



Departamento de Fisiología y
Departamento de Psiquiatría, Radiología y Salud
Pública, Enfermería y Medicina
Facultad de Medicina

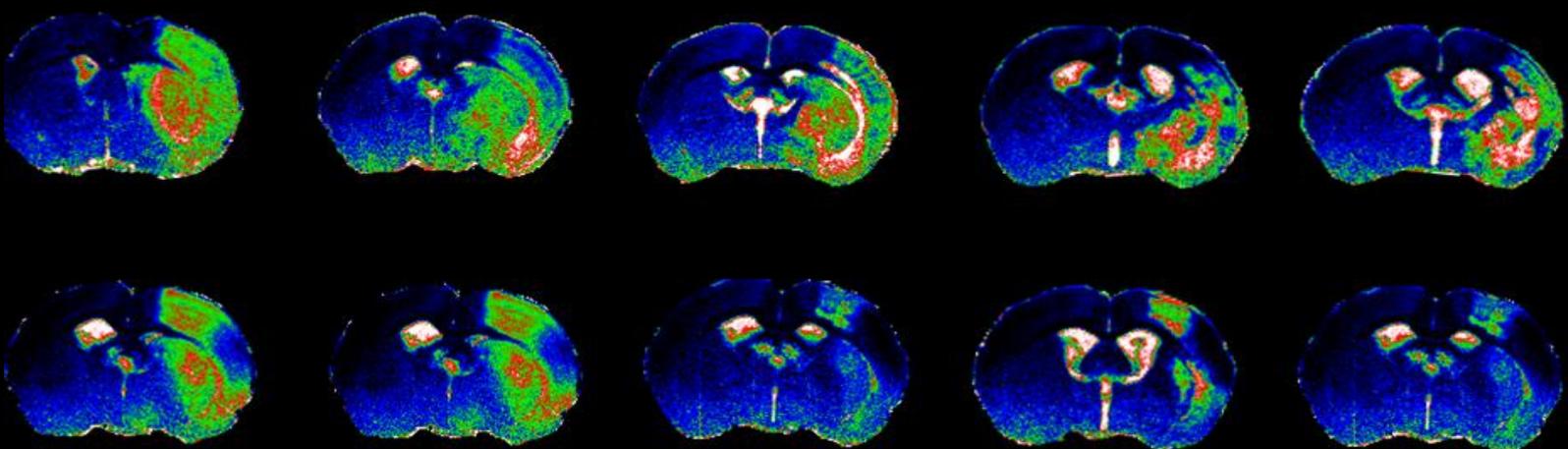
Programa de Doctorado en Endocrinología

ESTUDIO PRECLÍNICO DE LA PARADOJA DE LA OBESIDAD EN LA ISQUEMIA CEREBRAL: EFECTO TERAPÉUTICO DEL TRATAMIENTO CON NICOTINA

Tesis Doctoral

Tania López González

2017





Departamento de Fisiología
Departamento de Psiquiatría, Radiología y Salud Pública,
Enfermería y Medicina
Programa de Doctorado en Endocrinología

Estudio preclínico de la paradoja de la obesidad en la isquemia cerebral: efecto terapéutico del tratamiento con nicotina

Memoria que para optar al grado de Doctor presenta

Tania López González

Santiago de Compostela, 2017

El Prof. Dr. **JOSÉ CASTILLO SÁNCHEZ**, Director Científico del Instituto de Investigación Sanitaria de Santiago de Compostela (IDIS), el Prof. Dr. **MIGUEL ANTONIO LÓPEZ PÉREZ**, Profesor Titular del Departamento de Fisiología de la Universidad de Santiago de Compostela y el Dr. **TOMÁS SOBRINO MOREIRAS**, investigador Miguel Servet del IDIS y colaborador docente del Departamento de Psiquiatría, Radiología, Salud Pública, Enfermería y Medicina de la Universidad de Santiago de Compostela,

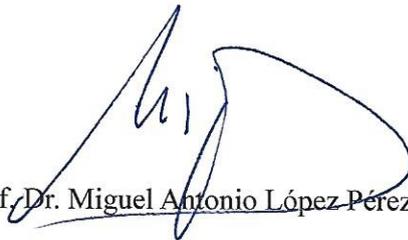
CERTIFICAN:

Que el presente trabajo titulado **“ESTUDIO PRECLÍNICO DE LA PARADOJA DE LA OBESIDAD EN LA ISQUEMIA CEREBRAL: EFECTO TERAPÉUTICO DEL TRATAMIENTO CON NICOTINA”** ha sido realizado bajo nuestra dirección por la Licenciada en Biología Molecular **TANIA LÓPEZ GONZÁLEZ** y que, considerando que reúne los requisitos pertinentes, autorizan su defensa como Tesis de doctorado ante el tribunal correspondiente en la Universidad de Santiago de Compostela.

Los directores:



Prof. Dr. José Castillo Sánchez



Prof. Dr. Miguel Antonio López Pérez



Dr. Tomás Sobrino Moreiras

En Santiago de Compostela, septiembre 2017



FINANCIACIÓN

El presente trabajo fue financiado por el Fondo de Investigaciones Sanitarias del Ministerio de Economía, Industria y Competitividad a través del Instituto Carlos III (PIE13/00024), por el Ministerio de Economía y Competitividad a través del Instituto de Salud Carlos III (RETICS INVICTUS+:RD16/0019) y por la Xunta de Galicia (Consellería de Educación: GRC2014/027).

Durante el período de desarrollo del trabajo, la doctoranda Tania López González ha sido beneficiaria de una ayuda predoctoral del Instituto de Investigación Sanitaria de Santiago de Compostela (convocatoria 2014).

En dicho período, el Prof. Dr. Miguel López ha sido beneficiario de una ayuda Starting Grant, modalidad Consolidator, del European Research Council (ERC-2011-StG-281854-LS4), y el Dr. Tomás Sobrino ha sido beneficiario de un contrato Miguel Servet del Instituto de Salud Carlos III (CP12/03121).





AGRADECIMIENTOS

Teño que dicir que este é o primeiro apartado da tese que escribo, e a razón é sinxela... a tese non tería sentido sen toda esta xente da que vou a falar! Igual me estendo máis da conta, pero a miña situación actual fai que os meus sentimentos se expresen sen control.

Agradecezoille aos meus directores de tese, Miguel, Tomás e Pepe, dar-me a oportunidade de formar parte dos seus respectivos grupos e poder levar a cabo esta tese, foi realmente enriquecedor para min a colaboración entre estos dous grandes grupos. Miguel, moitas grazas por ese primeiro voto de confianza sen apenas coñecerme. Tomás, a ti teño que agradecerche a hospitalidade coa que me recibiches no LINC. E Pepe, grazas polo teu apoio e por facer de todos nós un verdadeiro grupo.

Recordo moi ben o momento exacto no que Miguel me abreu as portas do laboratorio de Neurobesidade... alí coñecín ás persoas que me axudaron a emprender o camiño da tese. Cris, esa profesora que calquera desexa, grazas por ter sempre un sorriso e palabras de amabilidade. Noe e Patri, investigadoras natas e as mulleres máis traballadoras do mundo, fostes todo un referente para aprender. Laura e Eva, as dúas en punto, grazas por esa disposición e por facer que se formase un bo grupo de traballo, e en particular pola axuda cos últimos estudos moleculares cando eu máis o necesitaba. Isma, grazas por resolverme moitas dúbidas e por transmitir esa tranquilidade que tantas veces se precisa. Ángela, eres a espontaneidade en persoa, grazas por todas as risas contigo. Agradecer tamén ao resto de persoas do grupo, coas que non tiben a oportunidade de lidiar tanto; Ánxela, Ahmed, Luis Martins, Edward... E tamén á xente dos laboratorios veciños que forman a planta 0 do CIMUS...

Tres meses despois, tiben a oportunidade de coñecer á xente do LINC... Fran, grazas polos teus bos consellos e por demostrar que un IP tamén curra en poyata. A Bárbara e María, as suprenenas, maestras da ciencia e da vida, grazas por recibir cos brazos abertos a Carry Bradford no “despachito” e por facela soñar que algún día sería como vos. Ramón e Juan, esos físicos que tanto me costa entender ás veces, grazas por sempre poñer unha boa cara e por toda a axuda coas resonancias, sen vos faltarían capítulos na tese. Grazas tamén as persoas de ANEVAS, que fixeron que aprendese moito sobre a parte clínica de este campo. Decírlle aos novos membros do LINC, Pablo e Marta, que, aínda que non deu tempo a coñecernos demasiado, lles desexo moita sorte.

Quero facer un agradecemento especial ás persoas que me fixeron ver que “a ciencia é amor”. Esteban, amigo, a ti teño tanto que agradecerche... máis alá de todo o que me ensinaches como “tutor”, grazas por esos cafés, noites santiaguesas, conversas absurdas... e sobre, polos teus abrazos. Claris, tan diferentes e iguais ao mesmo tempo, grazas por saber entenderme con unha simple mirada e por poder contar contigo sempre, e sobre todo por todas as nosas “escondidas”... Andrés, guapo por fóra pero máis aínda por dentro, grazas por sacarme as risas

máis grandes no LINC e por estar pendente sempre de cómo estou; máis de un día fixeches que o meu día malo se convertise en bo. Antonio, ese home que calquera muller quixese ter ó seu lado, grazas pola túa xenerosidade, por facer as cousas sen que chas pidan, e pola túa naturalidade en xeral. Albiña, a persoa que se me pasa pola cabeza ante unha dúbida (científica e non...), grazas por resolvermas sempre e por todas as boas conversacións que me deches (cánto me gusta verte razoar). Nacho, a definición gráfica de “boa persoa”, grazas por ter sempre palabras amables e por sacarlle o punto positivo a todo, que falta fas no laboratorio. Manolito, tan intrigante como interesante, grazas polos teus alagos e polas tuas palabras educadas e caballerosas de vez en cando. Fernando, veciño e amigo da adolescencia, grazas por poder desfrutar da túa sabiduría no LINC tamén. Uxía, a dulzura en persoa, grazas por estar sempre disposta a todo, e sobre todo polas boas noites de festa. Héctor, grazas pola túa axuda cando comecei coas ciruxías e polos teus “chistazos” que me sacaron máis de un sorriso. Paulo, grazas por demostrar que sempre estas disposto a botar unha man. Por último, pero non por iso menos importante, a Joserra, o confidente de todo o laboratorio, o home con máis paciencia do mundo, grazas por todo.

Ás miñas amigas da universidade Nuria e María, grazas por seguir estando ahí na distancia.

Aos de sempre, David, Natalia, Laura, Chus, Sol, Kike, Suso, Sandra, Xiana... grazas por distraerme da ciencia de vez en cando.

En especial a Adri, Ana, Aitor e Silvia, grazas por apoiarme en este camiño que tomei e por brindarme a vosa amizade.

Moitas grazas Ana por axudarme a tomar decisións importantes.

Adri, grazas a ti por ser a persoa que sempre está pendente de todo.

A toda a miña familia, grazas por facerme sentir importante cada vez que vos interesades polo que fago.

Avoa María, grazas por ensinarme que loitando se consegue o que te propoñas.

