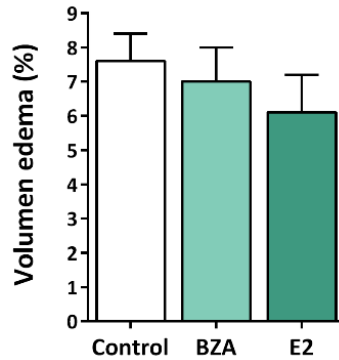


Figura 30. Volumen total de edema de los tres grupos experimentales normoglucémicos: solvente (Control, n=12), BZA (n=11) y E2 (n=8). Los datos se expresan porcentualmente respecto de la diferencia entre los volúmenes totales de infarto bruto y corregido, y se representan como $\text{media} \pm \text{EEM}$.

En cuanto a los animales diabéticos, el análisis morfométrico mostró una reducción significativa del volumen de infarto total en los dos grupos tratados, al compararlos frente al grupo control (25,6% *versus* 11% y 16,3%, respectivamente). En ambos grupos, el análisis por regiones mostró que dicha reducción fue significativa en la región cortical pero no en la subcortical (Figura 31A). El cálculo del volumen de infarto en las siete secciones coronales muestra cómo la reducción del infarto es significativa en las secciones 2, 3, 4 y 5 para BZA, y 3 y 4 para E2 (Figura 31B). Los valores de edema no muestran diferencias significativas entre los grupos tratados y el control (Figura 32).

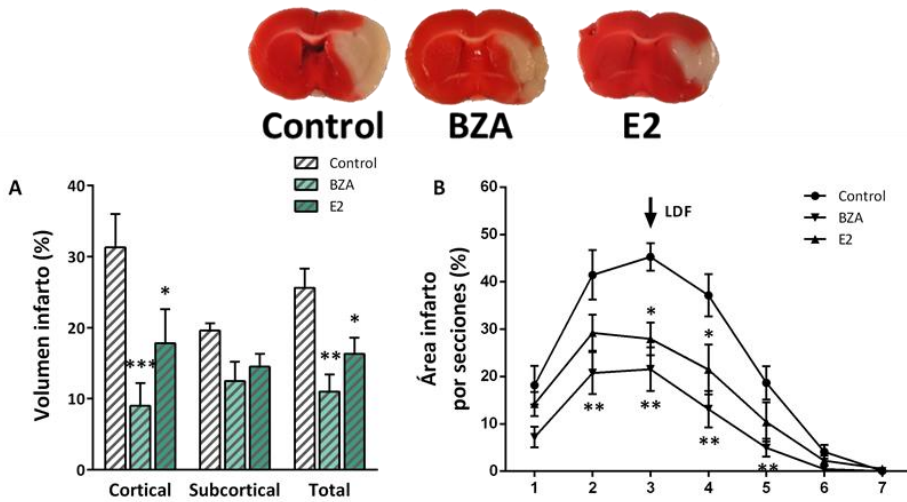


Figura 31. (A) Volumen de infarto cortical, subcortical y total tras 24 h del episodio isquémico, en ratas diabéticas tratadas con el solvente (Control, n=9), BZA (n=11) y E2 (n=8). (B) Área de infarto a lo largo de las 7 secciones coronales. Los datos se expresan porcentualmente respecto del volumen de la correspondiente región contralateral, y se representan como media±EEM. *p<0,05 y **p<0,01, significativamente diferente del control. La flecha indica la sección cerebral sobre la cual se realiza la medición de perfusión cortical mediante láser-Doppler (LDF). Las imágenes insertadas corresponden a la tercera sección cerebral y muestran el área de infarto representativa de cada uno de los grupos experimentales. El tejido infartado muestra ausencia de coloración, mientras que el tejido sano presenta coloración roja tras su exposición a TTC.

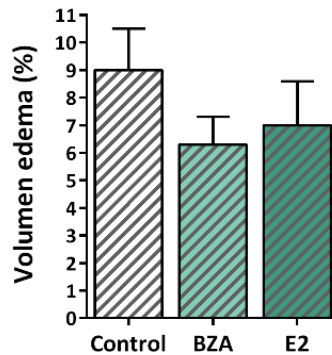


Figura 32. Volumen total de edema de los tres grupos experimentales diabéticos: solvente (Control, n=9), BZA (n=11) y E2 (n=8). Los datos se expresan porcentualmente respecto de la diferencia entre los volúmenes totales de infarto bruto y corregido, y se representan como media±EEM.

4.3 Muerte celular apoptótica

A) Normoglucemia

El marcaje de la fragmentación del DNA nuclear, indicador, de la muerte celular apoptótica, por medio de la técnica TUNEL puso de manifiesto la ausencia de apoptosis en el hemisferio contralateral (sano) tanto del grupo control como de los tratados con BZA y E2. Por el contrario, la isquemia-reperfusión indujo la presencia de células TUNEL-positivas (TUNEL+) en el hemisferio ipsilateral (afectado) de las ratas del grupo control y, en menor medida, en el de los animales tratados con BZA y E2 (Figura 33).

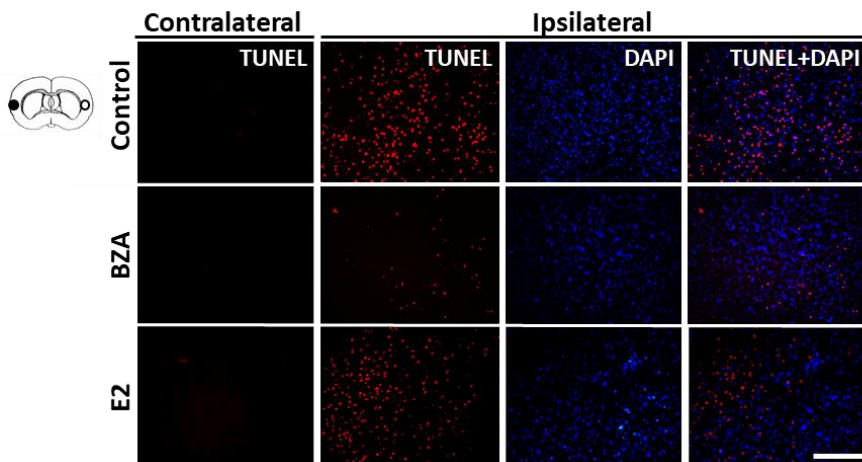


Figura 33. Detección de la fragmentación de DNA mediante la técnica TUNEL en tejido cerebral de ratas normoglucémicas controles y tratadas con BZA y E2, sometidas a isquemia-reperfusión. Ausencia de marcaje TUNEL en la región cortical del hemisferio contralateral (o) y doble marcaje (TUNEL, DAPI y co-localización) en la región cortical del hemisferio ipsilateral (●) en secciones coronales representativas. La barra de calibración equivale a 25 μm .

El recuento de células TUNEL+ en la región cortical del hemisferio ipsilateral de las ratas tratadas con BZA y E2, fue significativamente menor que el de la correspondiente región en las ratas del grupo control, mientras que en la región

subcortical no se observaron diferencias significativas entre los tres grupos (Figura 34). Valorado globalmente, el número de células TUNEL+ totales del hemisferio ipsilateral mostró una tendencia a reducirse en las ratas tratadas con E2, que alcanzó significación estadística en las ratas tratadas con BZA.

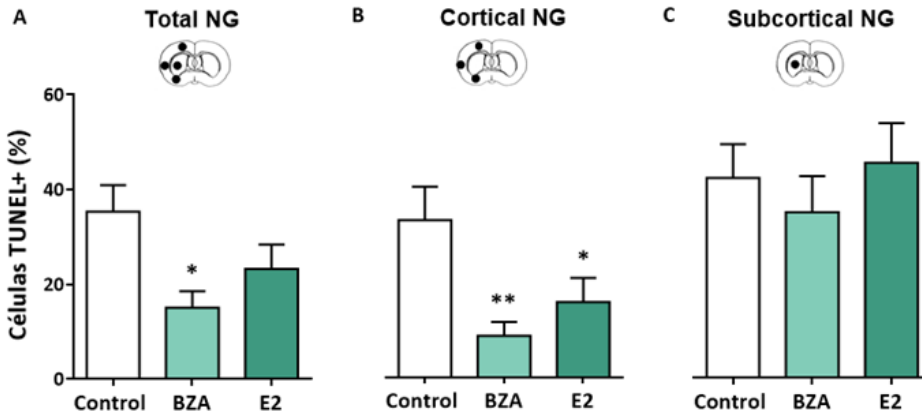


Figura 34. Recuento de células TUNEL+ en tejido cerebral de animales normoglucémicos (NG) controles y tratados con BZA y E2: (A) las cuatro zonas seleccionadas (●); (B) las tres zonas de la región cortical del hemisferio ipsilateral (●); y (C) la zona de la región subcortical del hemisferio ipsilateral (●). Los datos se expresan como porcentaje de los correspondientes núcleos celulares marcados con DAPI, y se representan como media±EEM de n=4-7 animales. * $p<0,05$ y ** $p<0,01$, significativamente diferente del control.

De manera similar a lo observado con la técnica TUNEL, el estudio funcional de la actividad de caspasa-3, proteasa ejecutora de la apoptosis, no detectó señal alguna en el hemisferio contralateral. Por el contrario, tras el episodio isquemia-reperfusión se objetivó la presencia de caspasa-3 activada en el hemisferio ipsilateral de las secciones cerebrales de todos los grupos (Figura 35A). La cantidad de caspasa-3 activada que se observó en el hemisferio ipsilateral de las ratas tratadas con BZA fue significativamente menor que la observada en el hemisferio correspondiente de las ratas control (Figura 35B). El análisis cuantitativo por Western blot reveló que la isquemia-reperfusión provocó una elevación significativa de la expresión de caspasa-3 activada (fragmento 17kDa) en

el hemisferio ipsilateral de las ratas del grupo control. El tratamiento tanto con BZA como con E2 disminuyó significativamente dicho aumento (Figura 35C y D).

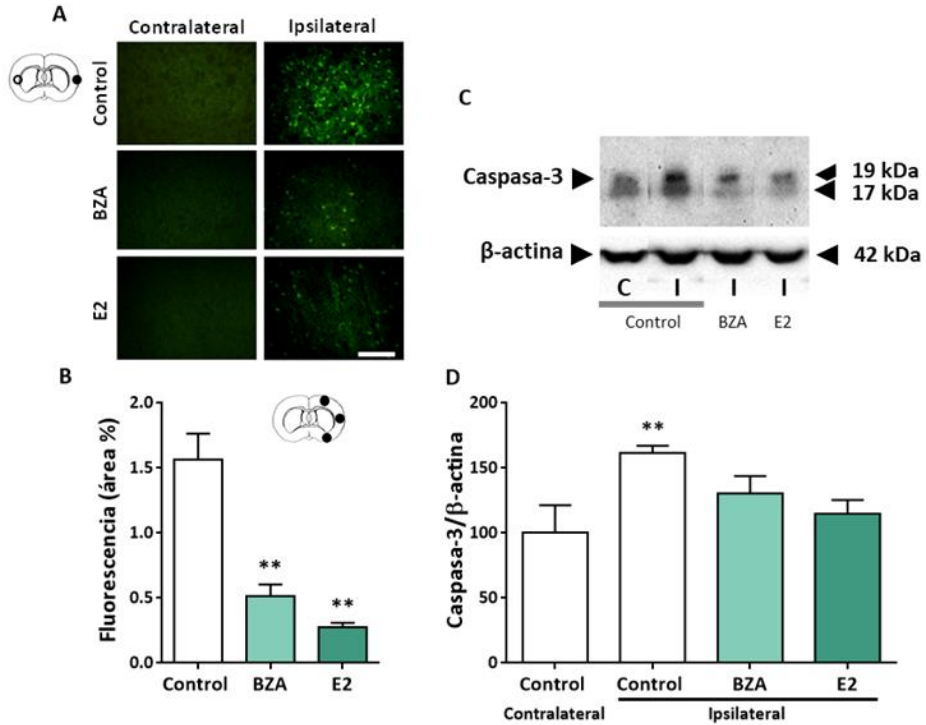


Figura 35. Caspasa-3 activada en secciones coronales de ratas normoglucémicas control y tratadas con BZA y E2, sometidas a isquemia-reperusión. (A) Marcaje con FAM-DEVD-FMK en la zona cortical del hemisferio contralateral (o) e ipsilateral (●). La barra de calibración equivale a 25 μ m. (B) Cuantificación de la fluorescencia en tres zonas de la región cortical ipsilateral (●), expresada como porcentaje respecto al área total. Los datos se expresan como media \pm EEM de n=4 animales. **p<0,01, significativamente diferente del control. (C) Western blot representativo de caspasa-3, fragmento 17 kDa, en el hemisferio contralateral (C) e ipsilateral (I) de los grupos Control y tratados con BZA y E2. (D) Densidad relativa de las bandas normalizadas respecto a las bandas de β -actina correspondientes. Los datos se expresan como media \pm EEM de n=7, 6 y 4 animales, respectivamente. **p<0,01, significativamente diferente del control contralateral.

B) Diabetes

Al igual que en los animales normoglucémicos, no se detectaron células TUNEL+ en el hemisferio contralateral de ninguno de los tres grupos experimentales, mientras que la isquemia-reperfusión indujo la presencia de células TUNEL+ en el hemisferio ipsilateral de todos los grupos (Figura 36). El tejido cerebral de los animales tratados con BZA y E2 mostró una reducción significativa del número de células TUNEL+ frente al de los animales control. Estas diferencias significativas son atribuibles específicamente a la reducción del número de células TUNEL+ en la región cortical. Al igual que ocurre en los animales normoglucémicos, no existen diferencias significativas entre las regiones subcorticales de los tres grupos (Figura 37).

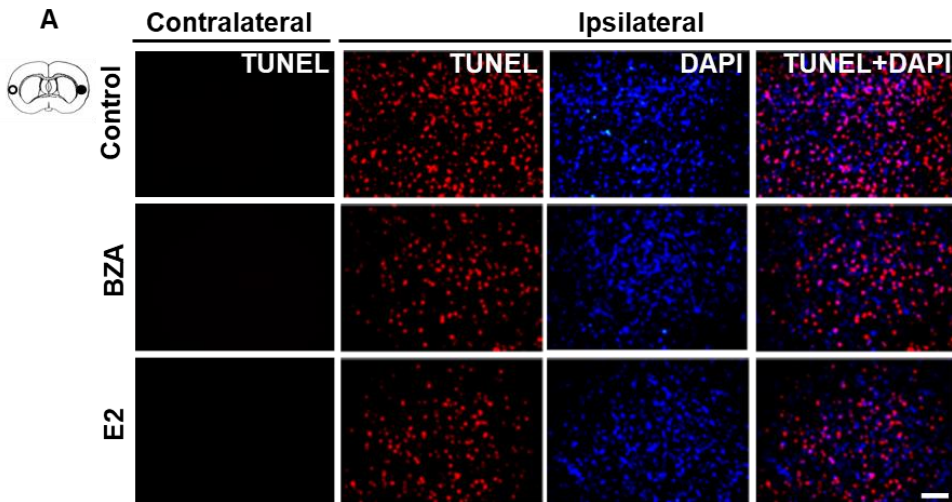


Figura 36. Detección de la fragmentación de DNA mediante la técnica TUNEL en tejido cerebral de ratas diabéticas controles y tratadas con BZA y E2, sometidas a isquemia-reperfusión. Ausencia de marcaje TUNEL en la región cortical del hemisferio contralateral (○) y doble marcaje (TUNEL, DAPI y co-localización) en la región cortical del hemisferio ipsilateral (●) en secciones coronales representativas. La barra de calibración equivale a 25 μ m.

En el estudio de caspasa-3 activada, no se detectó señal en el hemisferio contralateral, mientras que el episodio de isquemia-reperfusión provocó la aparición de caspasa-3 activada en el hemisferio ipsilateral de las secciones cerebrales de todos los grupos (Figura 38A). La cantidad de caspasa-3 activada que se observó en el hemisferio ipsilateral de las ratas tratadas con BZA y E2 fue significativamente menor que en el hemisferio correspondiente de las ratas control (Figura 38B). Los estudios de Western blot revelaron que la isquemia-reperfusión provocó una elevación significativa de la expresión de caspasa-3 en el hemisferio ipsilateral de las ratas del grupo control. El tratamiento tanto con BZA como con E2 disminuyó significativamente el aumento de su expresión (Figura 38C y D).