Avoa Antonia, a miña segunda mama e a mellor persoa que coñezo, grazas por ensinarme os valores máis importantes da vida, oxalá algún chegue a ser así.

A ti, Iván, a miña outra metade, grazas por ser un perfecto compañeiro de viaxe e por aguantar o bo e o malo da ciencia ó meu lado. Grazas por entenderme, por apoiarme e por quererme. Por todo o que me das día a día, e polo tesouro que me deches este ano, grazas.

Finalmente, grazas á miña irma Alba e os meus país. A ti, Albis, por ser a nena dos meus ollos e sobre todo por darme tanto cariño de forma incondicional. Ao meu pai Antonio teño que agradecerlle que me ensinase a cuestionarme o porqué das cousas, así como os seus innumerables consellos que, aínda que non sempre sigo, sei que son acertados. Grazas por brindarme coa túa axuda sempre. E a miña nai, Leonor, agradezolle que me ensinase a “andar pola vida”, foi sempre, e é, o meu referente en todo. Grazas por facerme sentir que estas e estarás sempre.





La mejor manera de predecir el futuro es creándolo

Peter Durcker.





*A ti, meu froito,
polo moito que te quero sen aínda verte,
e por ser o combustible para escribir esta tese*





RESUMEN

Resumo

O ictus isquémico é unha das principais causas de morte e discapacidade en todo o mundo, pero o seu tratamento farmacolóxico redúcese á recanalización dos vasos, que só se aplica ó 5% dos pacientes. Por outro lado, a obesidade é un factor de risco para padecer un ictus, sen embargo, algúns estudos recentes falan da paradoxa da obesidade, suxerindo que os pacientes obesos poidan ter maiores taxas de supervivencia despois de un ictus en comparación ós pacientes de peso normal. Do mesmo xeito, o tabaquismo é un factor de risco para padecer esta enfermidade, pero tamén hai estudos que describen unha mellor resposta dos fumadores ao tratamento recanalizador tras un ictus. Ademais, *in vitro*, describiuse o efecto neuroprotector da nicotina e, *in vivo*, o pretratamento con nicotina parece mellorar a lesión. Por outro lado, describiuse que a nicotina conleva á inhibición hipotalámica da AMPK co consecuente balance enerxético negativo, tanto en ratas con dieta estándar como nun modelo de obesidade inducida por dieta. Ante isto, o obxectivo de este traballo foi estudar o efecto da obesidade nun modelo de rata inducido por dieta alta en graxa fronte a un grupo de ratas con dieta estándar sometidos á oclusión transitoria da arteria cerebral media (tMCAO), ao igual que o efecto do tratamento con nicotina en este modelo de isquemia cerebral dentro de ambos tipos de dieta. Ademais, ante a implicación da obesidade na homeostase enerxética e a inhibición da AMPK por parte da nicotina, levase a cabo o estudo molecular de este regulador homeostático e das rutas *downstream* da mesma de autofaxia, ER stress e apoptose.

Partindo de volumes de lesión basais homoxéneos, viuse que as ratas obesas amosan unha maior redución do volumen de lesión a longo prazo, a partir dos 14 días, así como un incremento da diminución do déficit motor e sensitivo aos 7 días, respecto ao grupo con dieta estándar. De forma parexa, viuse unha redución da apoptose (caspasa 3) neste grupo, mentras que non se observan diferenzas para as outras rutas estudadas. En ambos grupos de dieta, o tratamento con nicotina reduce os volumes de lesión dende as 24 horas e ó longo de 28 días. Ademais, este tratamento diminúe o edema e o déficit motor e sensorial dos animais. A nivel molecular observouse a inhibición das rutas de AMPK, autofaxia, ER stress e apoptose baixo o tratamento con nicotina. Coa activación de AMPK mediante AICAR revírtese o efecto neuroprotector da nicotina e a activación das outras rutas estudadas, corroborando que o mecanismo molecular que subxace ó efecto neuroprotector da nicotina implica a inhibición de esta kinasa.

Polo tanto, a obesidade reduce o volumen de lesión e o déficit motor e sensorial, a longo prazo, tras un ictus isquémico, probablemente a través da inhibición da apoptose. Por outro lado, o tratamento con nicotina reduce o volumen de lesión, o edema e o déficit motor e sensorial en

ratas isquémicas, e o mecanismo molecular parece ser a través da inhibición da AMPK e consecuentemente, das rutas de ER stress, autofagia e apoptose.

➤ Palabras chave: ictus isquémico, obesidade, nicotina, AMPK

Resumen

El ictus isquémico es una de las principales causas de muerte y discapacidad en todo el mundo, pero su tratamiento farmacológico se reduce a la recanalización de los vasos, que solo se aplica al 5% de los pacientes. Por otro lado, la obesidad es un factor de riesgo para padecer un ictus, sin embargo, algunos estudios recientes hablan de la paradoja de la obesidad, sugiriendo que los pacientes obesos puedan tener mayores tasas de supervivencia después de un ictus en comparación a los pacientes de peso normal. De la misma forma, el tabaquismo es un factor de riesgo para padecer esta enfermedad, pero también hay estudios que describen una mejor respuesta de los fumadores al tratamiento recanalizador tras un ictus. Además, *in vitro*, se ha descrito el efecto neuroprotector de la nicotina e, *in vivo*, el pretratamiento con nicotina parece mejorar la lesión. Por otro lado, se ha descrito que la nicotina desencadena la inhibición hipotalámica de la AMPK con el consecuente balance energético negativo, tanto en ratas con dieta estándar como en un modelo de obesidad inducida por dieta. Ante esto, el objetivo de este trabajo ha sido estudiar el efecto de la obesidad en un modelo de rata inducido por dieta alta en grasa frente a un grupo de ratas con dieta estándar sometidos a la oclusión transitoria de la arteria cerebral media (tMCAO), al igual que el efecto del tratamiento con nicotina en este modelo de isquemia cerebral dentro de ambos tipos de dieta. Además, ante la implicación de la obesidad en la homeostasis energética y la inhibición de la AMPK por parte de la nicotina, se ha llevado a cabo el estudio molecular de este regulador homeostático y de las rutas *downstream* de la misma de autofagia, ER stress y apoptosis.

Partiendo de volúmenes de lesión basales homogéneos, se ha visto que las ratas obesas muestran una mayor reducción del volumen de lesión a largo plazo, a partir de los 14 días, así como un incremento de la disminución del déficit motor y sensitivo a los 7 días, respecto al grupo con dieta estándar. Paralelamente, se ha visto una reducción de la apoptosis (caspasa 3) en este grupo, mientras que no se observan diferencias para las otras rutas estudiadas. En ambos grupos de dieta, el tratamiento con nicotina reduce los volúmenes de lesión desde las 24 horas y a lo largo de 28 días. Además, este tratamiento disminuye el edema y el déficit motor y sensorial de los animales. A nivel molecular se ha observado la inhibición de las rutas de AMPK, autofagia, ER stress y apoptosis bajo el tratamiento con nicotina. Con la activación de AMPK mediante AICAR se revierte el efecto neuroprotector de la nicotina y la activación de las otras rutas estudiadas, corroborando que el mecanismo molecular que subyace al efecto neuroprotector de la nicotina implica la inhibición de esta kinasa.

Por tanto, la obesidad reduce el volumen de lesión y el déficit motor y sensorial, a largo plazo, tras un ictus isquémico, probablemente a través de la inhibición de la apoptosis. Por otro lado, el tratamiento con nicotina reduce el volumen de lesión, el edema y el déficit motor y sensorial en ratas isquémicas, y el mecanismo molecular parece ser a través de la inhibición de la AMPK y consecuentemente, de las rutas de ER stress, autofagia y apoptosis.

➤ Palabras clave: ictus isquémico, obesidad, nicotina, AMPK

Abstract

Ischemic stroke is one of the leading causes of death and disability worldwide, but its pharmacologic treatment is reduced to recanalization of vessels, only for 5% of patients. On the other hand, obesity is a risk factor for stroke, however, some recent studies show the obesity paradox, suggesting that obese patients may have higher survival rates after a stroke compared to patients of normal weight. Likewise, smoking is a risk factor for this disease, but there are also studies that describe a better response to recanalization treatment after a stroke in smokers patients. In addition, the neuroprotective effect of nicotine has been described in vitro, and in vivo, the pretreatment with nicotine improves the lesion. On the other hand, it has been reported that nicotine triggers the hypothalamic inhibition of AMPK with a consequent negative energy balance in rats with standard diet and in a diet-induced obesity model. The objective of this project has been to study the effect of obesity on a high fat diet induced rat model in contrast to a group of rats with a standard diet undergoing transient occlusion of the middle cerebral artery (tMCAO), as well as the effect of nicotine treatment in this model of cerebral ischemia within both types of diet. In addition, due to the implication of obesity in energy homeostasis and the inhibition of AMPK by nicotine, it was carried out a molecular study of this homeostatic regulator and downstream pathways of autophagy, ER stress and apoptosis.

From homogeneous basal lesion volumes, obese rats show a long-term reduction in the volume lesion, after 14 days of ischemia, as well as in the neurological deficit at 7 days, in contrast to estándar group. Moreover, it has been observed a reduction of apoptosis (caspase 3) in this group. In both diet groups, nicotine treatment reduces lesion volumes from 24 hours and during 28 days. In addition, this treatment decreases edema and neurological deficit of animals. At the molecular level, the inhibition of AMPK, autophagy, ER stress and apoptosis has been observed under nicotine treatment. Activation of AMPK through AICAR reverses the neuroprotective effect of nicotine and activation of the other pathways studied, corroborating that the molecular mechanism underlying the neuroprotective effect of nicotine involves the inhibition of this kinase.

Thus, obesity reduces long-term volume lesion and motor and/or sensitive déficit after stroke, probably through the inhibition of apoptosis. On the other hand, nicotine treatment

reduces volume lesion, edema and neurological deficit in ischemic rats, and the molecular mechanism seems to be through the AMPK inhibition and, consequently, the ER stress, autophagy and apoptosis inhibition.