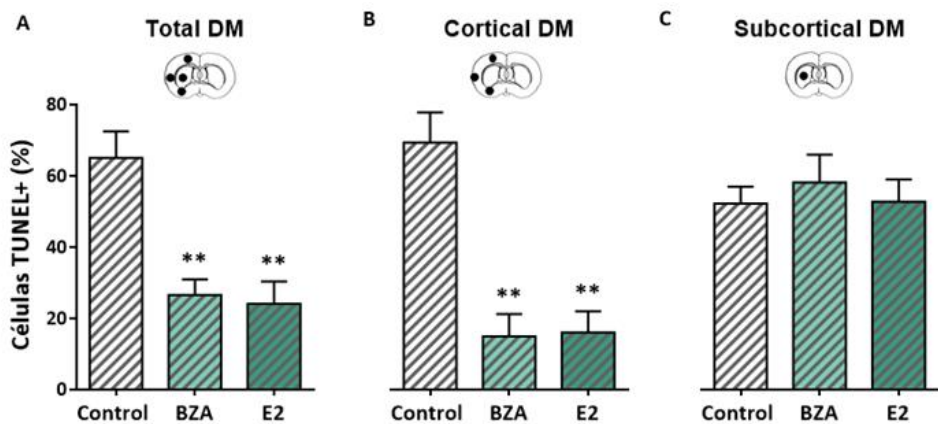


Figura 37. Recuento de células TUNEL+ en tejido cerebral de animales diabéticos (DM) controles y tratadas con BZA y E2: (A) las cuatro zonas seleccionadas (●); (B) las tres zonas de la región cortical del hemisferio ipsilateral (●); y (C) la zona de la región subcortical del hemisferio ipsilateral (●). Los datos se expresan como porcentaje de los correspondientes núcleos celulares marcados con DAPI, y se representan como media±EEM de n=4 animales. **p<0,01, significativamente diferente del Control.

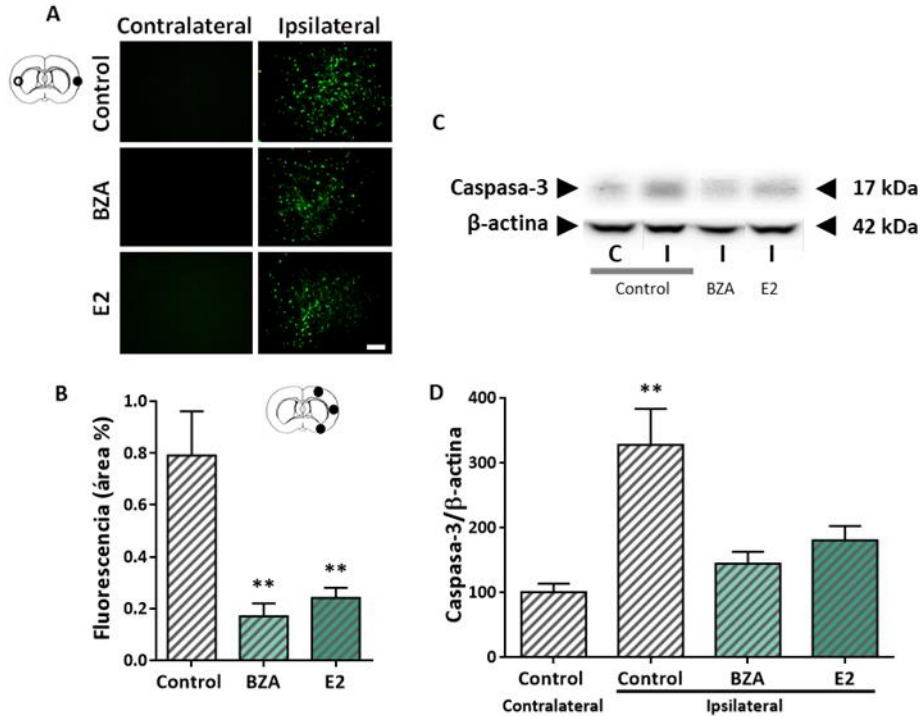


Figura 38. Caspasa-3 activada en secciones coronales de ratas diabéticas control y tratadas con BZA y E2, sometidas a isquemia-reperfusión. (A) Marcaje con FAM-DEVD-FMK en la zona cortical del hemisferio contralateral (○) e ipsilateral (●). La barra de calibración equivale a 100 μ m. (B) Cuantificación de la fluorescencia en tres zonas de la región cortical ipsilateral (●), expresada como porcentaje respecto al área total. Los datos se expresan como media \pm EEM de n=4 animales. **p<0,01, significativamente diferente del Control. (C) Western blot representativo de caspasa-3, fragmento 17 kDa, en el hemisferio contralateral (C) e ipsilateral (I) de los grupos Control y tratados con BZA y E2. (D) Densidad relativa de las bandas normalizadas respecto a las bandas de β -actina correspondientes. Los datos se expresan como media \pm EEM de n=7-8 animales. **p<0,01, significativamente diferente del control contralateral.

5. Efecto de BZA y E2 sobre la expresión de receptores estrogénicos ER α , ER β y GPER en condiciones de normoglucemia y diabetes.

5.1 ER α

Por lo que respecta a los animales normoglucémicos, los resultados obtenidos por PCR cuantitativa muestran que la isquemia-reperfusión disminuyó significativamente la expresión de mRNA *Esr1* en el hemisferio ipsilateral, en comparación con el hemisferio contralateral del grupo control. El tratamiento con BZA y E2 revirtió dicha disminución hasta los niveles obtenidos en el hemisferio contralateral (Control) (Figura 39A). Por otra parte, los resultados obtenidos con la técnica de Western blot mostraron un perfil similar, ya que la isquemia-reperfusión indujo una disminución en los niveles de expresión de la proteína ER α en el hemisferio ipsilateral, y los tratamientos con BZA y E2 revirtieron de forma significativa dicha disminución (Figura 39B y C).

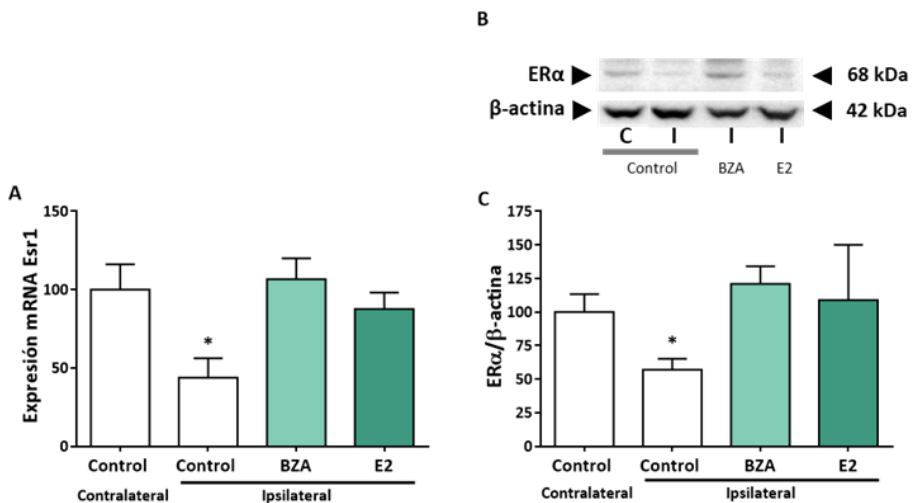


Figura 39. Expresión de ER α en los hemisferios contralateral e ipsilateral de animales normoglucémicos sometidos a isquemia-reperfusión. (A) Expresión relativa de mRNA *Esr1*

determinada por RT-qPCR. (B) Bandas representativas de Western blot en el hemisferio contralateral (C) e ipsilateral (I) de los grupos control y tratados con BZA y E2. (C) Cantidad relativa de proteína ER α determinada por Western blot. Los datos se representan como media \pm EEM de n=4-6. *p<0,05, significativamente diferente del control contralateral.

Para determinar la localización de los cambios inducidos por la isquemia-reperfusión en la expresión de los ER, se realizó un triple marcaje con cada uno de los subtipos de los ER más TUNEL y DAPI. En cuanto a ER α , el triple marcaje fue positivo en el hemisferio ipsilateral, mientras que en el hemisferio contralateral el marcaje también fue positivo, excepto para TUNEL, como era esperable. La inmunorreactividad ER α se detectó predominantemente en el núcleo co-localizada con DAPI, sin que se apreciara superposición entre las señales ER α y TUNEL en la corteza ipsilateral (Figura 40).

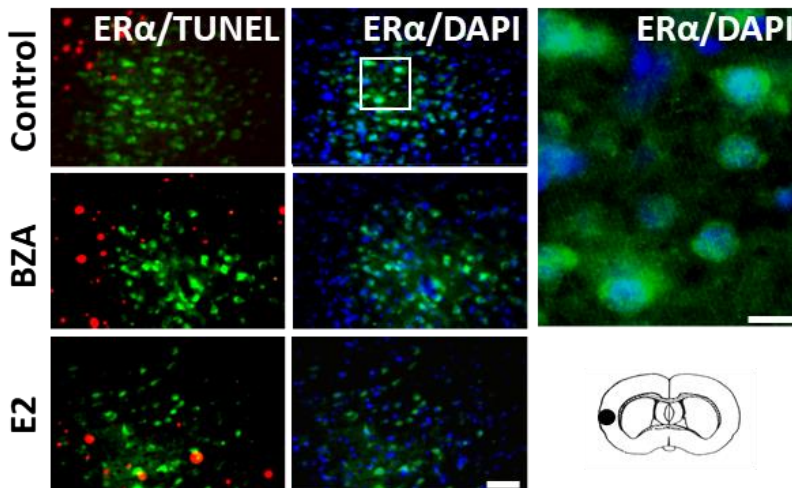


Figura 40. Superposición de imágenes de inmunofluorescencia ER α (verde), TUNEL (rojo) y DAPI (azul) en el cortex ipsilateral en condiciones de normogluemia (●). Escala en las dos primeras columnas, 50 μ m. Escala en la ampliación de la superposición de ER α +DAPI, 10 μ m.

Por lo que respecta a los animales diabéticos, los resultados son cualitativamente iguales a los obtenidos en condiciones de normogluemia: 1) la isquemia-reperfusión disminuyó significativamente la expresión de mRNA *Esr1* en

el hemisferio ipsilateral; 2) el tratamiento con BZA y E2 revirtió dicha disminución hasta los niveles obtenidos en el hemisferio contralateral (Control) (Figura 41A); 3) la isquemia-reperfusión indujo una disminución en los niveles de expresión de la proteína ER α en el hemisferio ipsilateral; y 4) los tratamientos con BZA y E2 revirtieron de forma significativa dicha disminución (Figura 41B y C).

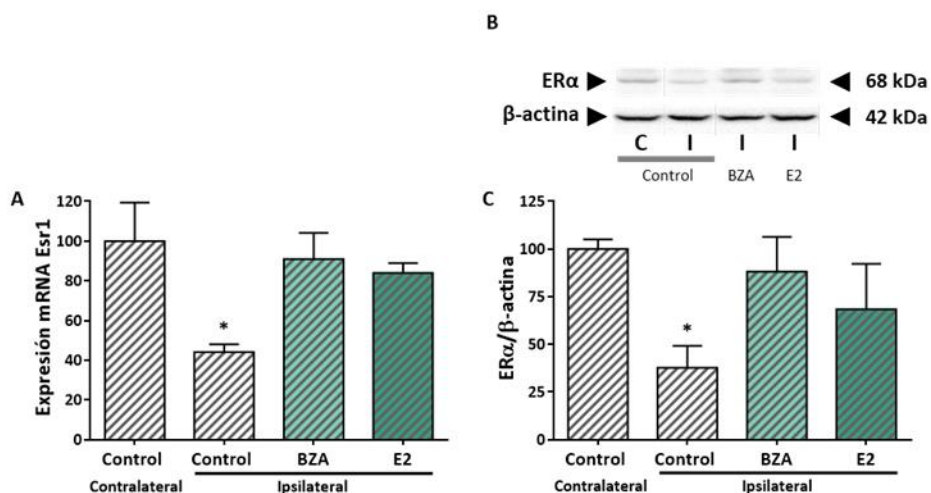


Figura 41. Expresión de ER α en los hemisferios contralateral e ipsilateral de animales diabéticos sometidos a isquemia-reperfusión. (A) Expresión relativa de mRNA *Esr1* determinada por PCR. (B) Bandas representativas de Western blot en el hemisferio contralateral (C) e ipsilateral (I) de los grupos Control y tratados con BZA y E2. (C) Cantidad relativa de proteína ER α determinada por Western blot. Los datos se representan como media \pm EEM de n=4-6. * p <0,05, significativamente diferente del control contralateral.

Al igual que ocurre en condiciones de normoglucemia, el triple marcaje fue positivo en el hemisferio ipsilateral, mientras que en el hemisferio contralateral el marcaje también fue positivo, excepto para TUNEL. La inmunorreactividad ER α se detectó predominantemente en el núcleo co-localizada con DAPI, sin que se apreciara superposición entre las señales ER α y TUNEL en la corteza ipsilateral (Figura 42).

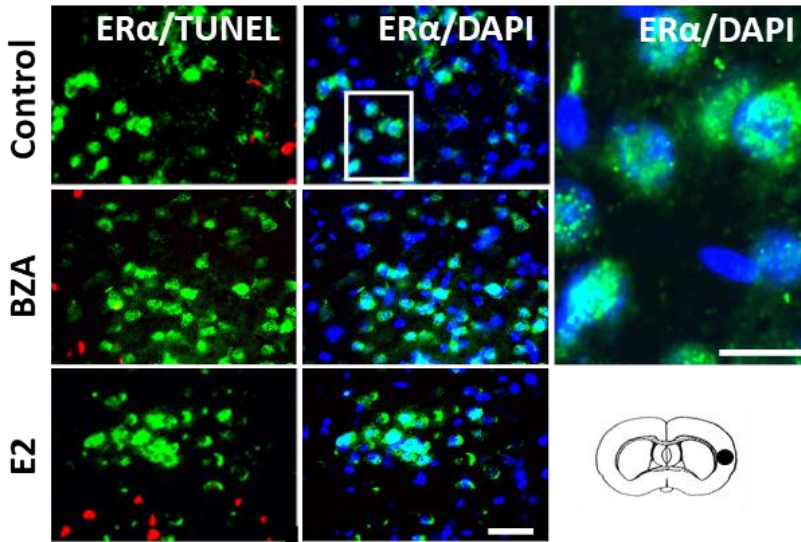


Figura 42. Superposición de imágenes de inmunofluorescencia ER α (verde), TUNEL (rojo) y DAPI (azul) en el cortex ipsilateral en condiciones de diabetes (●). Escala en las dos primeras columnas, 50 μ m. Escala en la ampliación de la superposición de ER α +DAPI, 10 μ m.

5.2 ER β

En condiciones de normoglucemia, la isquemia-reperfusión disminuyó significativamente la expresión de mRNA *Esr2* cuantificada por PCR cuantitativa en el hemisferio ipsilateral, en comparación con el hemisferio contralateral del grupo control. El tratamiento con BZA revirtió dicha disminución hasta los niveles obtenidos en el hemisferio contralateral (Control) (Figura 43A). Por el contrario, el tratamiento con E2 no fue capaz de revertir los niveles hasta el valor control. Por otro lado, los resultados obtenidos con la técnica de Western blot no coincidieron con los obtenidos con la técnica PCR, ya que no se evidenció disminución de la proteína ER β . En cuanto al efecto de los tratamientos, BZA indujo la sobreexpresión de la proteína ER β de forma significativa, mientras que E2 no tuvo ningún efecto (Figura 43B y C).

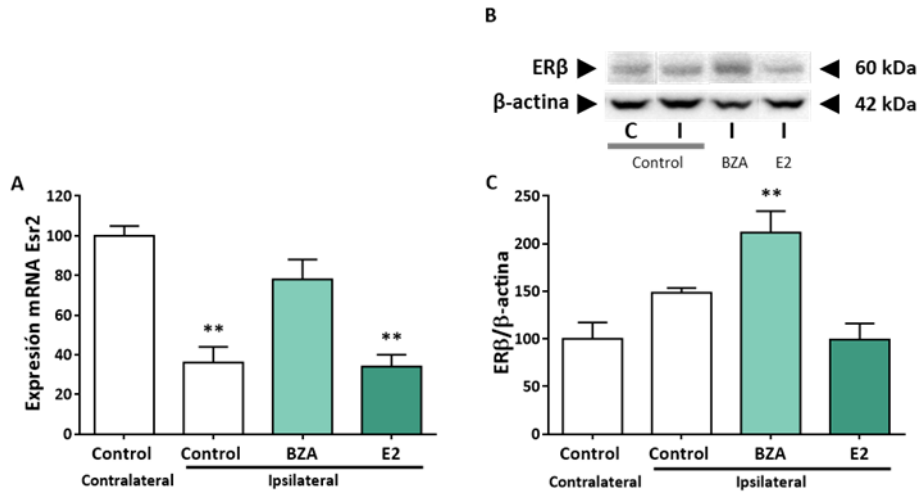


Figura 43. Expresión de ER β en los hemisferios contralateral e ipsilateral de animales normoglucémicos sometidos a isquemia-reperfusión. (A) Expresión relativa de mRNA *Esr2* determinada por PCR. (B) Bandas representativas de Western blot en el hemisferio contralateral (C) e ipsilateral (I) de los grupos Control y tratados con BZA y E2. (C) Cantidad relativa de proteína ER β determinada por Western blot. Los datos se representan como media \pm EEM de n=4-6. **p<0,01, significativamente diferente del control contralateral.

En cuanto a los estudios sobre co-localización, el triple marcaje fue positivo en el hemisferio ipsilateral, mientras que en el hemisferio contralateral el marcaje también fue positivo, excepto para TUNEL. La inmunorreactividad ER β se detectó predominantemente en el núcleo, se co-localizó con DAPI y no hubo superposición con TUNEL en la corteza ipsilateral (Figura 44).

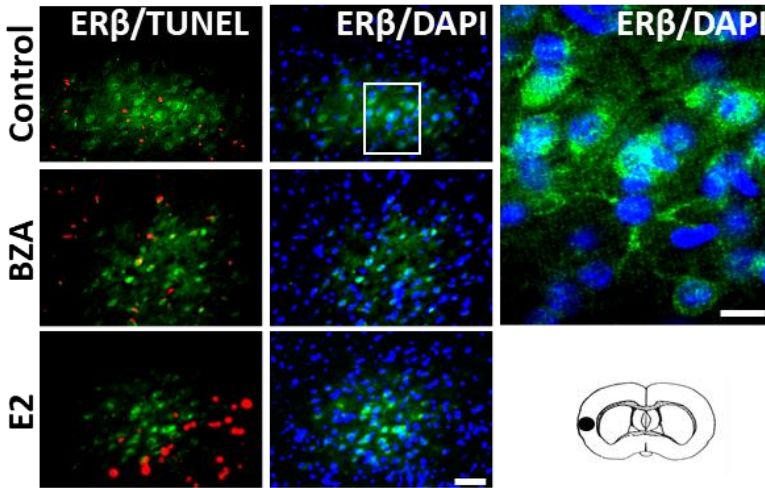


Figura 44. Superposición de imágenes de inmunofluorescencia ER α (verde), TUNEL (rojo) y DAPI (azul) en el cortex ipsilateral en condiciones de normoglucemia (●). Escala en las dos primeras columnas, 50 μ m. Escala en la ampliación de la superposición de ER β +DAPI, 10 μ m.

Por lo que respecta a los animales diabéticos, la isquemia-reperfusión disminuyó significativamente tanto la expresión de mRNA *Esr2* como la expresión de la proteína ER β en el hemisferio ipsilateral, disminuciones que fueron revertidas tanto por BZA como por E2 (Figura 45).

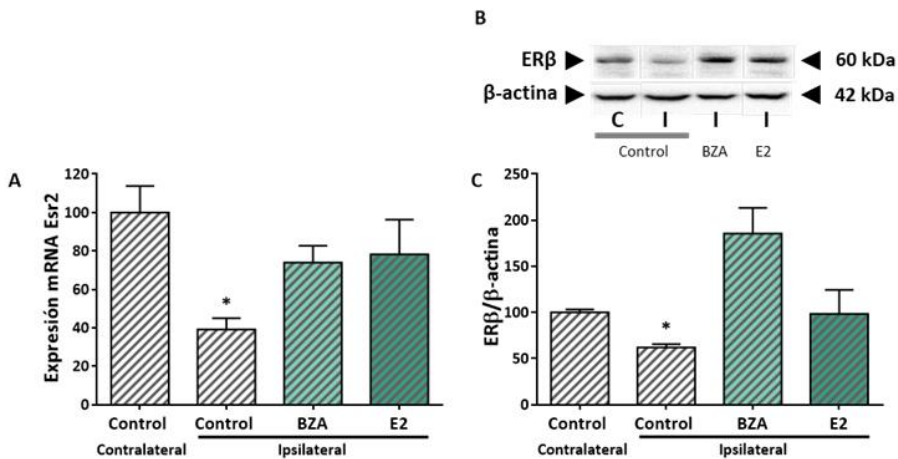


Figura 45. Expresión de ER β en los hemisferios contralateral e ipsilateral de animales diabéticos sometidos a isquemia-reperfusión. (A) Expresión relativa de mRNA *Esr2* determinada por PCR. (B)

Bandas representativas de Western blot en el hemisferio contralateral (C) e ipsilateral (I) de los grupos Control y tratados con BZA y E2. (C) Cantidad relativa de proteína ER β determinada por Western blot. Los datos se representan como media \pm EEM de n=4-6. *p<0,05, significativamente diferente del control contralateral.

Al igual que ocurre en condiciones de normoglucemia, el triple marcaje fue positivo en el hemisferio ipsilateral, mientras que en el hemisferio contralateral el marcaje también fue positivo, excepto para TUNEL. La inmunorreactividad ER β se detectó predominantemente en el núcleo co-localizada con DAPI, sin que se apreciara superposición entre las señales ER β y TUNEL en la corteza ipsilateral (Figura 46).

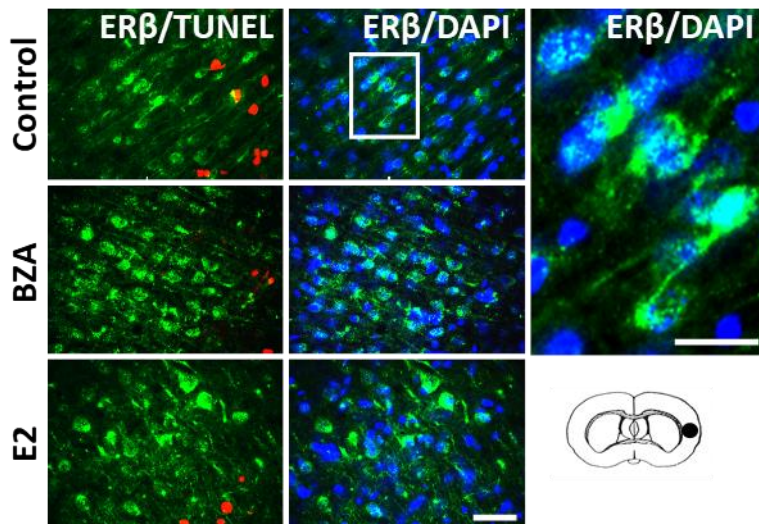


Figura 46. Superposición de imágenes de inmunofluorescencia ER α (verde), TUNEL (rojo) y DAPI (azul) en el cortex ipsilateral en condiciones de diabetes (●). Escala en las dos primeras columnas, 50 μ m. Escala en la ampliación de la superposición de ER β +DAPI, 10 μ m.

5.3 GPER

Tanto en condiciones de normoglucemia como de diabetes, ni la expresión de mRNA *Gper1* ni la de la proteína GPER se vieron modificadas por isquemia-

reperfusión. Ninguna de ambas expresiones se vio modificada tras el tratamiento con BZA o E2 (Figura 47 y Figura 49). Por otra parte, el triple marcaje fue positivo en el hemisferio ipsilateral, mientras que en el hemisferio contralateral el marcaje también fue positivo, excepto para TUNEL. La inmunorreactividad GPER se detectó predominantemente en el citoplasma, sin que se apreciara superposición entre las señales GPER y TUNEL en la corteza ipsilateral (Figura 48 y Figura 50).

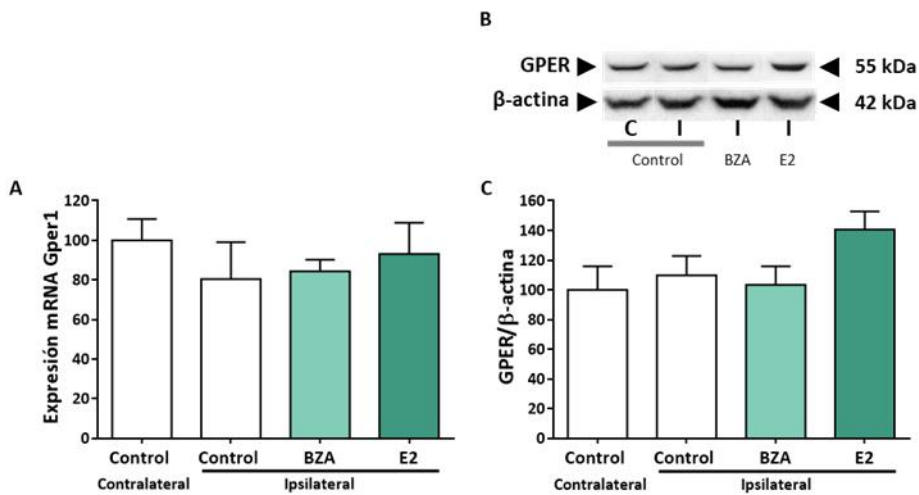


Figura 47. Expresión de GPER en los hemisferios contralateral e ipsilateral de animales normoglucémicos sometidos a isquemia-reperfusión. (A) Expresión relativa de mRNA Gper1 determinada por PCR. (B) Bandas representativas de Western blot en el hemisferio contralateral (C) e ipsilateral (I) de los grupos Control y tratados con BZA y E2. (C) Cantidad relativa de proteína GPER determinada por Western blot. Los datos se representan como media \pm EEM de n=4-6.

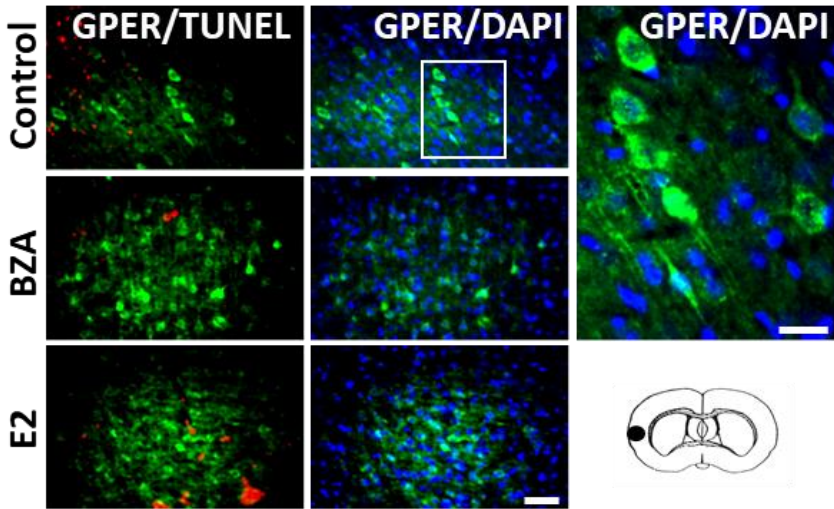


Figura 48. Superposición de imágenes de inmunofluorescencia GPER (verde), TUNEL (rojo) y DAPI (azul) en el cortex ipsilateral en condiciones de normoglucemia (●). Escala en las dos primeras columnas, 50 µm. Escala en la ampliación de la superposición de GPER+DAPI, 10 µm.

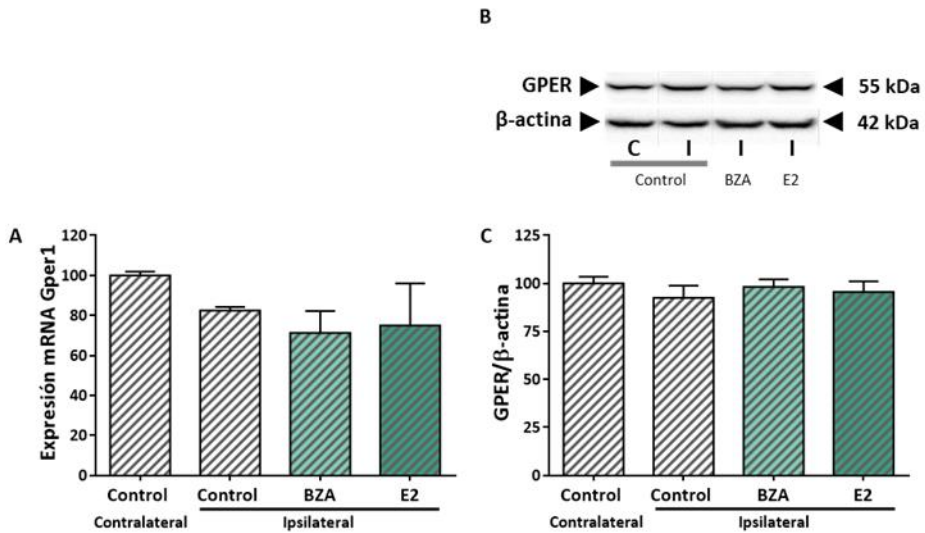


Figura 49. Expresión de GPER en los hemisferios contralateral e ipsilateral de animales diabéticos sometidos a isquemia-reperusión. (A) Expresión relativa de mRNA *Gper1* determinada por PCR. (B) Bandas representativas de Western blot en el hemisferio contralateral (C) e ipsilateral (I) de los grupos Control y tratados con BZA y E2. (C) Cantidad relativa de proteína GPER determinada por Western blot. Los datos se representan como media±EEM de n=4-6.

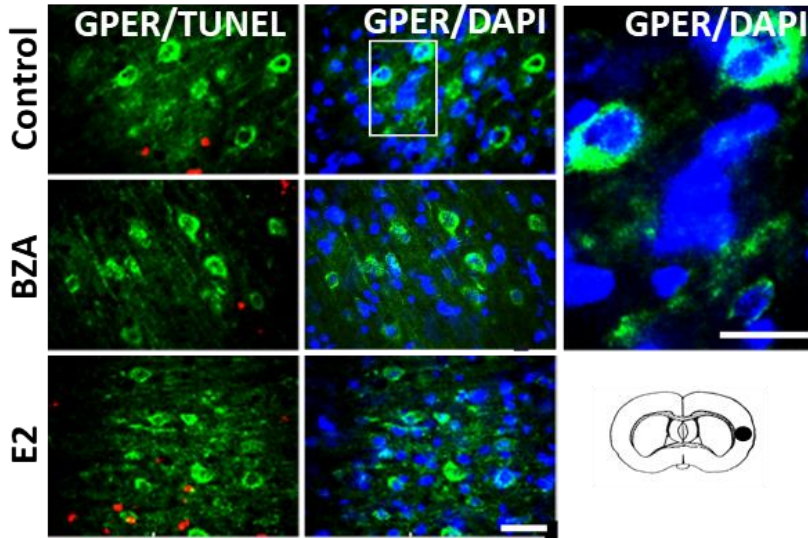


Figura 50. Superposición de imágenes de inmunofluorescencia GPER (verde), TUNEL (rojo) y DAPI (azul) en el cortex ipsilateral en condiciones de diabetes (●). Escala en las dos primeras columnas, 50 μ m. Escala en la ampliación de la superposición de GPER+DAPI, 10 μ m.

6. Efecto de BZA y E2 sobre la activación de las vías MAPK/ERK1/2 y PI3K/Akt

6.1 MAPK/ERK1/2

El episodio de isquemia-reperfusión incrementó significativamente la fosforilación de ERK1 (pERK1) y ERK2 (pERK2) en el hemisferio ipsilateral del grupo tratado con el solvente (control), en comparación con el hemisferio contralateral, tanto en animales normoglucémicos como diabéticos. Estos incrementos no se acompañaron del incremento en los niveles de proteína ERK1/2 totales. BZA, atenuó significativamente la fosforilación endógena tanto de ERK1 como de ERK2 en el hemisferio ipsilateral, en ambas condiciones glucémicas (Figura 51). El tratamiento con E2 no alteró la expresión de pERK1/2 tras la isquemia en

animales normoglucémicos, mientras que en animales diabéticos E2 bloqueó la activación de pERK2, sin afectar a la expresión de pERK1 (Figura 51).