➤ Keywords: ischemic stroke, obesity, nicotine, AMPK







ÍNDICE

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS.....	29
INTRODUCCIÓN.....	37
1. Enfermedad cerebrovascular: ictus.....	37
1.1. Definición	37
1.2. Epidemiología	37
1.3. Clasificación.....	38
1.3.1. Ictus isquémico	39
1.3.2. Ictus hemorrágico.....	40
1.4. Factores de riesgo	40
1.4.3. Factores de riesgo no modificables	40
1.4.4. Factores de riesgo modificables.....	40
1.5. Fisiopatología.....	41
1.5.1. Descenso del flujo sanguíneo	41
1.5.2. Fallo energético.....	42
1.5.3. Desequilibrio iónico y despolarización de la membrana celular	44
1.5.4. Excitotoxicidad.....	44
1.5.5. Estrés oxidativo	46
1.5.6. Apoptosis.....	47
1.5.7. Inflamación	49
1.5.8. Mecanismos de regeneración.....	52
1.6. Enfoques terapéuticos para el tratamiento del ictus isquémico	52
1.6.1. Marcadores de progresión del ictus isquémico.....	53
1.6.2. Restauración del flujo sanguíneo	55
1.6.3. Neuroprotección.....	56
1.6.4. Neurorreparación.....	59
1.7. Modelos animales de isquemia cerebral.....	61
2. Obesidad.....	63
2.5. Definición	63
2.6. Importancia socioeconómica	64
2.7. Homeostasis energética	65
2.7.1. Concepto.....	65
2.7.2. Regulación de la homeostasis energética.....	67

2.7.2.1.	Señales periféricas	67
2.7.2.2.	Sistema nervioso central	69
3.	La paradoja de la obesidad en el ictus isquémico.....	70
3.1.	La obesidad como factor de riesgo para el ictus isquémico.....	70
3.2.	La obesidad como indicador de buen pronóstico tras un ictus isquémico	71
3.3.	Efecto de la obesidad en los modelos animales de isquemia cerebral.....	73
3.4.	Implicación de rutas moleculares relacionadas con el control de la homeostasis energética en el ictus isquémico	79
3.4.1.	La ruta de la AMPK.....	79
3.4.2.	El estrés del retículo endoplasmático.....	87
3.5.	El tratamiento dual con nicotina de la obesidad y el ictus isquémico.....	89
3.5.1.	La nicotina	89
3.5.2.	Efecto de la nicotina en la obesidad	90
3.5.3.	Efecto de la nicotina en el ictus isquémico	90
3.5.3.1.	La paradoja del tabaquismo en pacientes con ictus isquémico	90
3.5.3.2.	Efecto de la nicotina en modelos animales de isquemia cerebral.....	92
HIPÓTESIS		97
OBJETIVOS.....		101
MATERIALES Y MÉTODOS.....		105
4.	Modelo preclínico	105
4.1.	Manejo de animales.....	105
4.2.	Modelo de obesidad inducida por dieta.....	106
4.3.	Modelo de isquemia focal transitoria	107
4.4.	Criterios de inclusión	108
4.5.	Aleatorización de los grupos.....	109
4.6.	Diseño experimental.....	109
5.	Procedimientos para el seguimiento de los animales	111
5.1.	Administración de tratamientos.....	111
5.2.	Estudios por resonancia magnética	112
5.2.1.	Equipo de resonancia	112
5.2.2.	Protocolo de neuroimagen por resonancia magnética	112
5.2.2.1.	Angiografía por resonancia magnética.....	112
5.2.2.2.	Imágenes de difusión y mapas de coeficiente de difusión aparente	112
5.2.2.3.	Secuencia T2	113
5.2.3.	Análisis de las imágenes de resonancia magnética	113
5.3.	Evaluación funcional y del déficit motor y sensorial.....	114

5.4. Sacrificio, disección y extracción de tejidos	116
6. Análisis molecular de proteínas en el hemisferio ipsilateral	116
6.1. Extracción de proteína.....	116
6.2. Cuantificación de proteína	117
6.3. Western blot.....	117
6.3.1. Preparación de las muestras.....	117
6.3.2. Electroforesis	118
6.3.3. Transferencia.....	119
6.3.4. Inmunodetección de proteínas	120
6.3.5. Revelado y fijación de la señal.....	121
6.3.6. Cuantificación.....	122
7. Análisis estadístico.....	122
RESULTADOS	127
8. Animales incluidos en el estudio.....	127
9. Efecto de la obesidad en el modelo animal de isquemia cerebral	129
9.1. Evaluación del modelo de obesidad inducida por dieta	129
9.2. Influencia de la obesidad en el volumen de la lesión isquémica	131
9.3. Influencia en la formación del edema cerebral.....	133
9.4. Análisis funcional y del déficit motor y sensorial	134
9.5. Influencia de la obesidad en las rutas moleculares implicadas en la homeostasis energética	136
9.5.1. La ruta de la AMPK.....	136
9.5.2. La ruta de mTOR y de la autofagia.....	137
9.5.3. El ER stress.....	138
9.5.4. La apoptosis	138
10. Efecto neuroprotector de la nicotina en el modelo animal de isquemia cerebral	139
10.1. Disminución del peso corporal, ingesta y peso de la grasa	139
10.2. Reducción del volumen de lesión isquémica	142
10.3. Disminución del edema cerebral.....	144
10.4. Mejora funcional y del déficit motor y sensorial	146
10.5. Influencia de la nicotina en las rutas moleculares implicadas en el control de la homeostasis energética.....	147
10.5.1. Inhibición de la ruta de la AMPK.....	147
10.5.2. Inhibición de la autofagia	149
10.5.3. Inhibición del ER stress	150
10.5.4. Inhibición de la apoptosis	151

10.6. Reversión del efecto neuroprotector de la nicotina con un activador de la ruta de AMPK	152
10.6.1. Incremento del volumen de lesión y edema isquémico	152
10.6.2. Empeoramiento funcional y del déficit motor y sensorial	156
10.6.3. Reversión del efecto de la nicotina sobre las rutas moleculares implicadas en la homeostasis energética	159
10.6.3.1. Activación de la ruta de AMPK	159
10.6.3.2. Activación de la autofagia	160
10.6.3.3. Activación del ER stress	161
10.6.3.4. Influencia en la apoptosis	162
DISCUSIÓN	167
CONCLUSIONES	181
BIBLIOGRAFÍA	183







ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

- **5-HT:** 5-hidroxitriptamina
- **A:** Amperio
- **ACA:** Arteria cerebral anterior
- **ACC:** Acetil-CoA carboxilasa
- **ACC:** Arteria carótida común
- **ACE:** Arteria carótida externa
- **ACh:** Acetilcolina (*Acetylcholine*)
- **ACI:** Arteria carótida interna
- **ACM:** Arteria cerebral media
- **ADC:** Coeficiente de difusión aparente (*Apparent Diffusion Coefficient*)
- **ADP:** Adenosín difosfato (*Adenosine diphosphate*)
- **AICAR:** Ribonucleótido 5-aminoimidazol-4-carboxamida (*5-Aminoimidazole-4-Carboxamide Ribonucleotide*)
- **AIF:** Factor inductor de apoptosis (*Apoptosis-Inducing Factor*)
- **AIT:** Ataque isquémico transitorio
- **Akt:** Proteína kinasa B (PKB) codificada por el gen AKT
- **AMP:** Adenosín monofosfato (*Adenosine Monophosphate*)
- **AMPA:** Ácido α -amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazolpropiónico (*α -Amino-3-Hydroxy-5-Methyl-4-isoxazolePropionic Acid*)
- **AMPK:** Proteína kinasa activada por AMP (*AMP-Kinase*)
- **AP:** Área postrema
- **Apaf-1:** Factor -1 activador de proteasas de apoptosis (*Apoptosis Protease-Activating Factor-1*)
- **ARC:** Núcleo hipotalámico arcuato (*Arcuate*)
- **ATF6:** Factor de activación transcripcional 6 (*Activating Transcription Factor 6*)
- **ATP:** Adenosín trifosfato (*Adenosine Triphosphate*)
- **BAD:** Promotor de muerte asociado a Bcl-2 (*Bcl-2-associated Death promoter*)
- **BAT:** Tejido adiposo marrón (*Brown Adipose Tissue*)
- **BAX:** Proteína X asociada a Bcl-2 (*Bcl-2-associated X protein*)
- **BBB:** Barrera hematoencefálica (*Blood Brain Barrier*)
- **Bcl-2:** Familia de proteínas *B-cell lymphoma 2*
- **BDNF:** Factor neurotrófico derivado del cerebro (*Brain-Derived Neurotrophic Factor*)
- **BID:** *BH3 Interacting-domain Death agonist*
- **BiP:** Proteína de unión a inmunoglobulina (*Binding Immunoglobulin Protein*)
- **Ca⁺²:** Calcio
- **CaMKK β :** *Calcium/calmodulin-dependent protein Kinase Kinase β*
- **CCL:** *Chemokine Ligand C-C*
- **CD:** Células con *Clusters of differentiation*
- **CHOP:** Proteína homóloga de C/EBP (*C/EBP Homologous Protein*)
- **CKK:** Colecistoquinina
- **Cl:** Cloro
- **cm:** Centímetros
- **COX:** Ciclooxygenasa

- **CREB:** Proteína de unión a elementos de respuesta a cAMP (*cAMP Response Element-Binding*)
- **CRP:** Proteína C reactiva (*C Reactive Protein*)
- **CXC:** Quimioquina de tipo CXC; cisteína (C) en los extremos terminales de un aminoácido (X)
- **DAMP:** Patrones moleculares asociados al daño (*Damage-Associated Molecular Patterns*)
- **DAPK1:** Proteína kinasa 1 asociada a muerte celular (*Death Associated Protein Kinase 1*)
- **DISC:** Complejo señalizador de muerte inducida (*Death-Inducing Signaling Complex*)
- **DMH:** Núcleo hipotalámico dorsomedial (*Dorsomedial Hypothalamic nucleus*)
- **DWI:** Imagen de difusión (*Difusión Weighted Imaging*)
- **EAAT:** Transportador de glutamato (*Excitatory Amino Acid Transporter*)
- **ECV:** Enfermedad cerebrovascular
- **eIF2:** Factor de iniciación de la traducción eucariótica 2 (*eukaryotic Initiation Factor 2*)
- **eNOS:** Óxido nítrico sintetasa endotelial
- **ER:** Retículo endoplasmático (*Endoplasmic Reticulum*)
- **ERK:** Kinasa regulada extracelularmente (*Extracellular Signal-Regulated Kinase*)
- **E-selectina:** Selectina endotelial
- **FADH₂:** Dinucleótido de flavina y adenina en su forma reducida (*Flavin Adenin Dinucleotide*)
- **FAS:** Ácido graso sintasa (*Fatty Acid Sintase*)
- **FDA:** Agencia de Administración de comida y fármacos (*Food and Drug Administration*)
- **FOXO:** Proteína *Forkhead box* del tipo O
- **FSC:** Flujo sanguíneo cerebral
- **g:** Gramo
- **GABA:** Ácido γ -aminobutírico (*Gamma-Amino-Butyric Acid*)
- **GH:** Hormona del crecimiento (*Growth Hormone*)
- **GLP-1:** Péptido similar al glucagon -1 (*Glucagon Like Peptide -1*)
- **GLUT:** Transportador de glucosa (*Glucose Tranporter*)
- **GRP78:** Proteína de 78 kDa regulada por glucosa (*78 kDa glucose-regulated protein*)
- **h:** Hora
- **H₂O₂:** Peróxido de nitrógeno
- **HFD:** Dieta alta en grasa (*High Fat Diet*)
- **H_z:** Hercio
- **ICAM:** Molécula de adhesión intercelular (*Intercellular Adhesion Molecule*)
- **IL:** Interleuquina
- **IMC:** Índice de masa corporal
- **INF γ :** Interferon γ
- **iNOS:** Óxido nítrico sintetasa inducida inmunológicamente
- **IRE1:** Endonucleasa 1 que requiere inositol (*Inositol-Requiring Endoribonuclease 1*)
- **JNK:** Kinasa c-Jun N-terminal (*c-Jun N-terminal kinase*)
- **K⁺:** Potasio
- **KCl:** Cloruro de potasio
- **kg:** kilogramo
- **l:** Litro
- **LHA:** Núcleo hipotalámico lateral (*Lateral Hypothalamic Area*)