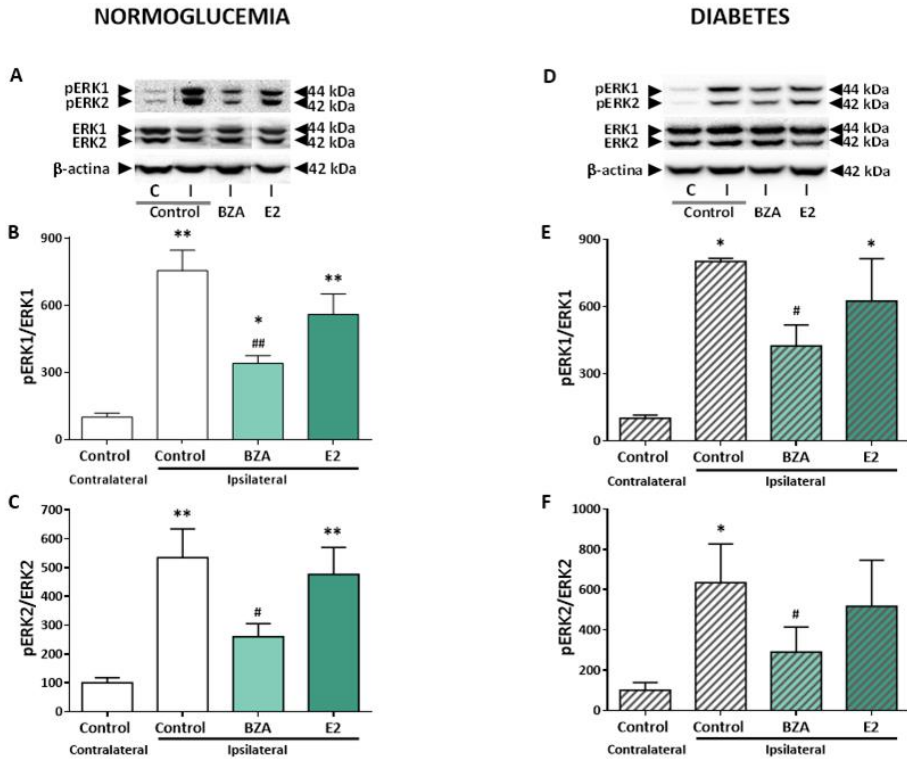


Figura 51. Cantidad relativa de proteína fosforilada ERK1/2 en condiciones de normoglucemia (A-C) y diabetes (D-F). (A,D) Western blots representativos de la expresión de pERK1 y pERK2 en el hemisferio contralateral (C) e ipsilateral (I) de los grupos Control y tratados con BZA y E2. (B,E) Cantidad relativa de pERK1 y (C,F) pERK2. Los datos se han normalizado con respecto a la cantidad total de ERK1 y ERK2, respectivamente, y se representan como media \pm EEM de n=4-6 animales. * $p < 0,05$ y ** $p < 0,01$, significativamente diferente del control contralateral. # $p < 0,05$ y ## $p < 0,01$, significativamente diferente del control ipsilateral.

6.2 PI3K/Akt

Tanto en condiciones de normoglucemia como de diabetes, la isquemia-reperfusión incrementó significativamente la fosforilación de Akt (pAkt) en el hemisferio ipsilateral, al ser comparada con el hemisferio contralateral. Ni el tratamiento con BZA ni E2 bloquearon el incremento de pAkt inducido por la isquemia (Figura 52).

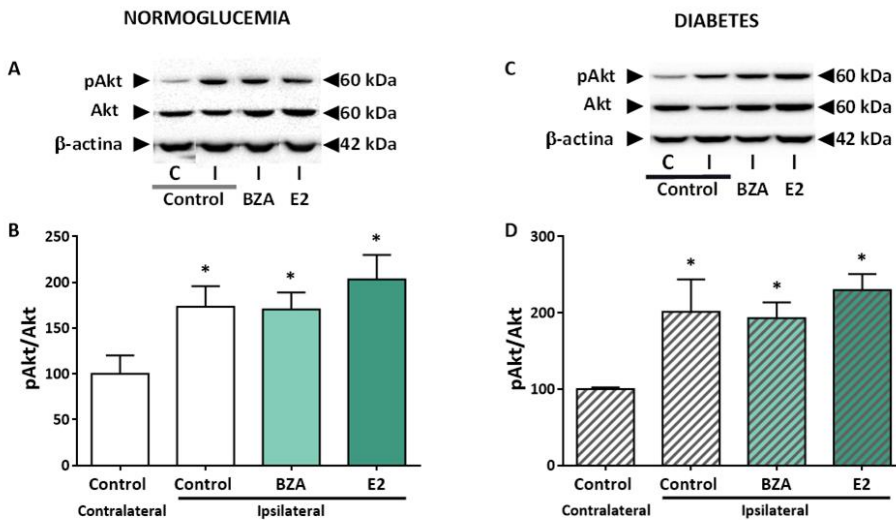


Figura 52. Cantidad relativa de proteína pAkt en condiciones de normoglucemia (A,B) y diabetes (C,D). (A,C) Western blots representativos de la expresión de pAkt en el hemisferio contralateral (C) e ipsilateral (I) de los grupos Control y tratados con BZA y E2. (B,D) Cantidad relativa de pAkt. Los datos se han normalizado con respecto a la cantidad total de Akt, y se representan como media \pm EEM de n=4-6 animales. *p<0,05, significativamente diferente del control contralateral.

Discusión

1. Consideraciones sobre el diseño del estudio

1.1 Modelo animal de ictus isquémico con reperfusión

Durante las últimas cuatro décadas se han desarrollado diferentes modelos animales de ictus con el objetivo de identificar los mecanismos subyacentes a la isquemia cerebral, así como de desarrollar nuevas moléculas para su tratamiento. La necesidad del uso de animales de experimentación en el accidente cerebrovascular se debe a la heterogeneidad en la causa, localización, tamaño e impacto funcional en el paciente, mientras que el ictus experimental es más homogéneo lo que nos permite analizar de forma más precisa la fisiopatología de la isquemia, así como tener acceso directo al tejido cerebral para los estudios moleculares (104). Además, la perfusión y la vascularización, especialmente la vascularización colateral, son esenciales en la fisiopatología del ictus, y ninguna de ellas puede ser reproducida en modelos *in vitro* de isquemia cerebral, como por ejemplo la privación de oxígeno y glucosa en cultivos de células neurales (neuronas, microglía, astrocitos...). Sin embargo, cada uno de los modelos animales de ictus isquémico posee sus fortalezas y debilidades que se recogen en la Tabla 9 (105).

Nuestro grupo viene utilizando desde hace 20 años el modelo de oclusión de la arteria cerebral media mediante la técnica del filamento intraluminal. Pese a que 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 fue descrita por Longa et al. (1989). La valoración favorable de sus ventajas y desventajas ha determinado su implantación como modelo de elección en la mayoría de laboratorios de

investigación del ictus experimental en todo el mundo. El modelo simula la trombectomía mecánica usada en clínica para retirar el trombo (106). Además, este modelo representa el 82% de los modelos de isquemia cerebral focal utilizados en las investigaciones sobre diabetes (107). Atendiendo a las recomendaciones STAIR, nuestros protocolos incluyen el registro continuo de la perfusión en el córtex además de la monitorización precisa de los parámetros anestésicos y fisiológicos durante la cirugía. Esto es de la mayor importancia, especialmente en los estudios sobre neuroprotección. Sin embargo, son escasas las investigaciones en las que los mencionados aspectos se tienen en consideración (108,109). En nuestro estudio, la mortalidad en las primeras 24 h fue del ~20% 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.

Tabla 9. Modelos animales de ictus isquémico (Tomada de Fluri et al. 2015)

Modelo	Ventajas	Desventajas
Oclusión de la arteria cerebral media (MCAO). Filamento intraluminal. (Longa et al., 1989)	<ul style="list-style-type: none"> - Reproduce el ictus isquémico en humanos - Exhibe la penumbra isquémica - Altamente reproducible - Reperfusión altamente controlable - No requiere craniectomía 	<ul style="list-style-type: none"> - Hipo-/hipertermia - Riesgo de hemorragia cerebral - No idóneo para estudios de trombolisis
MCAO. Craniectomía subtemporal. (Tamura et al., 1981)	<ul style="list-style-type: none"> - Tasas de supervivencia a largo plazo muy altas - Confirmación visual de la MCAO 	<ul style="list-style-type: none"> - Alta invasividad y posibles complicaciones - Requiere alto grado de destreza quirúrgica
MCAO. Endotelina-1 perivascolar.	<ul style="list-style-type: none"> - Baja invasividad - Inducción de lesiones isquémicas en regiones 	<ul style="list-style-type: none"> - Duración no controlable de la isquemia - Inducción de astrocitosis y

(Sharkey et al., 1993)	corticales o subcorticales	proliferación axonal que puede complicar la interpretación de los resultados
MCAO. Embolismo. (Zhang et al., 1997)	- Reproduce fielmente la patogenia del ictus en humanos - Apropiado para estudios sobre trombolisis	- Baja reproducibilidad de los infartos - Recanalización espontánea - Alta variabilidad de los tamaños de infarto
Fototrombosis. (Watson et al., 1985)	- Permite la localización precisa de la lesión isquémica - Alta reproducibilidad - Baja invasividad	- Causa edema vasogénico temprano a diferencia del ictus en humanos - No idóneo para estudios de neuroprotección farmacológica

1.2 Modelo animal de diabetes experimental

La diabetes mellitus de tipo 1 (DMT1) se caracteriza por una reducción significativa de la densidad de células β -pancreáticas, con el consiguiente descenso en la producción de insulina. La diabetes mellitus de tipo 2 (DMT2) se caracteriza por el aumento progresivo de la intolerancia a la glucosa, así como de la resistencia periférica a la insulina provocados por una dieta inadecuada, falta de ejercicio, obesidad y predisposición genética (110).

Existen diferentes modelos experimentales para el estudio de la diabetes que pueden dividirse en tres grandes grupos: modelos espontáneos, modelos inducidos y modelos transgénicos. Cada uno de los modelos tiene sus puntos de interés, pero ninguno reproduce completamente la fisiopatología de la enfermedad (Tabla 10 (111)). La elección del modelo animal depende por lo tanto del diseño y objetivo del estudio (110).

Entre los modelos más utilizados están los que inducen la diabetes mediante la inyección de un tóxico (aloxano o estreptozotocina) (112,113). Nuestro modelo de elección es el de la administración intraperitoneal de una única dosis alta de STZ. Se trata de un agente antimicrobiano usado también como agente quimioterapéutico alquilante. En los años 60 Rakieta et al. (1963) describió este compuesto, como diabtogénico, pues causa necrosis específica de las células beta pancreáticas (114). Los animales tratados con STZ, a pesar de presentar niveles insignificantes de insulina endógena, pueden sobrevivir durante meses sin necesidad de administración exógena de dicha hormona. Además, es un método sencillo, coste-efectivo y ampliamente establecido para inducir hiperglucemia en la T1DM.

Tabla 10. Modelos animales de diabetes (Tomado de King et al. 2012).

Mecanismo de inducción	Modelo
DMT1	
Inducción química mediante tóxicos β-pancreáticos	Estreptozotocina Aloxano
Autoinmunidad espontánea	Ratón diabético no obeso [NOD] Rata “BioBreeding” [BB] Rata LEW.1AR1/Ztm-iddm
Inducción genética	Ratón AKITA
Inducción vírica	Virus Coxsackie B Virus de la encefalomiocarditis Virus de la rata Kilham, LCMV bajo promotor de insulina
DMT2	
Obesidad monogénica	Ratón Lep ^{ob/ob} Ratón Lepr ^{db/db}

	Rata ZDF
Obesidad poligénica	Ratón KK Rata OLETF Ratón NZO Ratón TallyHo/Jng Ratón NoncNZO10/LtJ
Obesidad inducida	Rata o ratón con consumo elevado de grasas Jerbo del desierto Rata de hierba del Nilo
No obesidad	Rata GK
Disfunción de células β inducida genéticamente	Ratón hIAPP Ratón AKITA

1.3 Uso exclusivo de ratas macho

BZA se prescribe actualmente para aliviar los síntomas en mujeres postmenopáusicas, especialmente la osteoporosis; no existen indicaciones para el uso de BZA en hombres. Sin embargo, el presente trabajo tiene como objetivo demostrar que un fármaco como BZA con determinadas indicaciones, puede ser reposicionado con nuevas indicaciones extendiendo así sus efectos beneficiosos en otras patologías, concretamente el ictus isquémico. Es interesante señalar que investigaciones recientes aportan pruebas de que BZA podría ser de utilidad en el tratamiento de determinados tipos de cáncer gastrointestinal (115). Además, determinados SERMs relacionados con tamoxifeno han demostrado actividad frente a una serie de patógenos médicamente muy importantes que incluyen bacterias, hongos, parásitos y virus (116). Recientemente se han revisado las

evidencias que dan soporte al uso de esteroides y fármacos para el tratamiento de determinadas patologías endocrinas, y que pudieran sustentar una indicación adicional en el tratamiento de la enfermedad de Parkinson (117). Obviamente, nuestro objetivo es demostrar el efecto neuroprotector de BZA en el ictus isquémico tanto en hombres como en mujeres. La decisión de iniciar nuestras investigaciones en animales macho se debe a una doble circunstancia: la ausencia de efectos feminizantes de BZA (la terapia estrogénica no es factible en hombres); y la ausencia de interferencias con estrógenos endógenos.

El reposicionamiento de fármacos con un perfil de seguridad bien definido permitiría reducir el riesgo de fracaso en los ensayos clínicos, el cual ha dominado el desarrollo de fármacos neuroprotectores en el ictus en las últimas décadas (118).

1.4 Ausencia de grupo con isquemia-reperfusión simulada

Este punto se refiere al conocido debate acerca de cuál es el control más apropiado con el que comparar los hallazgos en el hemisferio cerebral afectado (isquémico): el hemisferio contralateral (presuntamente sano) del mismo animal, o el hemisferio ipsilateral de un animal diferente sometido a una isquemia simulada. Estudios previos apoyan tanto a la primera (119) como a la segunda alternativa (120). La opinión de nuestro grupo, compartida con la de otros muchos, es que la primera opción es la más idónea, si bien es necesario asumir que la intervención no afecta al hemisferio contralateral. De hecho, en nuestro estudio no se ha objetivado ningún signo de daño tisular en el hemisferio contralateral de los animales sujetos a isquemia-reperfusión. Nuestro protocolo, además, reduce significativamente el número de animales necesarios, cumpliendo

así el criterio de “reducción” de las 3Rs (reemplazo, reducción y refinamiento) (121).

1.5 Pauta terapéutica de BZA y E2

Con el fin de incrementar el valor traslacional del presente estudio sin tener que utilizar un número excesivo de animales, se ha decidido utilizar una única dosis “diana”, tanto para BZA como para E2, en lugar de establecer la función dosis-respuesta (dosis mínima efectiva y dosis máxima) para cada uno ellos. Hemos diseñado un protocolo que permite alcanzar concentraciones plasmáticas óptimas para BZA y E2 a las 4 h desde el inicio de la isquemia, que se mantuvieron hasta el final del procedimiento (24 h). Esta es una cuestión metodológica de la máxima importancia, ya que las diferencias en los paradigmas de administración hormonal resultan en concentraciones séricas de hormonas muy diferentes, razón por la cual algunos estudios en animales indican que los estrógenos aumentan el daño isquémico mientras que en otros se muestra un claro efecto neuroprotector (122,123). En cuanto a E2, se alcanzó una concentración sostenida en plasma de ~46 pg/ml a las 4 h después de la administración. Tales valores son acordes con los indicados por otros autores (122–124), y son equivalentes a los niveles circulantes basales de E2 encontrados durante la fase de proestro-estro. Otros estudios han utilizado dosis resultantes en concentraciones plasmáticas suprafisiológicas de E2 (125–128). En cuanto a BZA, actualmente se prescribe para el tratamiento de la osteoporosis postmenopáusica en mujeres a la dosis recomendada de 20 mg/día, es decir, aproximadamente 0,3 mg/kg/día para un peso corporal de 60 kg. Tal dosis alcanza una concentración plasmática máxima de 3,43 ng/ml a 1,2 h (129). Resultados del mismo grupo (130) muestran una concentración plasmática máxima de ~ 25 ng/ml en ratas inmediatamente después de una única inyección de 0,2 mg/kg, que se ajusta muy bien a los valores

obtenido en el presente estudio (~21 ng/ml). Además, la dosis que hemos establecido para BZA está dentro del rango de 0,3-3 mg/kg/día que ha demostrado proteger de la pérdida de masa ósea solo con leves efectos estimulantes en el endometrio uterino y ningún efecto sobre función vasomotora (91). Puesto que la mayoría de pacientes de ictus no cumplen la ventana terapéutica de 3-4,5 h para la trombolisis-trombectomía, nuestro protocolo parece de gran relevancia clínica.

1.6 Valoración de los puntos finales: 24h

El final de los procedimientos experimentales se ha establecido en 24 h tras el inicio de la isquemia. Si bien se hubieran podido fijar otros tiempos (anteriores y posteriores) para tener una perspectiva más completa de la evolución del daño cerebral así como de los mecanismos implicados, en ausencia y presencia de los dos presuntos neuroprotectores (BZA y E2), criterios de tipo clínico han aconsejado la valoración a las 24 h. La medición del volumen de infarto mediante técnicas de imagen de difusión ponderada (“*diffusion-weighted imaging*”, DWI) a las 24 h, se ha establecido desde hace tiempo como un factor predictivo principal del resultado final del ictus. Esto aún cobra más relevancia en la era de la recanalización, ya que la reducción del volumen de infarto debida a la reperusión inmediata queda englobada también en la valoración, con lo cual el valor predictivo en el resultado final en la fase crónica (> 3 meses) es aún más potente (131–133). Por otra parte, según el *National Institute of Health Stroke Scale* (NIHSS), las 24 h tras la aparición de los síntomas es el momento en el cual debe valorarse la condición clínica si, como es el caso, se pretende evaluar el efecto de un determinado tratamiento en la fase aguda. Los tiempos para evaluaciones posteriores son 7-10 días para la fase subaguda, y 3 meses para la fase crónica. Un apoyo adicional es que el examen neurológico a las 24 h predice el resultado final

a 1 y 3 meses post-ictus (134,135). Estas son las razones por las que la mayoría de investigaciones sobre el presunto efecto neuroprotector de diferentes moléculas en el ictus isquémico, establecen el tiempo de 24 h como punto final de los experimentos.

2. Influencia de la diabetes sobre la fisiología básica de la isquemia-reperfusión

En la mayoría de estudios clínicos sobre la influencia mutua ictus-diabetes, el ictus se ha considerado tradicionalmente una complicación macrovascular de la diabetes debido a la aceleración de la aterosclerosis y de la enfermedad carotídea. Sin embargo, las evidencias de que la microvascularización cerebral, representada a su nivel más íntimo por la unidad neuro-vascular, resulta afectada por la DM son cada vez más abundantes (136). Numerosos estudios experimentales en los que se ha utilizado el modelo de DM inducida por STZ (el mismo utilizado en el presente estudio), han puesto de manifiesto importantes alteraciones ultraestructurales. La membrana basal de los capilares sufre un engrosamiento que se caracteriza por la deposición de colágeno y nódulos amorfos denominados “mechones de algodón”. Dicho engrosamiento compromete la integridad de las células adyacentes que descansan sobre dicha membrana basal: células musculares lisas, pericitos y pies terminales de astrocitos (21). También se produce degeneración endotelial. Todos estos cambios afectan finalmente a la BBB, cuya permeabilidad se ve incrementada en periodos de tiempo tan tempranos como 2 semanas desde la inducción de la diabetes con STZ. Por otra parte, además de las alteraciones ultraestructurales, también se ha evidenciado remodelación vascular en periodos de tiempo tan tempranos como 4 semanas desde la inducción de la diabetes con STZ (niveles plasmáticos de glucosa > 300 mg/dl), momento en el que las ramas colaterales aumentan en número y calibre y

empiezan a adquirir una morfología tortuosa. Finalmente, todos estos cambios estructurales determinan cambios en la función cerebrovascular, los cuales se manifiestan fundamentalmente en el deterioro de los mecanismos vasodilatadores y el consiguiente aumento del tono cerebrovascular (vasoconstricción) y disminución del FSC (137,138).

En función de las evidencias que se acaban de describir, cabría la posibilidad de que el perfil de la señal de PC registrada en nuestros experimentos difiriera en algún aspecto entre animales normoglucémicos y diabéticos. Esta suposición se fundamenta en el hecho de que la señal de PC que se registra en nuestros experimentos refleja el comportamiento de la microcirculación en su nivel más íntimo en la región cortical, el cual, como ya se ha descrito más arriba, se ve profundamente alterado. Sin embargo, no se apreciaron diferencias significativas entre ambas condiciones. En línea con lo que sugieren muchos investigadores, la influencia del tipo de diabetes así como el grado y duración de la hiperglucemia sobre la regulación espacio-temporal de la circulación cerebral, requiere de estudios posteriores.

3. Influencia de la diabetes sobre el daño cerebral isquémico

Diferentes estudios epidemiológicos demuestran que la DM es una comorbilidad que afecta negativamente a los pacientes de ictus. Como paso previo al estudio del efecto neuroprotector de BZA y E2 en condiciones de normoglucemia y DM, se ha evaluado la influencia de esta última sobre el daño cerebral inducido por isquemia-reperfusión. A este respecto, se han valorado la condición neurofuncional motora y el volumen de infarto cerebral. Los resultados han sido dispares en tanto en cuanto los animales diabéticos obtuvieron una puntuación significativamente más alta que los normoglucémicos en la escala

utilizada a tal fin (véase “Material y métodos”), lo cual denota una peor condición neurofuncional de los animales diabéticos. En contraste, no se evidenciaron diferencias significativas entre los volúmenes de infarto totales y regionales obtenidos en ambos grupos.

El efecto de la hiperglucemia diabética sobre el volumen de infarto en el modelo MCAO ha sido objeto de revisión sistemática y metaanálisis (139). El estudio concluye que, si bien la hiperglucemia en el inicio de la isquemia incrementa considerablemente el volumen de infarto, esto es atribuible predominantemente a su mayor efecto en el modelo STZ, el cual simula la DM de tipo 1. En el modelo de hiperglucemia inducida por dextrosa, por el contrario, el incremento del volumen de infarto es mucho menor, aunque sigue siendo significativamente mayor que en los animales normoglucémicos. Los autores concluyen que, aunque la hiperglucemia exagera el volumen de infarto en el modelo MCAO, los estudios son heterogéneos y no abordan el problema clínico común de la hiperglucemia post-ictus, ya que se ha usado o bien el modelo STZ que simula la DM tipo 1, o bien una carga exageradamente alta de glucosa (dextrosa). En cualquier caso, nuestros resultados confirman el efecto deletéreo de la DM sobre el daño cerebral isquémico estimado en base a la peor condición neurofuncional de los animales diabéticos.

4. Efecto de BZA y E2 sobre el daño cerebral tras isquemia-reperfusión en condiciones de normoglucemia y diabetes

En el presente estudio el presunto efecto neuroprotector de BZA se ha investigado en paralelo con el de E2. Estudios previos han demostrado que este estrógeno endógeno confiere neuroprotección en el ictus isquémico; sin embargo, no existe unanimidad a este respecto (122,140). En la presente

investigación se ha asumido (y posteriormente demostrado) el efecto neuroprotector de E2, razón por la que ha sido utilizado como control positivo (141,142).

Nuestros resultados demuestran por primera vez que BZA ejerce efecto neuroprotector tras isquemia-reperfusión. Dicho efecto se manifiesta tanto en la mejoría del estado neurofuncional como en la reducción del volumen de infarto, y además es independiente del estado glucémico; es decir, no resulta menoscabado en condiciones de DM. Este perfil neuroprotector parece más favorable que el de E2, en tanto en cuanto el estrógeno endógeno no mejoró la valoración neurofuncional en condiciones de normoglucemia, aunque redujo en igual medida el volumen total del infarto. El sexo se considera un determinante importante del resultado final de ictus, y de hecho algunos estudios indican que E2 disminuye el volumen de infarto en hembras pero no en machos (143,144). Nuestros resultados no están en línea con estos estudios previos, sino que por el contrario confirman el efecto neuroprotector de E2 en machos (126,127). Se hace necesario, por lo tanto, determinar si el efecto neuroprotector de BZA también se desarrolla en hembras. Además, una condición importante del diseño del presente estudio es que ambos ligandos estrogénicos, BZA y E2, se administraron en la fase hiperaguda del ictus, alcanzándose los niveles plasmáticos idóneos a las 4 h desde el inicio del procedimiento. Otros autores han objetivado el efecto neuroprotector de E2 tras su administración aguda (125–128). Este hecho puede tener importantes implicaciones clínicas si los SERMs se diseñan y se utilizan en el tratamiento en lugar de en la prevención del ictus isquémico(145).

Por otra parte, la región diana para E2 y BZA parece ser diferente y dependiente del estado glucémico: 1) BZA, pero no E2, redujo la lesión cortical en animales normoglucémicos, y ambos tuvieron dicho efecto en condiciones de DM;

2) E2, pero no BZA, redujo la lesión subcortical en condiciones de normoglucemia, y ninguno de los dos ligandos tuvo efecto alguno en condiciones de DM. Por lo que respecta a E2, nuestros resultados son coincidentes con los de otros autores (126). Tanto los ER como determinados mecanismos vasculares podrían justificar estas diferencias. En cuanto a los ER, los efectos de E2 están mediados por su interacción con los tres tipos de ER: ER α , ER β y GPER (146). Aunque todos ellos parecen estar implicados en el efecto neuroprotector de E2, el papel de ER α parece ser más relevante (especificidad de receptor). Además, todos los tipos de células cerebrales (neuronas, glía, células endoteliales y células musculares lisas), pero no todas las células de cada tipo, poseen ER (especificidad celular). Esto, unido al hecho de que células de diferentes regiones responden a E2 con diferentes afinidades (especificidad regional) (147), podría contribuir, entre otros factores, a los patrones diferentes de neuroprotección regional para BZA y E2. En cuanto a los factores de tipo vascular, se ha puesto de manifiesto que E2 preserva el flujo sanguíneo isquémico en la región subcortical, pero no en la región cortical (148).

Cabe destacar, por lo tanto, la importancia que tiene el hecho de que el efecto neuroprotector de BZA no se vea menoscabado en condiciones de DM. Esto aumenta la trasladabilidad de nuestros resultados y proporciona apoyo a la consideración de BZA como una alternativa probablemente más eficaz, y además más segura, que el tratamiento coadyuvante con E2 simultáneamente con las intervenciones de recanalización exitosas. Tomados en conjunto, estos resultados pueden tener importantes implicaciones clínicas si los SERMs se diseñan y se utilizan en el tratamiento agudo del ictus isquémico en lugar de como método preventivo (145).

4.1 Efecto de BZA y E2 sobre la muerte celular apoptótica

La limitación de la expansión del núcleo isquémico mediante la reducción de la muerte celular apoptótica en la penumbra circundante, es el objetivo más importante de las terapias neuroprotectoras. La apoptosis neuronal puede ocurrir a través de las vías intrínseca (mitocondrial) y extrínseca (receptores de muerte) para activar la caspasa-3 y conducir a la fragmentación del ADN, dos marcas distintivas de la apoptosis. Se necesita un proceso de dos pasos para la activación de la caspasa-3. Primero, el zimógeno inactivo (proforma de caspasa-3) es escindido por las caspasas corriente arriba para formar el complejo intermedio p19/12. El segundo paso implica el procesamiento autocatalítico para generar la forma p17/12 completamente activada de caspasa-3 (149). Para estudiar la activación de la caspasa-3, llevamos a cabo: 1) el análisis de transferencia Western utilizando un anticuerpo que detecta los niveles endógenos de los fragmentos grandes de caspasa-3 intermedia (19 kDa) y completamente activada (17 kDa); y 2) el ensayo funcional de la Caspasa por la unión de FAM-DEVD-FMK en secciones de cerebro.

Nuestros resultados demuestran que BZA ejerce efecto antiapoptótico al inhibir intensamente la actividad caspasa-3 y disminuir los recuentos de células TUNEL-positivas. Esto ocurrió en la región cortical del hemisferio isquémico pero no en la subcortical, lo cual está en línea con nuestros resultados anteriores sobre el volumen de infarto (150). El mismo patrón de neuroprotección se demostró para E2 ya que, si se compara adecuadamente, los efectos de BZA y los de E2 fueron de la misma magnitud. Estos resultados están en franca concordancia con los obtenidos en condiciones de DM, los cuales demuestran que BZA actúa igualmente como un agente antiapoptótico (ensayos TUNEL y caspasa-3) en la región cortical.

Si bien el efecto antiapoptótico de E2 se ha descrito en modelos de isquemia cerebral focal (151–153) y global (154–156), y en modelos *in vitro* (modelo de privación de oxígeno-glucosa [OGD] en cultivos celulares) (152,156–158), este mecanismo apenas se ha investigado en los SERMs. La hipótesis de que el mecanismo neuroprotector del SERM tamoxifeno en la isquemia cerebral podría deberse a su capacidad para atenuar la muerte celular apoptótica, fue sugerido y verificado primeramente por Wakade et al. (159) y posteriormente confirmado por Zou et al. (160). Por el contrario, se ha comunicado que tanto BZA como el SERM raloxifeno no tienen efecto sobre el aumento de la actividad de la caspasa-3 inducido por hipoxia en células de hipocampo en cultivo (161). Por lo tanto, nuestros resultados apoyan la evidencia de que, como en el caso de E2, BZA actúa como fármaco antiapoptótico efectivo en el ictus isquémico con reperfusión.

5. Efecto de BZA y E2 sobre la expresión de receptores estrogénicos ER α , ER β y GPER en condiciones de normoglucemia y diabetes.

Está descrito que, al igual que en otros tejidos, las acciones de E2 en el cerebro están mediadas por la activación de los dos receptores estrogénicos nucleares clásicos, ER α y ER β , también asociados a la membrana plasmática, y del ER asociado a la membrana, GPER (162,163). Aunque el BZA se une tanto a ER α como a ER β , posee una afinidad ligeramente mayor por ER α (164). Varios estudios en modelos de daño neuronal han demostrado que los ER están involucrados en los efectos antiapoptóticos de E2 ó agonistas específicos. El ER α parece ser particularmente relevante (165–168), aunque también se ha comunicado que tanto ER β (156) como GPER (157,169) median los efectos antiapoptóticos inducidos por estrógenos. No existe, por lo tanto, unanimidad en cuanto a qué receptores y en qué sentido se ven afectados tras la isquemia. El sexo (machos

versus hembras intactas u ovariectomizadas), así como el modelo animal de accidente cerebrovascular isquémico (permanente [p] *versus* transitorio [t] MCAO) son probablemente las principales condiciones metodológicas que podrían explicar estas discrepancias (165,170). En las condiciones establecidas en el diseño del presente estudio (rata macho sometidas a tMCAO), se ha investigado la implicación de los cambios de expresión de los ER en los efectos neuroprotectores de BZA y E2.

El análisis por PCR mostró que, en comparación con el hemisferio contralateral (sano), el episodio de isquemia-reperfusión disminuyó la expresión de mRNA tanto de ER α como de ER β en el hemisferio isquémico, mientras que la expresión de mRNA de GPER no se vio alterada. Este perfil se evidenció tanto en animales normoglucémicos como diabéticos. BZA y E2 mostraron efectos diferentes sobre el perfil de expresión: mientras que BZA revirtió la regulación a la baja de la expresión de mRNA tanto de ER α como de ER β , E2 reprodujo dicho efecto con respecto a la expresión del mRNA de ER α , pero no del mRNA de ER β . Estos resultados se compararon con los obtenidos en el análisis de proteínas. La isquemia-reperfusión también indujo una disminución en la expresión de la proteína ER α en el hemisferio isquémico, pero no modificó los niveles de ER β y GPER. En los animales diabéticos, tanto la expresión de ER α como la de ER β se vieron disminuidas. De acuerdo con los resultados de PCR, BZA revirtió la disminución en la expresión de la proteína ER α inducida por isquemia-reperfusión e indujo la sobreexpresión de la proteína ER β . Por el contrario, E2 revirtió la regulación a la baja de la expresión de la proteína ER α inducida por isquemia-reperfusión, pero no tuvo efecto sobre la de ER β , en línea con lo observado para la expresión de mRNA. Finalmente, ni BZA ni E2 indujeron cambios en la expresión de GPER.