- **MCP:** Proteína quimiotáctica de monocitos (*Monocyte Chemoattractant Protein*)
- **Mg⁺²:** Magnesio
- **min:** Minuto
- **ml:** Mililitro
- **mm:** Milímetro
- **mm²:** Milímetro cuadrado
- **mm³:** Milímetro cúbico
- **MMP:** Metaloproteasa de matriz (*Matrix Metalloproteinase*)
- **mPTP:** Poro de transición de permeabilidad mitocondrial (*mitochondrial Permeability Transition Pore*)
- **MRA:** Angiografía por resonancia magnética (*Magnetic Resonance Angiography*)
- **MRI:** Imagen por resonancia magnética (*Magnetic Resonance Image*)
- **ms:** Milisegundos
- **mTOR:** Diana de rapamicina en células de mamífero (*mammalian Target Of Rapamycin*)
- **Na⁺:** Sodio
- **NAc:** Núcleo accumbens
- **nAChRs:** Receptores de acetilcolina neuronales (*neuronal Acetylcholine Receptors*)
- **NADH:** Dinucleótido de nicotinamida y adenina en su forma reducida (*Nicotin Adenin Dinucleotide*)
- **NCX:** Intercambiador de Na⁺/Ca⁺² (*Na⁺/Ca⁺² exchanger*)
- **NF-κB:** Nuclear Factor Kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
- **NIHSS:** Escala para el accidente cerebrovascular del Instituto Nacional de Salud (*National Institute of Health Stroke Scale*)
- **nm:** Nanometro
- **NMDA:** N-Metil-D-Aspartato
- **nNOS:** Óxido nítrico sintetasa neuronal
- **NO:** Óxido nítrico (*Nitric Oxide*)
- **NO₂:** Dióxido de nitrógeno
- **NOS:** Óxido nítrico sintetasa (*Nitric Oxide Synthase*)
- **N-terminal:** Extremo amino terminal
- **NTS:** Núcleo del tracto solitario
- **O₂⁻:** Anión superóxido
- **O₂:** Oxígeno
- **°C:** Grado centígrado
- **OGD:** Privación de glucosa y oxígeno (*Oxygen Glucose Deprivation*)
- **OH[•]:** Radical hidroxilo
- **OMS:** Organización mundial de la salud
- **ONOO⁻:** Peroxinitrito
- **pACC:** ACC fosforilada (*Phosphorylated ACC*)
- **pAMPK:** AMPK fosforilada (*Phosphorylated AMPK*)
- **pATF6:** ATF6 fosforilado (*Phosphorylated ATF6*)
- **PECAM:** Molécula de adhesión plaquetoesotelial (*Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule*)
- **peIF2:** eIF2 fosforilado (*Phosphorylated eIF2*)
- **PERK:** Protein kinase RNA-like Endoplasmatic Reticulum kinase
- **PET:** Tomografía por emisión de positrones (*Positron Emission Tomography*)
- **PFK2:** Fosfofructokinasa 2 (*Phosphofructokinase 2*)

- **PI3K:** Fosfoinositol-3-kinasa (*Phosphoinositide-3-Kinase*)
- **pIRE1:** IRE1 fosforilado (*Phosphorylated IRE*)
- **pJNK:** JNK fosforilada (*Phosphorylated JNK*)
- **pmTOR:** mTOR fosforilado (*Phosphorylated mTOR*)
- **PPAR_γ:** Receptor gamma activado por el proliferador de peroxisomas (*Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma*)
- **pPERK:** PERK fosforilada (*Phosphorylated PERK*)
- **ppp:** Píxeles por pulgada
- **pRAPTOR:** RAPTOR fosforilada (*Phosphorylated RAPTOR*)
- **pS6K:** S6K fosforilada (*Phosphorylated S6K*)
- **PSD95:** *PostSynaptic Density protein 95*
- **PTEN:** Fosfatasa homóloga de la tensina (*Phosphatase and Tensin homolog*)
- **pTSC2:** TSC2 fosforilada (*Phosphorylated TSC2*)
- **pUlk1:** Ulk1 fosforilada (*Phosphorylated Ulk1*)
- **PVH:** Núcleo hipotalámico paraventricular (*Paraventricular Hypothalamic nucleus*)
- **RAPTOR:** Proteína asociada a mTOR (*Regulatory-Associated Protein of mTOR*)
- **RD:** Real Decreto
- **RM:** Resonancia magnética
- **ROS:** Especies reactivas del oxígeno (*Reactive Oxygen Species*)
- **rtPA:** Activador del plasminógeno tisular recombinante (*recombinant Tissue Plasminogen Activator*)
- **s:** Segundo
- **S6K:** Kinasa ribosomal S6 de 70 kDa (*70 kDa ribosomal S6 Kinase*)
- **SDF-1:** Factor derivado de células estromales -1 (*Stromal cell-Derived Factor -1*)
- **Ser:** Serina
- **SNA:** Sistema nervioso autónomo
- **SNC:** Sistema nervioso central
- **SOD:** Superóxido dismutasa
- **STD:** Dieta estándar (*Standard Diet*)
- **SVZ:** Zona subventricular (*Subventricular Zone*)
- **T:** Teslas
- **TAC:** Tomografía axial computarizada
- **TAK1:** Kinasa 1 activada por el factor de crecimiento transformante β (*Transforming growth factor beta-Activated Kinase 1*)
- **TC:** Células T citotóxicas
- **Th:** Células T ayudantes (*T helper*)
- **TH:** Hormona tiroidea (*Thyroid Hormone*)
- **Thr:** Treonina (*Threonine*)
- **TIE:** *Tyrosine kinase with Immunoglobulin-like and EGF-like domains*
- **TLR:** Receptor toll like (*Toll Like Receptor*)
- **TNF:** Factor de necrosis tumoral (*Tumor Necrosis Factor*)
- **tMCAO:** Oclusión transitoria de la arteria cerebral media (*transitory Middle Cerebral Artery Occlusion*)
- **TORC1:** Complejo 1 diana de rapamicina (*Target Of Rapamycin Complex 1*)
- **Treg:** Células T reguladoras
- **TSC2:** Tuberina 2 (*Tuberous Sclerosis Complex 2*)
- **UCP-1:** Proteína desacoplante -1 (*Uncoupled Protein -1*)
- **Ulk1:** Kinasa iniciadora de la autofagia en mamíferos codificada por el gen ULK1

- **UPR:** Respuesta a proteínas mal plegadas (*Unfolded Protein Response*)
- **V:** Voltio
- **VCAM:** Molécula de adhesión vascular (*Vascular Adhesion Molecule*)
- **VMH:** Núcleo hipotalámico ventromedial (*Ventromedial Hypothalamic nucleus*)
- **VTA:** Área tegmental ventral (*Ventral Tegmental Area*)
- **WAT:** Tejido adiposo blanco (*White Adipose Tissue*)
- **µg:** Microgramo
- **µl:** Microlitro
- **µm:** Micrómetro





INTRODUCCIÓN

HIPÓTESIS

OBJETIVOS

MATERIALES Y MÉTODOS

RESULTADOS

DISCUSIÓN

CONCLUSIONES





INTRODUCCIÓN

1. Enfermedad cerebrovascular: ictus

1.1. Definición

La Enfermedad Cerebrovascular (ECV) es el conjunto de manifestaciones clínicas del sistema nervioso central derivadas de alteraciones de la circulación cerebral.

Dentro de las enfermedades cerebrovasculares se encuentra el ictus, que la Organización Mundial de la Salud (OMS) define como: “el desarrollo clínico rápido de signos focales de alteración de la función cerebral sin otra causa aparente que no sea el origen vascular”.

El ictus se origina como consecuencia de la alteración del flujo cerebral normal, lo que resulta en la alteración transitoria o permanente de la función de una o más partes del cerebro. Alternativamente se puede definir como todas las alteraciones, por mecanismos isquémicos o hemorrágicos, que afectan a alguna parte del cerebro de manera transitoria o permanente, hasta el punto de inducir alteraciones metabólicas o bioquímicas que conducirían a la muerte cerebral, y consecuentemente, a la alteración del sistema nervioso [1].

1.2. Epidemiología

El ictus es una de las principales causas de mortalidad y morbilidad en todo el mundo. Cada año, alrededor de 15 millones de personas sufren un ictus, y de ellos, 6.7 millones mueren y la mayoría de los supervivientes sufren algún grado de discapacidad [2]. Según la OMS, la incidencia media mundial de la enfermedad cerebrovascular es alrededor de 200 casos nuevos por 100000 habitantes [3]. En Europa existen diferencia entre las poblaciones del norte y del sur, siendo las cifras más altas en países nórdicos como Finlandia (270 por 100000 en hombres), y las menores en los del sur como Italia y Portugal (100 por 100000 en hombres) [4].

En España, el ictus es la primera causa de muerte en mujeres y la tercera en hombres (superado únicamente por las muertes debido a infarto de corazón y cáncer de pulmón) [5]. La incidencia en España es de 167 por 100000 habitantes/año (181 para hombres y 153 para mujeres), siendo mayor en Galicia en relación con el envejecimiento de la población [6].

Teniendo en cuenta que la incidencia aumenta en personas mayores de 65 años y que, en base a una mejoraría en la calidad de vida, se está produciendo un incremento notable en la esperanza de vida y un envejecimiento progresivo de la población mundial, la prevalencia de esta enfermedad aumenta, y con ella, la magnitud del problema sociosanitario que implica. Por ello, el ictus supone un problema de salud que obliga a establecer mejores pautas de prevención y tratamiento para reducir tanto su incidencia como el grado de discapacidad que origina. También hay que señalar que, a pesar de la incidencia incrementada, el número de muertes por

ictus se redujo significativamente en las últimas décadas, principalmente debido a la mejoría en el manejo de pacientes tras la creación de unidades de ictus especializadas, el uso de activador del plasminógeno tisular recombinante (rtPA) como una terapia trombolítica, o a los avances en la trombectomía mecánica [2].

1.3. Clasificación

Atendiendo a la naturaleza de la lesión, el ictus se puede clasificar en dos grupos principales (**Figura 1**): el isquémico, en el que un flujo sanguíneo inadecuado provoca un área circunscrita de infarto cerebral, y el hemorrágico, en el que una extravasación sanguínea en el parénquima cerebral produce lesión y desplazamiento de las estructuras cerebrales [7]. Sin embargo, se pueden usar clasificaciones alternativas de esta enfermedad cerebrovascular teniendo en cuenta otros parámetros como el subtipo de ictus, el perfil de progresión, características de neuroimagen, tamaño y topografía de la lesión, naturaleza, y otros mecanismos de inducción y etiología.

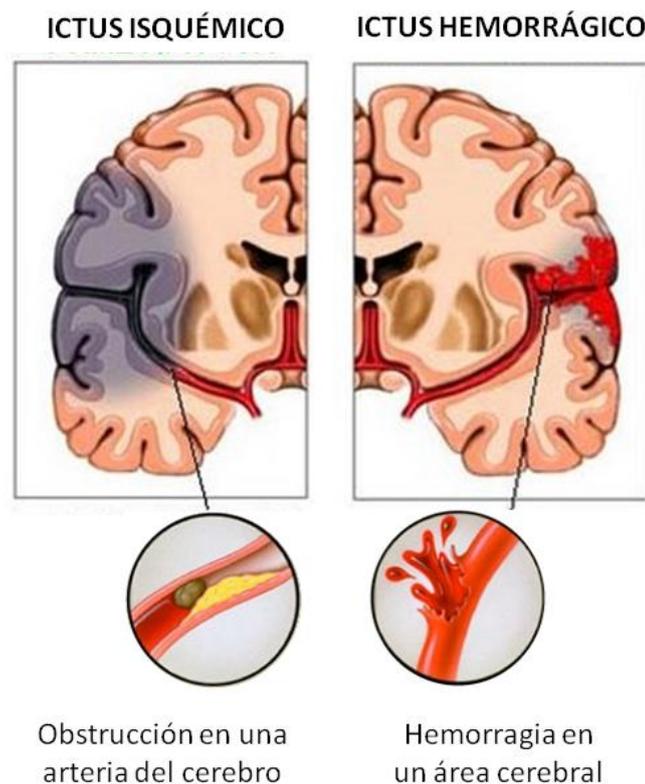


Figura 1. Ictus isquémico e ictus hemorrágico. El ictus isquémico ocurre cuando se obstruye una arteria del cerebro y el ictus hemorrágico cuando hay una hemorragia en un área cerebral. *Creative commons.*

1.3.1. Ictus isquémico

El ictus isquémico es el tipo más común, representando sobre el 80% de los ictus [8]. Se habla de isquemia cerebral focal cuando sólo afecta a una parte del cerebro, y dentro de esta, podemos diferenciar entre ataque isquémico transitorio (AIT) e infarto cerebral. El AIT se define como la disfunción cerebral focal o monocular, con síntomas que duran menos de 1 hora, cuyo origen es la isquemia causada por un trombo o embolia arterial en relación con enfermedad arterial, cardíaca o hematológica [9]. Los pacientes con AIT presentan un alto riesgo de padecer, posteriormente, un ictus (infarto cerebral) u otros episodios vasculares, principalmente coronarios. El infarto cerebral se define como una lesión causada por una isquemia intensa o prolongada, la cual produce la pérdida irreversible de células.

Según su etiología, el ictus isquémico puede clasificarse en base a los criterios TOAST [10] en:

➤ **Infarto aterotrombótico:** (~20%) Presencia de estenosis igual o mayor al 50% del diámetro luminal u oclusión de una arteria extracraneal o intracraneal de gran calibre que suple la región clínicamente afectada, en ausencia de otra etiología.

➤ **Infarto cardioembólico:** (~25%) Presencia de fuente embolígena inequívoca (trombo o tumor intracardiaco, estenosis mitral reumática, prótesis aórtica o mitral, endocarditis, fibrilación auricular, enfermedad del nodo sinusal, aneurisma ventricular izquierdo, infarto agudo de miocardio de menos de 3 meses de evolución, o presencia de hipocinesia cardíaca global o discinesia), en ausencia de otra etiología.

➤ **Infarto lacunar:** (~20%) Infarto de menos de 15 mm de diámetro en el territorio de una arteria perforante cerebral, que suele ocasionar clínicamente un síndrome lacunar (síndrome motor, sensitivo, sensitivo-motor, hemiparesia ataxia, disartria mano torpe), en ausencia de otra etiología.

➤ **Infarto de origen indeterminado:** (~30%) Infarto cerebral en el que, tras un exhaustivo estudio diagnóstico, han sido descartados los subtipos aterotrombótico, cardioembólico, lacunar o inhabitual, o bien coexista más de una posible etiología. En este caso se pueden subdividir en indeterminado estudio incompleto, por más de una etiología o por causa desconocida.

➤ **Otras causas:** (~5%)

1.3.2. Ictus hemorrágico

En medio de todas las enfermedades cerebrovasculares, el grupo patológico de hemorragias se corresponde con el 15% de todos los ictus. Este porcentaje excluye las derivadas de un traumatismo craneoencefálico. En definitiva, consiste en una extravasación de sangre, consecuencia de la ruptura de un vaso sanguíneo, tanto arterial como venoso, por diversos mecanismos [11].

1.4. Factores de riesgo

1.4.3. Factores de riesgo no modificables

- **Edad:** El envejecimiento es uno de los principales factores de riesgo para la enfermedad cerebrovascular. La incidencia del ictus aumenta exponencialmente con la edad, alcanzando sus valores máximos por encima de los 65 años.
- **Sexo:** Se ha visto que los varones tienen mayor incidencia de ictus que las mujeres.
- **Raza:** La ateromatosis de grandes vasos afecta con mayor frecuencia a los individuos de raza caucásica, mientras que la patología de pequeño vaso es más frecuente en africanos y asiáticos.

1.4.4. Factores de riesgo modificables

- **Hipertensión arterial:** Es el principal factor de riesgo para cualquier tipo de ictus, tanto isquémico como hemorrágico. Todos los tipos de hipertensión, tanto sistólica como diastólica o combinada, incrementan el riesgo de ictus a partir de cifras moderadas. Cifras de tensión arterial sistólica en torno a 140-160 mm Hg o diastólica de 90-94 mm Hg incrementan el riesgo de ictus en 1.5 veces.
- **Cardiopatía:** Las enfermedades cardíacas tienen una clara asociación con los ictus, especialmente la fibrilación auricular, las valvulopatías, el infarto de miocardio, la hipertrofia ventricular izquierda y la cardiomegalia.
- **Diabetes mellitus:** Se ha estimado que el riesgo de ictus en pacientes diabéticos aumenta 1.8 veces en varones y en 2.2 veces en mujeres. La diabetes predispone al ictus isquémico debido a su influencia en el desarrollo de aterosclerosis.
- **Hiperlipemia:** La hiperlipemia favorece el desarrollo de la ateromatosis y de la isquemia, tanto coronaria como carotídea.
- **Tabaquismo:** El consumo de cigarrillos predispone a la aparición de aterosclerosis en hombres y mujeres, con un incremento del riesgo de 2-3 veces. El tabaco facilita el espasmo

arterial y el daño endotelial. Se ha visto que este riesgo añadido del tabaco desaparece tras cinco años de abstinencia.

➤ **Otros factores:** El sedentarismo, la obesidad, el ronquido nocturno, el síndrome de apneas del sueño, los anticonceptivos orales y el consumo excesivo de alcohol también se han relacionado con un incremento del riesgo de ictus.

Para ver cuáles son los factores de riesgo que más influyen en la enfermedad cerebrovascular, es importante conocer su prevalencia y su riesgo relativo, ya que un factor con un riesgo relativo elevado puede tener poca relevancia si no es muy frecuente [12]. En la **Tabla 1** se resumen la prevalencia y el riesgo relativo de los principales factores modificables.

Factor de riesgo	Prevalencia (%)	Riesgo relativo
Hipertensión arterial	25 a 40	x 3 a 5
Fibrilación auricular	1 a 2	x 5 a 18
Dislipemia	6 a 40	x 1 a 2
Tabaquismo	20 a 40	x 1,5 a 2,5
Diabetes mellitus	4 a 20	x 1,5 a 3
Alcoholismo	5 a 30	x 1 a 3
Inactividad física	20 a 40	x 2,7

Tabla 1. Prevalencia y riesgo relativo de los factores de riesgo modificables para el ictus.

1.5. Fisiopatología

1.5.1. Descenso del flujo sanguíneo

La isquemia cerebral se origina por la disminución del flujo sanguíneo hasta un nivel capaz de interferir con la función del sistema nervioso. Este proceso es el resultado de una alteración del equilibrio de numerosos factores hemodinámicos, que puede producir una serie de alteraciones metabólicas y bioquímicas en las neuronas y en la glía, que conducirán a la necrosis celular [13].

La obstrucción aguda de una de las grandes arterias del cerebro induce una reducción instantánea del flujo cerebral en la correspondiente área de irrigación (isquemia focal). Pero la reducción del suministro de sangre no es homogénea en el área afectada, y puede cambiar en minutos u horas, especialmente si el suministro de sangre no se recupera. [14] Así, cuando se obstruye un vaso sanguíneo cerebral se produce un gradiente de perfusión sanguínea. La disminución del flujo sanguíneo cerebral (FSC) en una determinada zona de tejido cerebral por

Estudio preclínico de la paradoja de la obesidad en la isquemia cerebral: efecto terapéutico del tratamiento con nicotina

débajo de 10 ml/100 g/min produce una rápida muerte neuronal [15]. Sin embargo, entre este núcleo intensamente isquémico y el parénquima perfundido de forma normal (FSC > 50 ml/100 g/min), existe una zona hipoperfundida, cuya extensión depende del mejor o peor funcionamiento de la circulación colateral [16]. Estudios recientes de tomografía por emisión de positrones (PET) han logrado diferenciar en la zona hipoperfundida dos regiones con pronóstico claramente diferenciado: una ligeramente hipoperfundida (FSC > 22 ml/100 g/min) en la que la transformación en infarto sólo sucede en circunstancias especialmente adversas (zona oligohémica), y otra, denominada de penumbra isquémica [17], con una perfusión cerebral críticamente disminuida (FSC < 22 ml/100 g/min), pero en la que el consumo de oxígeno es todavía suficiente para preservar la supervivencia tisular. Sin embargo, la penumbra isquémica no tiene que estar necesariamente alrededor de una zona de necrosis neuronal, sino que puede constituir por sí misma un territorio cerebral con aporte sanguíneo comprometido, pero con un metabolismo energético preservado [18]. La penumbra isquémica se define entonces como el tejido cerebral en el cual el flujo sanguíneo cerebral ha disminuido hasta el punto de causar silencio electrofisiológico y pérdidas pasajeras pero recurrentes de los gradientes de membrana y metabolitos energéticos [19]. En la penumbra isquémica hay alteración de la actividad funcional de las neuronas, pero se conserva una actividad metabólica mínima que preserva la integridad estructural durante algún tiempo. En esta zona el tejido resulta dañado, se altera el mecanismo de autorregulación, se mantiene parcialmente la reactividad al CO₂, la transmisión sináptica y el contenido de adenosín-5'-trifosfato (ATP) son normales y disminuye el contenido de glucosa. Esto produce la aparición de síntomas neurológicos, pero no de daños irreversibles [13]. Lo importante, y que constituye la base para el tratamiento de la isquemia cerebral, es que las neuronas de la penumbra isquémica sobreviven, y podrán recuperarse cuando se mejoren las condiciones hemodinámicas y se restaure el flujo sanguíneo cerebral que aporte de nuevo la glucosa y el oxígeno necesarios [20]. El impacto de la isquemia cerebral dependerá del nivel de oclusión arterial y de la duración de la reducción del flujo sanguíneo, por lo que el tiempo es un parámetro muy importante en la enfermedad.

1.5.2. Fallo energético

Tras el descenso del flujo sanguíneo, tiene lugar una secuencia de eventos moleculares a corto y largo plazo, iniciada con el fallo energético celular, que constituyen la cascada isquémica (**Figura 2**) [21].