En general, nuestros resultados sugieren que la expresión reducida de ER α y ER β conduce a la exacerbación de muerte celular apoptótica, y que el efecto neuroprotector de BZA y E2 reside, al menos en parte, en su capacidad para restaurar dicha disminución. En línea con estos resultados, recientemente se ha demostrado que BZA restaura los niveles de mRNA de ER α y ER β previamente reducidos en un modelo del ictus hemorrágico (hemorragia subaracnoidea) (97). Finalmente, independientemente del estado glucémico de los animales, así como del tratamiento con BZA o E2, los estudios de localización han demostrado que la inmunorreactividad de ER α y ER β se detectó predominantemente en el núcleo, ya que se colocó principalmente con la tinción DAPI, mientras que la inmunoreactividad GPER se mostró principalmente en la región citoplásmica/membrana de las células neurales, reafirmando la distribución de ER ya conocida (163).

6. Efecto de BZA y E2 sobre la activación de las vías MAPK/ERK1/2 y PI3K/Akt en condiciones de normoglucemia y diabetes

La “proteína quinasa activada por mitógenos” (MAPK) y la “fosfatidilinositol 3-quinasa/Akt” (PI3K/Akt) son dos importantes vías de señalización involucradas en la regulación de algunos eventos importantes de la fisiopatología del ictus. La “quinasa 1/2 regulada por señal extracelular” (ERK1/2) es uno de los miembros mejor caracterizados de la familia de MAPK, y las evidencias indican que se halla implicada en la regulación de la apoptosis tras la isquemia cerebral (49,171). Además, se ha demostrado que los ER asociados a la membrana median la activación de ambas vías de supervivencia (172). Estas vías pueden representar, por lo tanto, dianas terapéuticas de interés.

En cuanto a la vía MAPK/ERK1/2, nuestros resultados ponen de manifiesto que la isquemia-reperfusión aumentó significativamente los niveles de pERK1/2 (forma fosforilada de ERK1/2 indicativa de su actividad) en el hemisferio ipsilateral tanto en animales normoglucémicos como diabéticos. Sawe *et al.* (2008) realizaron un estudio comparativo en diferentes modelos de MCAO, en donde se observó que los niveles de pERK1/2 aumentan durante la fase de reperfusión, especialmente en la penumbra (171). En cuanto a nuestros resultados con BZA y E2, en los animales normoglucémicos BZA inhibió intensamente el aumento pERK1/2 inducido por isquemia-reperfusión, mientras que E2 no tuvo ningún efecto significativo. En condiciones de DM los resultados fueron ligeramente diferentes: BZA atenuó el aumento de pERK1/2, mientras que E2 solamente fue efectivo reduciendo la actividad pERK2. Tales hallazgos están en concordancia con los obtenidos por Wakade *et al.* (2008), en los que se objetiva que pERK1/2 se elevó significativamente tras la MCAO, y que el tratamiento con el SERM tamoxifeno fue capaz de atenuar dicho aumento. Este efecto se correlacionó con la reducción del tamaño del infarto (159). Por otro lado, Sun y Nan (2016) han revisado algunos estudios del uso de inhibidores de la actividad ERK (U0126 y PD184161), concluyendo que dichos inhibidores disminuyen el volumen de infarto en el modelo MCAO (49). En nuestro paradigma experimental la vía de señalización MAPK/ERK1/2 parece tener un efecto perjudicial antes que beneficioso, de modo que su inhibición por BZA quizás sea un mecanismo neuroprotector eficaz en el ictus isquémico. Sin embargo, también hay estudios que demuestran que la inhibición de ERK1/2 incrementa la pérdida neuronal en el hipocampo en un modelo de isquemia cerebral global de rata diabética (173). La controversia en cuanto a la naturaleza de la señalización ERK continúa existiendo, ya que se han descrito ambos roles tanto antiapoptóticos como proapoptóticos (174).

En cuanto a la vía PI3K/Akt, nuestros resultados muestran que la fosforilación de Akt (niveles de pAkt) se incrementa a las 24 h tras la isquemia-reperfusión en animales normoglucémicos y diabéticos, lo que está de acuerdo con los resultados obtenidos en un modelo de isquemia cerebral focal inducida fotoquímicamente (175). En cuanto a los tratamientos, ni BZA ni E2 modificaron esta respuesta ni en condiciones de normoglucemia ni de DM. Por el contrario, otros estudios han puesto de manifiesto una disminución de la expresión de pAkt 24 h después de la perfusión. Debido a estas discrepancias, surge la cuestión sobre si la vía PI3K/Akt debería inhibirse o activarse para evitar la apoptosis y promover la supervivencia celular. Aun así, estos resultados no se correlacionan con la disminución del volumen del infarto y la disminución de la muerte celular apoptótica objetivados en el presente estudio, y sugieren que el efecto antiapoptótico de BZA y E2 no se desarrolla mediante la modulación de la vía PI3K/Akt. Se sabe que pAkt no está catalíticamente activa en las neuronas post-isquémicas, y que el desarrollo de la isquemia genera una hiperfosforilación y activación de Akt, que a su vez puede promover la inducción de su inhibidor endógeno, “proteína moduladora carboxilo-terminal” (CTMP). Tras la inducción, CTMP se une rápidamente a Akt y extingue su actividad (176). Cabe sugerir que BZA y E2 suprimen la expresión de CTMP, permitiendo de esta manera la activación de pAkt y promoviendo la fosforilación e inactivación de dianas posteriores de Akt implicadas en la muerte celular apoptótica. De ser correcta la afirmación de que la activación de la ruta PI3K/Akt juega un papel neuroprotector en la isquemia cerebral, el hecho que ni BZA ni E2 inhiban su activación debe verse como una característica positiva de ambos ligandos estrogénicos (177).

7. Consideraciones finales

Entre los múltiples mecanismos de acción que pudieran mediar el efecto neuroprotector de BZA y E2, hay que mencionar los mecanismos cerebrovasculares. Estudios previos de nuestro grupo han demostrado que tanto E2 como determinados ligandos naturales de los ER, e. g. isoflavonas derivadas de la soja como genisteína y daidzeína, son capaces de relajar las arterias cerebrales por su efecto calcioantagonista (178,179), así como de incrementar el flujo sanguíneo cerebrocortical cuando se infunden directamente en la circulación cerebral (vía intracarotídea) (180). Por lo que respecta a la molécula principal objeto del presente estudio, BZA, hemos caracterizado su perfil farmacológico en arterias cerebrales aisladas, poniendo de manifiesto su efecto vasorrelajante mediado por la activación de ER α y GPER (181). Un estudio reciente de otros autores demuestra que BZA es capaz de relajar las arterias periféricas (mesentéricas) en mayor medida que E2 (182). Como valoración global, BZA podría incluirse en la lista de terapias prometedoras para el tratamiento farmacológico multimodal complementario de las terapias endovasculares.

Conclusiones

1. La DM no altera la función microvascular cerebrocortical durante la isquemia-reperfusión. Estimadas por la medición puntual de la perfusión cerebrocortical (técnica de láser-Doppler), tanto la fase de isquemia como la de perfusión son cualitativa y cuantitativamente similares entre animales normoglucémicos y diabéticos. Valorada globalmente, la fisiología básica durante la isquemia-reperfusión tampoco se ve afectada en condiciones de DM.
2. La DM tiene una repercusión negativa sobre el daño cerebral isquémico. Esta influencia se concreta en el mayor deterioro funcional de los animales, pero no en términos de volúmenes de infarto y edema cerebrales.
3. BZA ejerce efecto neuroprotector en la isquemia-reperfusión tanto en condiciones de normoglucemia como de DM. Dicho efecto consiste en la mejor valoración neurofuncional, la reducción del volumen de infarto, y la disminución de la apoptosis. Por su parte, el efecto neuroprotector de E2 es menos consistente en tanto en cuanto dicho ligando no mejora la valoración funcional en condiciones de normoglucemia.
4. Los receptores ER α y ER β , pero no GPER, están implicados en el efecto neuroprotector de BZA y E2. La isquemia-reperfusión induce la regulación a la baja de la expresión de ER α y ER β , pero no de GPER, tanto en condiciones de normoglucemia como de diabetes. BZA inhibe la regulación a la baja de la expresión de ER α y ER β inducida por isquemia-reperfusión, tanto en condiciones de normoglucemia como de diabetes. E2 inhibe la regulación a la baja de la expresión de ER α en ambas condiciones, pero no de ER β en condiciones de normoglucemia.

5. La vía MAPK/ERK1/2 está implicada en el efecto neuroprotector de BZA y, de forma menos consistente, de E2. BZA inhibe la activación de ERK1 y ERK2 inducida por isquemia-reperfusión, tanto en condiciones de normoglucesmia como de DM. La implicación de la vía MAPK/ERK1/2 en el efecto neuroprotector de E2 depende del estado glucémico: en condiciones de normoglucesmia E2 no modifica la actividad de la vía, mientras que en condiciones de DM únicamente inhibe la actividad pERK2. Por otro lado, la vía PI3K/Akt no está implicada en el efecto neuroprotector ni de BZA ni de E2, ya que ninguno de los dos ligandos estrogénicos inhiben la activación de la vía inducida por isquemia-reperfusión, ni en condiciones de normoglucesmia ni de DM.

Bibliografía

1. Mergenthaler P, Lindauer U, Dienel G, Meisel A. Sugar for the brain: the role of glucose in physiological and pathological brain function. *Trends Neurosci.* 2012;36(1):14347-57.
2. Attwell D, Buchan AM, Charpak S, Lauritzen M, Macvicar BA, Newman EA. Glial and neuronal control of brain blood flow. *Nature.* 2010;468:232-43.
3. Ginsberg MD. The cerebral collateral circulation: Relevance to pathophysiology and treatment of stroke. *Neuropharmacology.* 2018;134:280-92.
4. Hossmann K-A. Pathophysiology and Therapy of Experimental Stroke. *Cell Mol Neurobiol.* 2006;26(7-8):1055-81.
5. Armstead WM. Cerebral Blood Flow Autoregulation and Dysautoregulation. *Anesthesiol Clin.* 2016;34(3):465.
6. Waitt AE, Reed L, Ransom BR, Brown AM. Emerging Roles for Glycogen in the CNS. *Front Mol Neurosci.* 2017;10:73.
7. Special report from the National Institute of Neurological Disorders and Stroke. Classification of cerebrovascular diseases III. *Stroke.* 1990;21(4):637-76.
8. Manea M, Comsa M, Minca A, Dragos D, Constantin P. Brain-heart axis. *J Med Life.* 2015;8(3):266-71.
9. Radu RA, Terecoasă EO, Băjenaru OA, Tiu C. Etiologic classification of ischemic stroke: Where do we stand? *Clin Neurol Neurosurg.* 2017;159:93-106.
10. Adams HP, Bendixen BH, Kappelle LJ, Biller J, Love BB, Gordon DL, et al. Classification of Subtype of Acute Ischemic Stroke. *Stroke a J Cereb Circ.* 1993;23(1):35-41.

11. Salerno SM, Landry FJ, Schick JD, Schoomaker EB. The effect of multiple neuroimaging studies on classification, treatment, and outcome of acute ischemic stroke. *Ann Intern Med.* 1996;124(1):21-6.
12. Bogousslavsky J, van Melle G, Regli F. Acute cerebral vascular accidents. General results of the first 1000 cases in the Lausanne neurology registry. *Rev Med Suisse Rom.* 1988;108(1):3-15.
13. Feigin VL, Forouzanfar MH, Krishnamurthi R, Mensah GA, Connor M, Bennett DA, et al. Global and regional burden of stroke during 1990-2010: findings from the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet.* 2014;383(9913):245-54.
14. Instituto Nacional de Estadística. (National Statistics Institute) [Internet]. Disponible en: <https://www.ine.es/>
15. Mar J, Álvarez-Sabín J, Oliva J, Becerra V, Casado MÁ, Yébenes M, et al. The costs of stroke in Spain by aetiology: The CONOCES study protocol. *Neurol.* 2013;28(6):332-9.
16. O'Donnell M, Xavier D, Diener C, Sacco R, Lisheng L, Zhang H, et al. Rationale and Design of INTERSTROKE: A Global Case-Control Study of Risk Factors for Stroke. *Neuroepidemiology.* 2010;35(1):36-44.
17. Guzik A, Bushnell C. Stroke Epidemiology and Risk Factor Management. *Contin Lifelong Learn Neurol.* 2017;23(1):15-39.
18. Bartlett HE, Eperjesi F. Nutritional supplementation for type 2 diabetes: a systematic review. *Ophthalmic Physiol Opt.* 2008;28(6):503-23.
19. Caplan LR, Biller J, Leary MC, Lo EH, Thomas AJ, Yenari M, et al., editores. *Primer on cerebrovascular diseases.* 2.^a ed. Elsevier; 2017.
20. Ergul A, Abdelsaid M, Fouda AY, Fagan SC. Cerebral neovascularization in

- diabetes: implications for stroke recovery and beyond. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2014;34(4):553-63.
21. Ergul A, Li W, Elgebaly MM, Bruno A, Fagan SC. Hyperglycemia, diabetes and stroke: Focus on the cerebrovasculature. *Vascul Pharmacol.* 2009;51(1):44.
 22. Martini SR, Kent TA. Hyperglycemia in acute ischemic stroke: a vascular perspective. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2007;27(3):435-51.
 23. Astrup J, Siesjö BK, Symon L. Thresholds in cerebral ischemia - the ischemic penumbra. *Stroke.* 1981;12(6):723-5.
 24. Ginsberg MD. Adventures in the pathophysiology of brain ischemia: penumbra, gene expression, neuroprotection: the 2002 Thomas Willis Lecture. *Stroke.* 2003;34(1):214-23.
 25. Frenzl A, Csiba L. Pharmacological and non-pharmacological recanalization strategies in acute ischemic stroke. *Front Neurol.* 2011;2:32.
 26. Bandera E, Botteri M, Minelli C, Sutton A, Abrams KR, Latronico N. Cerebral Blood Flow Threshold of Ischemic Penumbra and Infarct Core in Acute Ischemic Stroke. *Stroke.* 2006;37(5):1334-9.
 27. Chen C, Parsons MW, Clapham M, Oldmeadow C, Levi CR, Lin L, et al. Influence of Penumbral Reperfusion on Clinical Outcome Depends on Baseline Ischemic Core Volume. *Stroke.* 2017;48(10):2739-45.
 28. Sun M-S, Jin H, Sun X, Huang S, Zhang F-L, Guo Z-N, et al. Free Radical Damage in Ischemia-Reperfusion Injury: An Obstacle in Acute Ischemic Stroke after Revascularization Therapy. *Oxid Med Cell Longev.* 2018;2018:3804979.
 29. George PM, Steinberg GK. Novel Stroke Therapeutics: Unraveling Stroke

- Pathophysiology and Its Impact on Clinical Treatments. *Neuron*. 2015;87(2):297-309.
30. Hu H-J, Song M. Disrupted Ionic Homeostasis in Ischemic Stroke and New Therapeutic Targets. *J Stroke Cerebrovasc Dis*. 2017;26(12):2706-19.
 31. Amantea D, Bagetta G. Excitatory and inhibitory amino acid neurotransmitters in stroke: from neurotoxicity to ischemic tolerance. *Curr Opin Pharmacol*. 2017;35:111-9.
 32. Yagami T, Yamamoto Y, Koma H. Pathophysiological Roles of Intracellular Proteases in Neuronal Development and Neurological Diseases. *Mol Neurobiol*. 2018;56(5):3090-112.
 33. Cogley JN, Fiorello ML, Bailey DM. 13 reasons why the brain is susceptible to oxidative stress. *Redox Biol*. 2018;15:490-503.
 34. Chan PH. Reactive Oxygen Radicals in Signaling and Damage in the Ischemic Brain. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2001;21(1):2-14.
 35. Li P, Stetler RA, Leak RK, Shi Y, Li Y, Yu W, et al. Oxidative stress and DNA damage after cerebral ischemia: Potential therapeutic targets to repair the genome and improve stroke recovery. *Neuropharmacology*. 2018;134:208-17.
 36. Jin R, Yang G, Li G. Inflammatory mechanisms in ischemic stroke: role of inflammatory cells. *J Leukoc Biol*. 2010;87(5):779-89.
 37. Jin R, Liu L, Zhang S, Nanda A, Li G. Role of inflammation and its mediators in acute ischemic stroke. *J Cardiovasc Transl Res*. 2013;6(5):834-51.
 38. Iadecola C, Anrather J. The immunology of stroke: from mechanisms to translation. *Nat Med*. 2011;17(7):796-808.