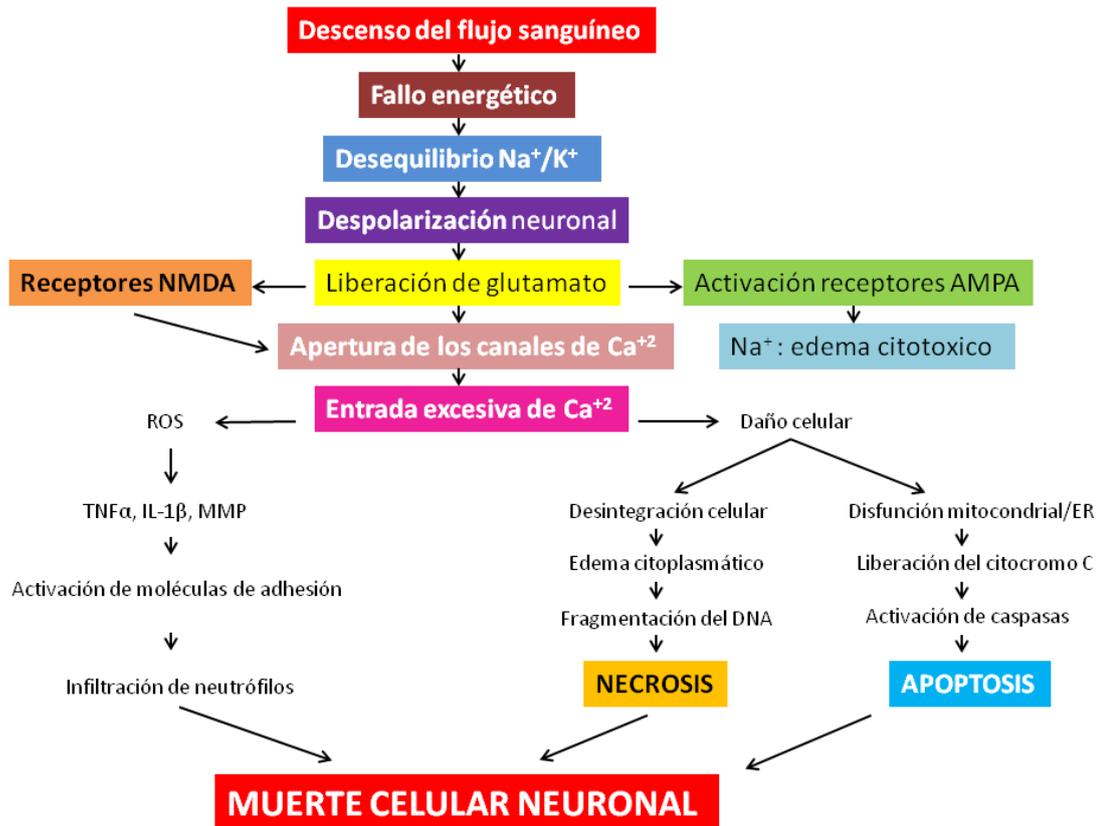


Figura 2. Mecanismos moleculares implicados en la cascada isquémica. El descenso del flujo sanguíneo desencadena un fallo energético que conlleva al desequilibrio Na^+/K^+ despolarizando la membrana, con la consecuente liberación excesiva de glutamato y activación de los receptores de NMDA y AMPA. Esto genera una entrada excesiva de Ca^{+2} que activa la señalización de la muerte celular neuronal.

El sistema nervioso central gasta sobre el 20% del O_2 y el 25% de glucosa circulantes. En condiciones fisiológicas, las neuronas y células gliales obtienen su energía del metabolismo aeróbico de la glucosa, o, bajo ayuno, del metabolismo aeróbico de los cuerpos cetónicos. Aunque en los astrocitos se almacenan pequeñas cantidades de glucógeno, el sistema nervioso central depende totalmente del combustible que proviene de la circulación sistémica para mantener la actividad cerebral normal [22]. Bajo condiciones de isquemia cerebral, con el suministro sanguíneo interrumpido, las células cambian su metabolismo y obtienen energía de forma anaeróbica a partir de la glucosa restante. En el metabolismo aeróbico, la glucosa se metaboliza a piruvato, el cual es descarboxilado por la piruvato deshidrogenasa mitocondrial produciendo Acetil-Coa, que es usado en el ciclo de Krebs para producir intermediarios reducidos (NADH Y FADH_2) que pueden producir grandes cantidades de ATP por fosforilación oxidativa en la membrana interna mitocondrial. Sin embargo, bajo condiciones de pérdida de oxígeno, el piruvato no se convierte a Acetil-Coa, eliminando la consecuente fosforilación oxidativa y forzando la reducción de piruvato a lactato, una reacción que produce pequeñas

cantidades de ATP (2 moléculas de ATP frente a las 38 que se obtienen del metabolismo aeróbico de la glucosa) [23].

1.5.3. Desequilibrio iónico y despolarización de la membrana celular

El descenso en la producción de ATP reduce la actividad de las bombas iónicas y, consecuentemente, limita el mantenimiento de los gradientes eléctricos. El fallo de la bomba sodio-potasio ATPasa, y otras bombas iónicas dependientes de ATP, es el punto clave para entender los mecanismos fisiopatológicos en el ictus [21]. Se produce la acumulación de Na^+ en el citoplasma, causando la despolarización celular e incremento de osmolaridad, lo que facilita la entrada de Cl^- y agua dentro de la célula, por lo que se hincha la misma. [24]. Además, el K^+ sale de la célula, induciendo un incremento repentino de sus niveles extracelulares, originándose una consecuente despolarización neuronal [25]. Este hecho es responsable de la apertura de los canales de Ca^{+2} voltaje-dependientes y el desbloqueo de algunos canales de Ca^{+2} receptor-dependientes, produciendo un incremento de la concentración de Ca^{+2} intracelular de aproximadamente el doble de su valor, que potencia la despolarización de la membrana [15, 16, 26, 27]. Además, se ven afectados otros transportadores celulares como el intercambiador de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{+2}$ (NCX), el cual se bloquea por el incremento de Na^+ citosólico y produce también la acumulación de Ca^{+2} en el citosol. [28]. Estos cambios tempranos en la homeostasis bioquímica y osmótica llevan a la muerte por necrosis.

1.5.4. Excitotoxicidad

El fallo energético y la consecuente despolarización de la membrana neuronal condicionan el aumento de la liberación de cantidades excesivas de neurotransmisores [26, 27].

El glutamato es el neurotransmisor excitatorio más abundante en el cerebro, y bajo condiciones de isquemia se libera en grandes cantidades, sobrepasando los niveles fisiológicos, y pasando a ser tóxico. Esto se debe, en parte, a la inversión de los transportadores de glutamato [29]. Existen 5 transportadores de glutamato, 2 gliales (EAAT1 y EAAT2), y 3 neuronales (EAAT3, EAAT4 y EAAT5). Estos transportadores intercambian Na^+ y H^+ por K^+ , y captan glutamato hacia el interior de la célula, a través de un mecanismo dependiente de energía. Tras la caída de ATP, los transportadores neuronales de glutamato dejan de recaptar, por lo que aumenta la concentración extracelular de glutamato [30]. Este proceso, conocido como excitotoxicidad del glutamato, es el principal responsable de la muerte cerebral temprana tras un ictus (**Figura 3**) [31].

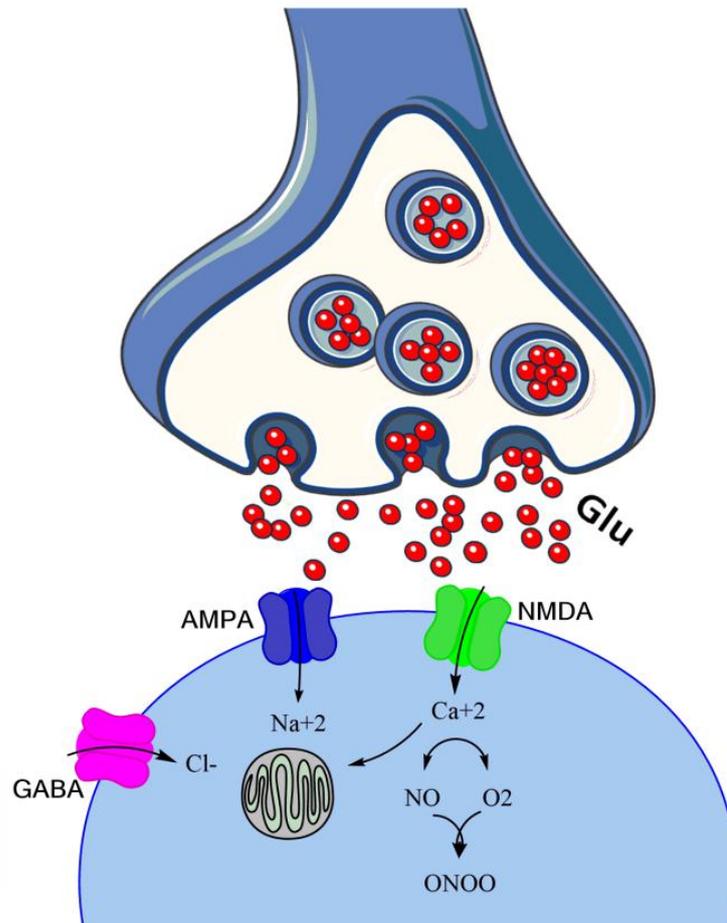


Figura 3. Excitotoxicidad mediada por glutamato en el ictus isquémico. El fallo energético y desequilibrio iónico ocasionados tras la isquemia cerebral, desencadenan una liberación excesiva de glutamato y activación de los receptores de NMDA y AMPA, generando la entrada masiva de Ca^{+2} .

El glutamato activa receptores ionotrópicos (fundamentalmente AMPA; ácido 2-amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazolpropiónico y NMDA; N-metil-D-aspartato) y metabotrópicos. La estimulación del receptor AMPA produce una mayor despolarización de membrana al aumentar la concentración intracelular de Na^{+} , induciendo la liberación de más glutamato, lo que produce edema celular y abre canales no específicos voltaje-dependientes permeables al Ca^{+2} [30]. Los NMDA juegan un papel central en la excitotoxicidad, ya que su estimulación es la principal responsable del aumento de la concentración de Ca^{+2} intracelular, desencadenando la cascada isquémica. Estos receptores, activados por la unión de glutamato y la despolarización, están sobre-estimados en la isquemia permitiendo la entrada de iones Ca^{+2} y Na^{+} dentro de la célula postsináptica. Además, estas condiciones el glutamato difunde más allá del espacio sináptico, uniéndose a los receptores de glutamato extrasinápticos. A pesar de que se conoce poco acerca de este fenómeno, se acepta un papel dual para la señalización de los receptores NMDA dependiendo de su localización: mientras que la activación de los receptores NMDA sinápticos conduce a rutas de señalización que promueven la supervivencia celular, los receptores

Estudio preclínico de la paradoja de la obesidad en la isquemia cerebral: efecto terapéutico del tratamiento con nicotina

extrasinápticos bloquean las mismas y activan las rutas de muerte celular [32]. En condiciones fisiológicas, la activación de estos receptores es esencial para la supervivencia celular, conduciendo a la activación de proteínas de supervivencia celular como la quinasa regulada extracelularmente (ERK) y la proteína de unión a elementos de respuesta a cAMP (CREB), e incrementando la producción del factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF). Los receptores NMDA extrasinápticos parecen estar inactivados en condiciones fisiológicas, pero cuando el glutamato se acumula debido a la alta liberación o baja eliminación, este neurotransmisor difunde más allá del espacio sináptico y los activa. La activación extrasináptica de los receptores NMDA inhibe la producción de CREB Y BDNF, y lleva a la apoptosis vía la fosfatasa homóloga de la tensina (PTEN) y la proteína quinasa 1 asociada a muerte celular (DAPK1) [33].

La entrada masiva de Ca^{+2} debido a la excitotoxicidad es también responsable de la activación de fosfolipasas y proteasas, como las calpaínas, llevando al deterioro celular y a la muerte celular tardía por apoptosis.

1.5.5. Estrés oxidativo

En la isquemia cerebral, la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS) puede exceder la capacidad antioxidante de las neuronas, provocando alteraciones de algunos constituyentes celulares, como proteínas, ácidos nucleicos y lípidos [34] condicionando procesos regulatorios como la actividad enzimática, la metilación del DNA o la peroxidación de lípidos [35]. Las ROS responsables del estrés oxidativo de las neuronas son los radicales libres como el anión superóxido (O_2^-), el radical hidroxilo (OH^\cdot) y el óxido nítrico (NO), y otras especies reactivas que no son radicales libres, pero son sustancias muy tóxicas, como el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el peroxinitrito (ONOO^\cdot).

El O_2^- se genera a través de múltiples vías metabólicas, e inicia la cascada del estrés oxidativo en la isquemia cerebral. La activación del receptor NMDA estimula la fosfolipasa A2, liberando ácido araquidónico, prostaglandinas, leucotrienos y tromboxanos. Durante el metabolismo del ácido araquidónico se forma el O_2^- , que estimula de nuevo la fosfolipasa A2, estableciendo un sistema de retroalimentación positiva. También se puede generar O_2^- por otros mecanismos, como la conversión de la xantina deshidrogenasa en xantina-oxidasa, los neutrófilos infiltrados y las mitocondrias dañadas [34]. En condiciones fisiológicas, la mitocondria produce pequeñas cantidades de ROS como un subproducto de la fosforilación oxidativa. Eses ROS son principalmente producidos como O_2^- que se convierte, en la mitocondria, en H_2O_2 , por la enzima superóxido dismutasa (SOD), para finalmente ser eliminado como H_2O y O_2 en los peroxisomas, por la enzima catalasa, o reducido por la enzima glutatión peroxidasa. En los tejidos sanos, la producción de ROS debe estar equilibrada con

mecanismos antioxidantes, sin embargo, bajo condiciones de isquemia, la mitocondria se vuelve disfuncional y se producen excesivas cantidades de ROS, sobrepasando los mecanismos antioxidantes, aunque algunas de esas enzimas protectoras se sobreexpresen rápidamente [36, 37]. El O_2 se produce en el interior de la neurona, y allí es donde actúa, ya que es incapaz de atravesar la membrana neuronal. Sin embargo, el H_2O_2 difunde fácilmente en la célula donde se origina y en las neuronas situadas en la proximidad [34].

El NO es un gas inorgánico permeable, difusible, con gran capacidad reactiva [38] y se sintetiza a partir del aminoácido L-arginina por medio de la enzima óxido nítrico sintetasa (NOS). En condiciones normales, el NO actúa como mensajero neuronal, pero en situaciones especiales como la isquemia, se origina una elevada producción de NO, que se ha puesto en relación con mecanismos antagónicos de neurotoxicidad y de neuroprotección. La acción diferente del incremento del NO depende del tipo de NOS que actúe. Existen tres isoformas del enzima NOS: la neuronal (nNOS), la endotelial (eNOS) y una forma inmunológicamente inducida (iNOS). El aumento de NO producido por la acción de la nNOS produce una lesión neuronal inmediata, mientras que el producido por la iNOS contribuye al daño neuronal retardado. Sin embargo, la producción de NO mediada por la eNOS actúa como neuroprotector, al inducir la relajación de la fibra muscular lisa y el mantenimiento del flujo sanguíneo cerebral [39]. Como consecuencia de la excitotoxicidad del glutamato se produce un incremento del NO ya que los receptores NMDA sinápticos están funcionalmente unidos a las proteínas de densidad postsináptica de 95 KDa (PSD95), un punto de unión para la nNOS. Por lo tanto, la entrada de Ca^{+2} activa indirectamente la nNOS, incrementando los niveles del NO. Este se combina con O_2 libre produciendo $ONOO^-$, responsable directo de la lisis neuronal al reaccionar con grupos sulfidriilo, proteínas, lípidos y con los ácidos nucleicos [33, 36, 40].

En las fases intermedias de la enfermedad, se producen radicales libres del oxígeno por la infiltración de neutrófilos en el área isquémica, y en estadios tardíos son producidos por la síntesis y activación de la iNOS y la ciclooxigenasa-2 (COX-2) [41, 42].

Aunque el estrés oxidativo es un claro mecanismo de daño celular en la isquemia, también se incrementa con la reperfusión. Durante este proceso, las células dañadas reciben altas dosis de O_2 que satura la cadena respiratoria mitocondrial produciendo reacciones dañadas y grandes cantidades de ROS, siendo uno de los principales responsables del daño por isquemia/reperfusión [36].

1.5.6. Apoptosis

La muerte celular isquémica puede tener lugar de dos maneras, siendo la más común la necrosis [43]. Se origina como consecuencia del fallo energético agudo, se localizada

Estudio preclínico de la paradoja de la obesidad en la isquemia cerebral:
efecto terapéutico del tratamiento con nicotina

principalmente en el núcleo de la lesión, y se caracteriza por cambios morfológicos que acaban en la lisis celular, la cual también conduce a procesos inflamatorios. [44]. Por otro lado, las células que no mueren por necrosis, pero están sometidas al estrés isquémico, mueren eventualmente por un proceso más organizado conocido como muerte celular programada o apoptosis. Esta es característica de la zona de penumbra, y puede ser observada cuando se activan los mecanismos intracelulares dependientes de energía, llevando a la degradación celular [41,45].

La apoptosis se lleva a cabo por dos vías principales (**Figura 4**), la extrínseca y la intrínseca, dependiendo del origen de las señales de muerte. En ambos casos, la muerte celular puede ser mediada de manera dependiente o independiente de caspasas.

La vía extrínseca de la apoptosis se inicia por señales extracelulares de daño que se unen a receptores de muerte localizados en la membrana celular. Estos receptores pertenecen a la familia del receptor del factor de necrosis tumoral (TNF), y experimenta la multimerización y unión a proteínas adaptadoras para formar el complejo señalizador de muerte inducida (DISC), responsable de la activación de la caspasa 8. Esta activa a las caspasas ejecutoras 3 y 7 que se adhieren a proteínas estructurales y enzimas produciendo la muerte celular [46].

La isquemia también induce la vía intrínseca de la apoptosis. Esta vía está iniciada por señales intracelulares de daño, como la pérdida de ATP, la presencia de ROS o las altas concentraciones de Ca^{+2} , que inducen la disfunción mitocondrial [46, 47, 48] desencadenando la liberación del citocromo C, caspasas, y del factor inductor de apoptosis (AIF), que actúan como iniciadores de la muerte neuronal apoptótica [49]. La acumulación de Ca^{+2} en el citosol induce la activación de calpaínas (proteasas), que se adhieren a Bcl-2, miembro proapoptótico de la familia BID. Bcl-2 interactúa con otras proteínas proapoptóticas como BAD y BAX, causando la formación de mPTP, a través del cual el citocromo C y el AIF son liberados al citosol. Una vez ahí, el citocromo C se une a Apaf-1 (factor 1 activador de proteasas de apoptosis) y la procaspasa 9 para formar un apoptosoma y activar la caspasa 9 que finalmente activa la caspasa 3, la cual, de forma similar a la vía extrínseca, se adhiere a diferentes proteínas estructurales y enzimas. En paralelo al proceso de activación de las caspasas, AIF se transloca al núcleo y media la fragmentación de DNA [50].

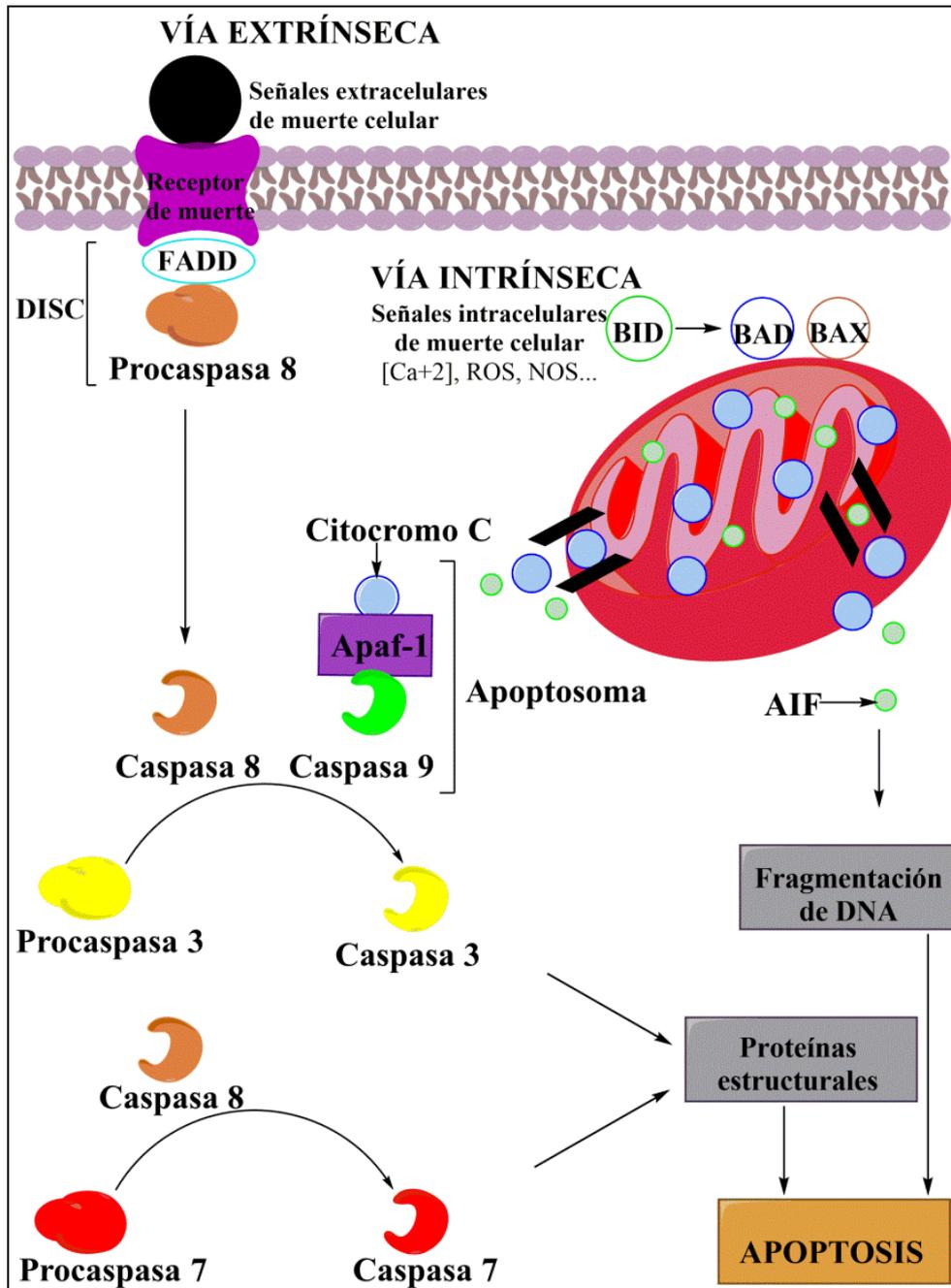


Figura 4. Ruta apoptótica en la isquemia cerebral. Vías de activación intrínseca y extrínseca.