39. Zheng Z, Yenari MA. Post-ischemic inflammation: molecular mechanisms and therapeutic implications. *Neurol Res.* 2004;26(8):884-92.
40. Lai AY, Todd KG. Microglia in cerebral ischemia: molecular actions and interactions. *Can J Physiol Pharmacol.* 2006;84(1):49-59.
41. Liu Z, Chopp M. Astrocytes, therapeutic targets for neuroprotection and neurorestoration in ischemic stroke. *Prog Neurobiol.* 2016;144:103-20.
42. Radak D, Katsiki N, Resanovic I, Jovanovic A, Sudar-Milovanovic E, Zafirovic S, et al. Apoptosis and Acute Brain Ischemia in Ischemic Stroke. *Curr Vasc Pharmacol.* 2017;15(2):115-22.
43. Rami A, Bechmann I, Stehle JH. Exploiting endogenous anti-apoptotic proteins for novel therapeutic strategies in cerebral ischemia. *Prog Neurobiol.* 2008;85(3):273-96.
44. Goldar S, Khaniani MS, Derakhshan SM, Baradaran B. Molecular mechanisms of apoptosis and roles in cancer development and treatment. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2015;16(6):2129-44.
45. Pistritto G, Trisciuglio D, Ceci C, Garufi A, D'Orazi G. Apoptosis as anticancer mechanism: function and dysfunction of its modulators and targeted therapeutic strategies. *Aging (Albany NY).* 2016;8(4):603-19.
46. Hassan M, Watari H, AbuAlmaaty A, Ohba Y, Sakuragi N. Apoptosis and molecular targeting therapy in cancer. *Biomed Res Int.* 2014;2014:150845.
47. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol.* 2007;35(4):495-516.
48. Soares-Silva M, Diniz FF, Gomes GN, Bahia D. The Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK) Pathway: Role in Immune Evasion by Trypanosomatids. *Front Microbiol.* 2016;7:183.

49. Sun J, Nan G. The Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK) Signaling Pathway as a Discovery Target in Stroke. *J Mol Neurosci*. 2016;90-8.
50. Kanekar SG, Zacharia T, Roller R. Imaging of stroke: Part 2, Pathophysiology at the molecular and cellular levels and corresponding imaging changes. *AJR Am J Roentgenol*. 2012;198(1):63-74.
51. Manners J, Steinberg A, Shutter L. Early management of acute cerebrovascular accident. *Curr Opin Crit Care*. 2017;23(6):556-60.
52. Hacke W, Kaste M, Bluhmki E, Brozman M, Dávalos A, Guidetti D, et al. Thrombolysis with Alteplase 3 to 4.5 Hours after Acute Ischemic Stroke. *N Engl J Med*. 2008;359(13):1317-29.
53. Wardlaw JM, Murray V, Berge E, del Zoppo GJ. Thrombolysis for acute ischaemic stroke. *Cochrane database Syst Rev*. 2014;7(7):CD000213.
54. Leng T, Xiong Z-G. Treatment for ischemic stroke: From thrombolysis to thrombectomy and remaining challenges. *Brain Circ*. 2019;5(1):8-11.
55. Berkhemer OA, Fransen PSS, Beumer D, van den Berg LA, Lingsma HF, Yoo AJ, et al. A Randomized Trial of Intraarterial Treatment for Acute Ischemic Stroke. *N Engl J Med*. 2015;372(1):11-20.
56. Nogueira RG, Jadhav AP, Haussen DC, Bonafe A, Budzik RF, Bhuva P, et al. Thrombectomy 6 to 24 Hours after Stroke with a Mismatch between Deficit and Infarct. *N Engl J Med*. 2018;378(1):11-21.
57. Albers GW, Marks MP, Kemp S, Christensen S, Tsai JP, Ortega-Gutierrez S, et al. Thrombectomy for Stroke at 6 to 16 Hours with Selection by Perfusion Imaging. *N Engl J Med*. 2018;378(8):708-18.
58. Hankey GJ. Stroke. *Lancet*. 2017;389(10069):641-54.

59. Patel RAG, McMullen PW. Neuroprotection in the Treatment of Acute Ischemic Stroke. *Prog Cardiovasc Dis.* 2017;59(6):542-8.
60. Chamorro Á. Neuroprotectants in the Era of Reperfusion Therapy. *J stroke.* 2018;20(2):197-207.
61. Frank É, Schneider G. Synthesis of sex hormone-derived modified steroids possessing antiproliferative activity. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2013;137:301-15.
62. Hammes SR, Levin ER. Impact of estrogens in males and androgens in females. *J Clin Invest.* 2019;129(5):1818-26.
63. Rossetti MF, Cambiasso MJ, Holschbach MA, Cabrera R. Oestrogens and Progestagens: Synthesis and Action in the Brain. *J Neuroendocrinol.* 2016;28(7).
64. Schumacher M, Weill-Engerer S, Liere P, Robert F, Franklin RJM, Garcia-Segura LM, et al. Steroid hormones and neurosteroids in normal and pathological aging of the nervous system. *Prog Neurobiol.* 2003;71(1):3-29.
65. Balthazart J, Choleris E, Remage-Healey L. Steroids and the brain: 50 years of research, conceptual shifts and the ascent of non-classical and membrane-initiated actions. *Horm Behav.* 2018;99:1-8.
66. Petrone AB, Gatson JW, Simpkins JW, Reed MN. Molecular and Cellular Endocrinology Non-feminizing estrogens : A novel neuroprotective therapy. *Mol Cell Endocrinol.* 2014;389(1-2):40-7.
67. Brailoiu E, Dun SL, Brailoiu GC, Mizuo K, Sklar LA, Oprea TI, et al. Distribution and characterization of estrogen receptor G protein-coupled receptor 30 in the rat central nervous system. *J Endocrinol.* 2007;193(2):311-21.

68. Srivastava DP, Evans PD. G-Protein Oestrogen Receptor 1: Trials and Tribulations of a Membrane Oestrogen Receptor. *J Neuroendocrinol.* 2013;25(11):1219-30.
69. Kumar A, Bean LA, Rani A, Jackson T, Foster TC. Contribution of estrogen receptor subtypes, ER α , ER β , and GPER1 in rapid estradiol-mediated enhancement of hippocampal synaptic transmission in mice. *Hippocampus.* 2015;25(12):1556-66.
70. Akama KT, Thompson LI, Milner TA, McEwen BS. Post-synaptic Density-95 (PSD-95) Binding Capacity of G-protein-coupled Receptor 30 (GPR30), an Estrogen Receptor That Can Be Identified in Hippocampal Dendritic Spines. *J Biol Chem.* 2013;288(9):6438.
71. Caldwell JD, Gebhart VM, Jirikowski GF. Estradiol's interesting life at the cell's plasma membrane. *Steroids.* 2016;111:4-11.
72. Céspedes Rubio ÁE, Pérez-Alvarez MJ, Lapuente Chala C, Wandosell F. Sex steroid hormones as neuroprotective elements in ischemia models. *J Endocrinol.* 2018;237(2):R65-81.
73. Zárate S, Stevnsner T, Gredilla R. Role of Estrogen and Other Sex Hormones in Brain Aging. Neuroprotection and DNA Repair. *Front Aging Neurosci.* 2017;9:430.
74. Kireev RA, Vara E, Viña J, Tresguerres JAF. Melatonin and oestrogen treatments were able to improve neuroinflammation and apoptotic processes in dentate gyrus of old ovariectomized female rats. *Age (Dordr).* 2014;36(5):9707.
75. Ding F, Yao J, Zhao L, Mao Z, Chen S, Brinton RD. Ovariectomy induces a shift in fuel availability and metabolism in the hippocampus of the female

- transgenic model of familial Alzheimer's. *PLoS One*. 2013;8(3):e59825.
76. Engler-Chiurazzi EB, Singh M, Simpkins JW. From the 90's to now: A brief historical perspective on more than two decades of estrogen neuroprotection. *Brain Res*. 2016;1633:96-100.
77. About WHI - About WHI [Internet]. Disponible en: <https://www.whi.org/>
78. Rossouw JE, Anderson GL, Prentice RL, LaCroix AZ, Kooperberg C, Stefanick ML, et al. Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results From the Women's Health Initiative randomized controlled trial. *JAMA*. 2002;288(3):321-33.
79. Effects of Conjugated Equine Estrogen in Postmenopausal Women With Hysterectomy. *JAMA*. 2004;291(14):1701.
80. Chester RC, Kling JM, Manson JE. What the Women's Health Initiative has taught us about menopausal hormone therapy. *Clin Cardiol*. 2018;41(2):247-52.
81. Wassertheil-Smoller S, Kaplan R, Salazar C. Stroke Findings in the Women's Health Initiative. *Semin Reprod Med*. 2014;32(06):438-46.
82. Wardell SE, Nelson ER, McDonnell DP. From empirical to mechanism-based discovery of clinically useful Selective Estrogen Receptor Modulators (SERMs). *Steroids*. 2014;90:30-8.
83. Silverman SL. New selective estrogen receptor modulators (SERMs) in development. *Curr Osteoporos Rep*. 2010;8(3):151-3.
84. Burguete MC, Torregrosa Pérez-Asensio GFJ, Castelló-Ruiz M, Salom Gil JBJ V., Alborch E. Dietary phytoestrogens improve stroke outcome after transient focal cerebral ischemia in rats. *Eur J Neurosci*. 2006;23(3):703-10.

85. Castelló-Ruiz M, Torregrosa G, Burguete MC, Salom JB, Gil JV, Miranda FJ, et al. Soy-derived phytoestrogens as preventive and acute neuroprotectors in experimental ischemic stroke: Influence of rat strain. *Phytomedicine*. 2011;18(6):513-5.
86. Palacios S. The future of the new selective estrogen receptor modulators. *Menopause Int*. 2007;13(1):27-34.
87. Mehta SH, Dhandapani KM, De Sevilla LM, Webb RC, Mahesh VB, Brann DW. Tamoxifen, a selective estrogen receptor modulator, reduces ischemic damage caused by middle cerebral artery occlusion in the ovariectomized female rat. *Neuroendocrinology*. 2003;77(1):44-50.
88. Kimelberg HK, Jin Y, Charniga C, Feustel PJ. Neuroprotective activity of tamoxifen in permanent focal ischemia. *J Neurosurg*. 2003;99(1):138-42.
89. Feng Y, Fratkins JD, LeBlanc MH. Treatment with tamoxifen reduces hypoxic-ischemic brain injury in neonatal rats. *Eur J Pharmacol*. 2004;484(1):65-74.
90. Baez-Jurado E, Rincón-Benavides MA, Hidalgo-Lanusca O, Guio-Vega G, Ashraf GM, Sahebkar A, et al. Molecular mechanisms involved in the protective actions of Selective Estrogen Receptor Modulators in brain cells. *Front Neuroendocrinol*. 2019;52:44-64.
91. Duggan ST, McKeage K. Bazedoxifene: a review of its use in the treatment of postmenopausal osteoporosis. *Drugs*. 2011;71(16):2193-212.
92. Kung A. Bazedoxifene: A new selective estrogen-receptor modulator for postmenopausal osteoporosis. *Int J Clin Rheumtol*. 2012;7(6):583-90.
93. Palacios S, Currie H, Mikkola TS, Dragon E. Perspective on prescribing conjugated estrogens/bazedoxifene for estrogen-deficiency symptoms of

- menopause: A practical guide. *Maturitas*. 2015;80(4):435-40.
94. Komm BS, Mirkin S. An overview of current and emerging SERMs. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2014;143:207-22.
 95. Vogelvang TE, Van Der Mooren MJ, Mijatovic V, Kenemans P. Emerging selective estrogen receptor modulators: Special focus on effects on coronary heart disease in postmenopausal women. *Drugs*. 2006;66(2):191-221.
 96. Lonard DM, Smith CL. Molecular perspectives on selective estrogen receptor modulators (SERMs): Progress in understanding their tissue-specific agonist and antagonist actions. Vol. 67, *Steroids*. 2002. p. 15-24.
 97. Maekawa H, Tada Y, Yagi K, Miyamoto T, Kitazato KT, Korai M, et al. Bazedoxifene, a selective estrogen receptor modulator, reduces cerebral aneurysm rupture in Ovariectomized rats. *J Neuroinflammation*. 2017;14(1).
 98. Ciriza I, Carrero P, Azcoitia I, Lundeen SG, Garcia-Segura LM. Selective estrogen receptor modulators protect hippocampal neurons from kainic acid excitotoxicity: Differences with the effect of estradiol. *J Neurobiol*. 2004;61(2):209-21.
 99. Cerciati M, Unkila M, Garcia-Segura LM, Arevalo M-A. Selective estrogen receptor modulators decrease the production of interleukin-6 and interferon- γ -inducible protein-10 by astrocytes exposed to inflammatory challenge in vitro. *Glia*. 2010;58(1):93-102.
 100. Lan Y-L, Wang X, Zou Y-J, Xing J-S, Lou J-C, Zou S, et al. Bazedoxifene protects cerebral autoregulation after traumatic brain injury and attenuates impairments in blood-brain barrier damage: involvement of anti-inflammatory pathways by blocking MAPK signaling. *Inflamm Res*.

- 2019;68(4):311-23.
101. Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, Cummins R. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *Stroke*. 1989;20(1):84-91.
 102. Bederson JB, Pitts LH, Tsuji M, Nishimura MC, Davis RL, Bartkowski H. Rat middle cerebral artery occlusion: evaluation of the model and development of a neurologic examination. *Stroke*. 1986;17(3):472-6.
 103. Sambrook J, Fritsch E, Maniatis T. *Molecular cloning : a laboratory manual*. 2010.
 104. Howells DW, Porritt MJ, Rewell SSJ, O'Collins V, Sena ES, van der Worp HB, et al. Different strokes for different folks: the rich diversity of animal models of focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2010;30(8):1412-31.
 105. Fluri F, Schuhmann MK, Kleinschnitz C. Animal models of ischemic stroke and their application in clinical research. *Drug Des Devel Ther*. 2015;9:3445-54.
 106. Sutherland BA, Neuhaus AA, Couch Y, Balami JS, DeLuca GC, Hadley G, et al. The transient intraluminal filament middle cerebral artery occlusion model as a model of endovascular thrombectomy in stroke. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2016;36(2):363-9.
 107. Rehni AK, Liu A, Perez-Pinzon MA, Dave KR. Diabetic aggravation of stroke and animal models. *Exp Neurol*. 2017;292:63-79.
 108. Sutherland BA, Papadakis M, Chen R-L, Buchan AM. Cerebral blood flow alteration in neuroprotection following cerebral ischaemia. *J Physiol*. 1 de septiembre de 2011;589(17):4105-14.
 109. Thomas A, Detilleux J, Flecknell P, Sandersen C. Impact of Stroke Therapy

- Academic Industry Roundtable (STAIR) Guidelines on Peri-Anesthesia Care for Rat Models of Stroke: A Meta-Analysis Comparing the Years 2005 and 2015. *PLoS One*. 2017;12(1):e0170243.
110. King A, Bowe J. Animal models for diabetes: Understanding the pathogenesis and finding new treatments. *Biochem Pharmacol*. 2016;99:1-10.
 111. King AJF. The use of animal models in diabetes research. *Br J Pharmacol*. 2012;166(3):877-94.
 112. Lenzen S. The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes. *Diabetologia*. 2008;51(2):216-26.
 113. Radenković M, Stojanović M, Prostran M. Experimental diabetes induced by alloxan and streptozotocin: The current state of the art. *J Pharmacol Toxicol Methods*. 2016;78:13-31.
 114. RAKIETEN N, RAKIETEN ML, NADKARNI M V. Studies on the diabetogenic action of streptozotocin (NSC-37917). *Cancer Chemother reports*. 1963;29:91-8.
 115. Thilakasiri P, Huynh J, Poh AR, Tan CW, Nero TL, Tran K, et al. Repurposing the selective estrogen receptor modulator bazedoxifene to suppress gastrointestinal cancer growth. *EMBO Mol Med*. 2019;11(4).
 116. Montoya MC, Krysan DJ. Repurposing Estrogen Receptor Antagonists for the Treatment of Infectious Disease. *MBio*. 2018;9(6):02272-18.
 117. Bourque M, Morissette M, Di Paolo T. Repurposing sex steroids and related drugs as potential treatment for Parkinson's disease. *Neuropharmacology*. 2019;147:37-54.
 118. Amantea D, Bagetta G. Drug repurposing for immune modulation in acute

- ischemic stroke. *Curr Opin Pharmacol.* 2016;26:124-30.
119. Towfighi J, Housman C, Vannucci RC, Heitjan DF. Effect of unilateral perinatal hypoxic-ischemic brain damage on the gross development of opposite cerebral hemisphere. *Biol Neonate.* 1994;65(2):108-18.
120. Kadam SD, Dudek FE. Neuropathological features of a rat model for perinatal hypoxic-ischemic encephalopathy with associated epilepsy. *J Comp Neurol.* 2007;505(6):716-37.
121. Tannenbaum J, Bennett BT. Russell and Burch's 3Rs then and now: the need for clarity in definition and purpose. *J Am Assoc Lab Anim Sci.* 2015;54(2):120-32.
122. Strom JO, Ingberg E, Theodorsson E, Theodorsson A. Effects of high and low 17 β -estradiol doses on focal cerebral ischemia: negative results. *Sci Rep.* 1 de diciembre de 2013;3(1):3111.
123. Ma Y-L, Qin P, Li Y, Shen L, Wang S-Q, Dong H-L, et al. The effects of different doses of estradiol (E2) on cerebral ischemia in an in vitro model of oxygen and glucose deprivation and reperfusion and in a rat model of middle carotid artery occlusion. *BMC Neurosci.* 9 de octubre de 2013;14:118.
124. Zhang B, Subramanian S, Dziennis S, Jia J, Uchida M, Akiyoshi K, et al. Estradiol and G1 Reduce Infarct Size and Improve Immunosuppression after Experimental Stroke. *J Immunol.* 15 de abril de 2010;184(8):4087-94.
125. Liu R, Wang X, Liu Q, Yang S-H, Simpkins JW. Dose dependence and therapeutic window for the neuroprotective effects of 17beta-estradiol when administered after cerebral ischemia. *Neurosci Lett.* 30 de marzo de 2007;415(3):237-41.

126. Mccullough LD, Nabil ;, Alkayed J, Traystman RJ, Williams MJ, Hurn PD. Postischemic Estrogen Reduces Hypoperfusion and Secondary Ischemia After Experimental Stroke. 2001.
127. Toung TJK, Traystman RJ, Hurn PD. Estrogen-Mediated Neuroprotection After Experimental Stroke in Male Rats. 1998.
128. Yang SH, Shi J, Day AL, Simpkins JW. Estradiol exerts neuroprotective effects when administered after ischemic insult. *Stroke*. 2000;31(3):745-50.
129. Chandrasekaran A, McKeand WE, Sullivan P, DeMaio W, Stoltz R, Scatina J. Metabolic Disposition of [14C]Bazedoxifene in Healthy Postmenopausal Women. *Drug Metab Dispos*. 1 de junio de 2009;37(6):1219-25.
130. Chandrasekaran A, Ahmad S, Shen L, DeMaio W, Hultin T, Scatina J. Disposition of bazedoxifene in rats. *Xenobiotica*. 7 de agosto de 2010;40(8):578-85.
131. Zaidi SF, Aghaebrahim A, Urra X, Jumaa MA, Jankowitz B, Hammer M, et al. Final Infarct Volume Is a Stronger Predictor of Outcome Than Recanalization in Patients With Proximal Middle Cerebral Artery Occlusion Treated With Endovascular Therapy. *Stroke*. 2012;43(12):3238-44.
132. Campbell BC V, Purushotham A, Christensen S, Desmond PM, Nagakane Y, Parsons MW, et al. The infarct core is well represented by the acute diffusion lesion: sustained reversal is infrequent. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2012;32(1):50-6.
133. Luby M, Warach SJ, Nadareishvili Z, Merino JG. Immediate changes in stroke lesion volumes post thrombolysis predict clinical outcome. *Stroke*. 2014;45(11):3275-9.
134. Rangaraju S, Jovin TG, Frankel M, Schonewille WJ, Algra A, Kappelle LJ, et al.

- Neurologic Examination at 24 to 48 Hours Predicts Functional Outcomes in Basilar Artery Occlusion Stroke. *Stroke*. 2016;47(10):2534-40.
135. Wouters A, Nysten C, Thijs V, Lemmens R. Prediction of Outcome in Patients With Acute Ischemic Stroke Based on Initial Severity and Improvement in the First 24 h. *Front Neurol*. 2018;9:308.
 136. Hill MD. Stroke and diabetes mellitus. En 2014. p. 167-74.
 137. Ergul A, Kelly-Cobbs A, Abdalla M, Fagan SC. Cerebrovascular complications of diabetes: focus on stroke. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets*. 2012;12(2):148-58.
 138. Prakash R, Li W, Qu Z, Johnson MA, Fagan SC, Ergul A. Vascularization Pattern after Ischemic Stroke is Different in Control versus Diabetic Rats: Relevance to Stroke Recovery. *Stroke*. 2013;44(10).
 139. MacDougall NJJ, Muir KW. Hyperglycaemia and infarct size in animal models of middle cerebral artery occlusion: systematic review and meta-analysis. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2011;31(3):807-18.
 140. Strom JO, Theodorsson A, Theodorsson E. Dose-related neuroprotective versus neurodamaging effects of estrogens in rat cerebral ischemia: A systematic analysis. Vol. 29, *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*. 2009. p. 1359-72.
 141. Inagaki T, Etgen AM. Neuroprotective action of acute estrogens: animal models of brain ischemia and clinical implications. *Steroids*. junio de 2013;78(6):597-606.
 142. Schreihöfer DA, Ma Y. Estrogen receptors and ischemic neuroprotection: Who, what, where, and when? *Brain Res*. 13 de junio de 2013;1514:107-22.
 143. Westberry JM, Prewitt AK, Wilson ME. Epigenetic regulation of the estrogen

- receptor alpha promoter in the cerebral cortex following ischemia in male and female rats. *Neuroscience*. 9 de abril de 2008;152(4):982-9.
144. Herson PS, Bombardier CG, Parker SM, Shimizu T, Klawitter J, Klawitter J, et al. Experimental pediatric arterial ischemic stroke model reveals sex-specific estrogen signaling. *Stroke*. marzo de 2013;44(3):759-63.
145. Suzuki S, Brown CM, Wise PM. Neuroprotective effects of estrogens following ischemic stroke. *Front Neuroendocrinol*. julio de 2009;30(2):201-11.
146. Schreihöfer DA, Ma Y. Estrogen receptors and ischemic neuroprotection: Who, what, where, and when? *Brain Res*. 13 de junio de 2013;1514:107-22.
147. Sak K, Everaus H. Nongenomic effects of 17 β -estradiol—diversity of membrane binding sites. *J Steroid Biochem Mol Biol*. abril de 2004;88(4-5):323-35.
148. Toung TK, Hurn PD, Traystman RJ, Sieber FE. Estrogen Decreases Infarct Size After Temporary Focal Ischemia in a Genetic Model of Type 1 Diabetes Mellitus. 2000;(Dm).
149. Han Z, Hendrickson EA, Bremner TA, Wyche JH. A sequential two-step mechanism for the production of the mature p17:p12 form of caspase-3 in vitro. *J Biol Chem*. 1997;272(20):13432-6.
150. Castelló-Ruiz M, Torregrosa G, Burguete MC, Miranda FJ, Centeno JM, López-Morales MA, et al. The selective estrogen receptor modulator, bazedoxifene, reduces ischemic brain damage in male rat. *Neurosci Lett*. 11 de julio de 2014;575:53-7.
151. Crosby KM, Connell BJ, Saleh TM. Estrogen limits ischemic cell death by modulating caspase-12-mediated apoptotic pathways following middle

- cerebral artery occlusion. *Neuroscience*. 8 de junio de 2007;146(4):1524-35.
152. Koh P-O. Estradiol attenuates down-regulation of PEA-15 and its two phosphorylated forms in ischemic brain injury. *Lab Anim Res*. 23 de marzo de 2015;31(1):40.
153. Rau SW, Dubal DB, Bo M, Gerhold LM, Wise PM. Estradiol Attenuates Programmed Cell Death after Stroke-Like Injury. 2003;23(36):11420-6.
154. Han D, Scott EL, Dong Y, Raz L, Wang R, Zhang Q. Attenuation of mitochondrial and nuclear p38 α signaling: A novel mechanism of estrogen neuroprotection in cerebral ischemia. Vol. 400, *Molecular and Cellular Endocrinology*. Elsevier Ireland Ltd; 2015. p. 21-31.
155. Jover T, Tanaka H, Calderone A, Oguro K, Bennett MVL, Etgen AM, et al. Estrogen Protects against Global Ischemia-Induced Neuronal Death and Prevents Activation of Apoptotic Signaling Cascades in the Hippocampal CA1. *J Neurosci*. 13 de abril de 2018;22(6):2115-24.
156. Ma Y, Guo H, Zhang L, Tao L, Yin A, Liu Z, et al. Estrogen replacement therapy-induced neuroprotection against brain ischemia-reperfusion injury involves the activation of astrocytes via estrogen receptor β . *Sci Rep*. 2016;6:21467.
157. Chen J, Hu R, Ge H, Duanmu W, Li Y, Xue X, et al. G-protein-coupled receptor 30-mediated antiapoptotic effect of estrogen on spinal motor neurons following injury and its underlying mechanisms. *Mol Med Rep*. 1 de agosto de 2015;12(2):1733-40.
158. Zhao T, Shi F, Hu J, He S, Ding Q, Ma L. GPER1 MEDIATES ESTROGEN-INDUCED NEUROPROTECTION AGAINST OXYGEN-GLUCOSE DEPRIVATION IN THE PRIMARY HIPPOCAMPAL NEURONS. *Neuroscience*. 2016;328:117-26.

159. Wakade C, Khan MM, De Sevilla LM, Zhang Q-G, Mahesh VB, Brann DW. Tamoxifen neuroprotection in cerebral ischemia involves attenuation of kinase activation and superoxide production and potentiation of mitochondrial superoxide dismutase. *Endocrinology*. 2008;149(1):367-79.
160. Zou W, Fang C, Ji X, Liang X, Liu Y, Han C. Estrogen Receptor (ER) - α 36 Is Involved in Estrogen- and Tamoxifen-Induced Neuroprotective Effects in Ischemic Stroke Models. 2015;1-14.
161. Rzemieniec J, Litwa E, Wnuk A, Lason W, Gołas A, Krzeptowski W, et al. Neuroprotective action of raloxifene against hypoxia-induced damage in mouse hippocampal cells depends on ER α but not ER β or GPR30 signalling. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2015;146:26-37.
162. Arevalo MA, Azcoitia I, Garcia-Segura LM. The neuroprotective actions of oestradiol and oestrogen receptors. Vol. 16, *Nature Reviews Neuroscience*. Nature Publishing Group; 2015. p. 17-29.
163. Engler-Chiurazzi EB, Brown CM, Povroznik JM, Simpkins JW. Estrogens as neuroprotectants: Estrogenic actions in the context of cognitive aging and brain injury. Vol. 157, *Progress in Neurobiology*. Elsevier Ltd; 2017. p. 188-211.
164. Miller CP, Collini MD, Tran BD, Harris HA, Kharode YP, Marzolf JT, et al. Design, synthesis, and preclinical characterization of novel, highly selective indole estrogens. *J Med Chem*. 2001;44(11):1654-7.
165. Dubal DB, Rau SW, Shughrue PJ, Zhu H, Yu J, Cashion AB, et al. Differential modulation of estrogen receptors (ERs) in ischemic brain injury: a role for ER α in estradiol-mediated protection against delayed cell death. *Endocrinology*. 2006;147(6):3076-84.

166. Brendel A, Felzen V, Morawe T, Manthey D, Behl C. Differential regulation of apoptosis-associated genes by estrogen receptor alpha in human neuroblastoma cells. *Restor Neurol Neurosci*. 2013;31(2):199-211.
167. Cikla U, Chanana V, Kintner DB, Udho E, Eickhoff J, Sun W, et al. ER α Signaling Is Required for TrkB-Mediated Hippocampal Neuroprotection in Female Neonatal Mice after Hypoxic Ischemic Encephalopathy(1,2,3). *eNeuro*. 2016;3(1).
168. Nilsen J, Mor G, Naftolin F. Estrogen-regulated developmental neuronal apoptosis is determined by estrogen receptor subtype and the Fas/Fas ligand system. *J Neurobiol*. 2000;43(1):64-78.
169. Broughton BR, Brait VH, Kim HA, Lee S, Chu HX, Gardiner-Mann C V, et al. Sex-dependent effects of G protein-coupled estrogen receptor activity on outcome after ischemic stroke. *Stroke*. 2014;45:835-41.
170. Dubal DB, Shughrue PJ, Wilson ME, Merchenthaler I, Wise PM. Estradiol modulates bcl-2 in cerebral ischemia: a potential role for estrogen receptors. *J Neurosci*. 1999;19(15):6385-93.
171. Sawe N, Steinberg G, Zhao H. Dual roles of the MAPK/ERK1/2 cell signaling pathway after stroke. *J Neurosci Res*. 2008;86(8):1659-69.
172. Arevalo MA, Azcoitia I, Garcia-Segura LM. The neuroprotective actions of oestradiol and oestrogen receptors. Vol. 16, *Nature Reviews Neuroscience*. 2015. p. 17-29.
173. Zhao Y, Li J, Tang Q, Zhang P, Jing L, Chen C, et al. Regulation of extracellular signal-regulated kinase 1/2 influences hippocampal neuronal survival in a rat model of diabetic cerebral ischemia. *Neural Regen Res*. 2014;9(7):749-56.

174. Li Q, Chen M, Liu H, Yang L, Yang T, He G. The dual role of ERK signaling in the apoptosis of neurons. *Front Biosci (Landmark Ed)*. 2014;19:1411-7.
175. Kim H-S, Park M-S, Lee J-K, Kim H-J, Park J-T, Lee M-C. Time point expression of apoptosis regulatory proteins in a photochemically-induced focal cerebral ischemic rat brain. *Chonnam Med J*. 2011;47(3):144-9.
176. Miyawaki T, Ofengeim D, Noh KM, Latuszek-Barrantes A, Hemmings BA, Follenzi A, et al. The endogenous inhibitor of Akt, CTMP, is critical to ischemia-induced neuronal death. *Nat Neurosci*. mayo de 2009;12(5):618-26.
177. Zhao TZ, Shi F, Hu J, He SM, Ding Q, Ma LT. GPER1 mediates estrogen-induced neuroprotection against oxygen-glucose deprivation in the primary hippocampal neurons. *Neuroscience*. 22 de julio de 2016;328:117-26.
178. Salom JB, Burguete MC, Pérez-Asensio FJ, Torregrosa G, Alborch E. Relaxant Effects of 17- β -Estradiol in Cerebral Arteries through Ca²⁺ Entry Inhibition. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2001;21(4):422-9.
179. Torregrosa G, Burguete MC, Pérez-Asensio FJ, Salom JB, Gil J V, Alborch E. Pharmacological profile of phytoestrogens in cerebral vessels: in vitro study with rabbit basilar artery. *Eur J Pharmacol*. 15 de diciembre de 2003;482(1-3):227-34.
180. Salom JB, Castelló-Ruiz M, Pérez-Asensio FJ, Burguete MC, Torregrosa G, Alborch E. Acute effects of three isoflavone class phytoestrogens and a mycoestrogen on cerebral microcirculation. *Phytomedicine*. agosto de 2007;14(7-8):556-62.
181. Castelló-Ruiz M, Salom JB, Fernández-Musoles R, Burguete MC, López-Morales MA, Arduini A, et al. Relaxant Effects of the Selective Estrogen

- Receptor Modulator, Bazedoxifene, and Estrogen Receptor Agonists in Isolated Rabbit Basilar Artery. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2016;68(4):313-21.
182. Zimmerman MA, Hutson DD, Mauvais-Jarvis F, Lindsey SH. Bazedoxifene-induced vasodilation and inhibition of vasoconstriction is significantly greater than estradiol. *Menopause*. 2019;26(2):172-81.