1.5.7. Inflamación

La inflamación juega un papel decisivo en la evolución del daño isquémico. Es probablemente el componente más complejo del proceso patológico, envolviendo múltiples mecanismos a diferentes tiempos tras el ictus (Figura 5). La complejidad del sistema es debido a su habilidad dual para alarmar la presencia de daño (por medio de señales pro-inflamatorias),

Estudio preclínico de la paradoja de la obesidad en la isquemia cerebral:
efecto terapéutico del tratamiento con nicotina

o por otro lado, limitar o incluso reparar el daño expresando un fenotipo antiinflamatorio. El desequilibrio entre ambos perfiles determinará el empeoramiento o mejora de la lesión.

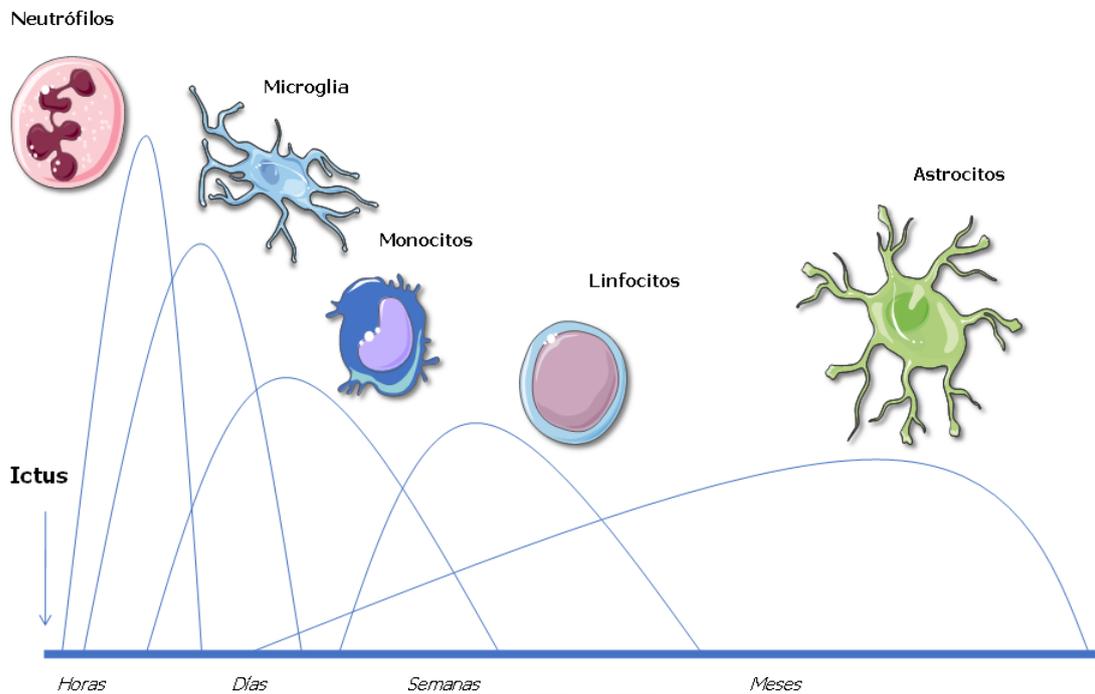


Figura 5. Evolución de la inflamación tras un ictus isquémico; activación de diferentes tipos celulares a lo largo del tiempo.

Tras la isquemia cerebral, la inflamación temprana comienza con la activación de la microglía y la infiltración de macrófagos y neutrófilos a través de la barrera hematoencefálica (BBB) dañada. Esto comienza minutos después de la oclusión del vaso, pero tiene un pico a los 2-3 días [51]. La activación es mediada por moléculas secretadas por estrés y neuronas que se están muriendo. Estas moléculas que son normalmente intracelulares (y por lo tanto no están expuestas para su reconocimiento) trabajan como patrones moleculares asociados al daño (DAMPs) activando receptores microgliales, como, por ejemplo, receptores *toll like* (TLRs).

Una vez activadas, las células microgliales y los macrófagos sufren cambios morfológicos y funcionales. Mientras en condiciones de reposo las células microgliales funcionan como centinelas del SNC, tras su activación, adquieren morfología ameboidea [52]. El fenotipo funcional de la microglía y macrófagos activados puede ser M1 (pro-inflamatorio o destructivo) o M2 (antiinflamatorio y neuroprotector). En la fase aguda el microambiente dañado desequilibra enormemente el fenotipo funcional de la microglía y macrófagos promoviendo el fenotipo M1. La microglía y macrófagos M1 activados liberan moléculas de señalización pro-inflamatoria como el factor de necrosis tumoral α (TNF α), interleuquinas 1, 6, 12 o 23 (IL-1, IL-2, IL-6, IL-12, IL-23) o NO. Estas citoquinas, entre otros procesos, también inducen el reclutamiento de células de la inmunidad circulantes, que juegan un papel crítico en los

procesos inflamatorios tardíos. Por otro lado, la microglía y macrófagos M2 expresan moléculas antiinflamatorias como la interleuquina 10, CD206 o arginasa 1. A pesar de que la transición de la microglía y macrófagos desde el fenotipo M1 al M2 podría ser una importante diana terapéutica, este proceso aún está muy poco comprendido. Estudios recientes revelan que la ratio M1:M2 es mayor en el SNC de varones de avanzada edad, pero los mecanismos precisos aún son desconocidos [53].

Otras células inflamatorias que juegan un papel central en la inflamación temprana son los neutrófilos. Estos atraviesan la BBB durante las primeras horas tras el ictus, pero su pico está entre 1-3 días, luego desaparecen [51]. La infiltración de neutrófilos está mediada por la expresión de moléculas de adhesión específicas en el endotelio de células sometidas a estrés, como son la selectina endotelial (E-selectina), la molécula de adhesión intracelular (ICAM) -1 y -2, la molécula de adhesión vascular-1 (VCAM-1) y la molécula de adhesión plaquetoesotelial-1 (PECAM-1). Estos antígenos son detectados por receptores específicos en la superficie de neutrófilos y monocitos [54]. Una vez infiltradas, las células liberan ROS y NOS, ya que expresan la iNOS. Además, igual que la microglía y los macrófagos, los neutrófilos liberan citoquinas pro-inflamatorias como el $TNF\alpha$, IL-6, IL-8, incrementando el reclutamiento de neutrófilos y leucocitos. También son liberadas las quimioquinas con ligando tipo C-C 2 y 3 (CCL2 y CCL3), señalizando el reclutamiento de linfocitos T, monocitos y células dendríticas. Finalmente, los neutrófilos secretan grandes cantidades de proteasas que dañan la lámina vascular basal incrementando la permeabilidad de la BBB [55]. Se ha visto que algunas metaloproteasas de matriz (MMPs) intervienen en la lesión tisular tras la isquemia. Los leucocitos que se acumulan y se adhieren por la acción de las citoquinas en la isquemia cerebral utilizan la producción de MMPs para migrar a través del endotelio, desestructurar la barrera hematoencefálica y contribuir a la producción del edema [56].

Mientras que en las primeras horas y días tras el ictus predomina la inmunidad innata, la inmunidad adaptativa se desarrolla a lo largo de los siguientes días hasta la primera semana tras la isquemia. Los linfocitos T o células T, juegan un papel central en este proceso desde que reciben señales pro-inflamatorias liberadas por la microglía y los macrófagos, originando una respuesta compleja e ininterrumpida. Las células T se clasifican en T helper (Th) o células T citotóxicas (Tc), que expresan CD4 o CD8 en su superficie, respectivamente. Las células Th se clasifican por el perfil de liberación de citoquinas. Los subtipos mejor conocidos son las Th1, Th2 y las células T reguladoras (Treg). Las células Th1 liberan citoquinas pro-inflamatorias como el interferón gamma ($INF\gamma$). Por otro lado, las Th2 liberan moléculas antiinflamatorias, IL-4 e IL-10, entre otras. Las células Treg son inmunosupresoras, y juegan un papel importante limitando el daño cerebral después del ictus [gu el al de alba]. Las células Tc son responsables de retirar lo dañado o inducir apoptosis en las células diana. Estas células liberan perforina,

Estudio preclínico de la paradoja de la obesidad en la isquemia cerebral:
efecto terapéutico del tratamiento con nicotina

granzimas y granulisina (envueltas en la formación de poros de membrana e inducción de apoptosis). La inmunidad adaptativa tiene también consecuencias sistémicas, produciendo linfopenia (haciendo que los pacientes se vuelvan más vulnerables a infecciones), y respuesta autoinmune contra antígenos del SNC (incrementando el daño secundario al SNC) [57]. El desequilibrio entre células pro-inflamatorias y antiinflamatorias determinará nuevamente la progresión de la lesión.

1.5.8. Mecanismos de regeneración

Como consecuencia del daño isquémico, el microambiente de la zona de la lesión puede afectar al estado del tejido colindante. Por eso, para impedir su expansión, algunas células rodean el tejido dañado para formar una cicatriz. Tras la isquemia, durante la fase aguda, se forma la cicatriz glial, formada por astrocitos, microglía y células gliales precursoras [58], que sirven como barrera fisiológica. Los astrocitos activados o reactivos incrementan su habilidad para eliminar neurotransmisores, ROS, o dan soporte metabólico a las neuronas dañadas con pequeñas cantidades de glicógeno almacenado en su citoplasma [22]. En etapas más tardías, la microglía tiende a desaparecer y la cicatriz se invade de fibroblastos, que proliferan y secretan grandes cantidades de moléculas de la matriz extracelular, formando la cicatriz fibrótica. Esta actúa como una barrera física limitando la entrada de nuevos axones al área dañada, lo que puede ser muy importante para entender los procesos neuroregenerativos en el SNC de mamíferos [59].

Tras un daño isquémico, los procesos de reparación del tejido cerebral se estimulan lentamente, aunque en los primeros días se ven camuflados por el ambiente pro-inflamatorio. Pero, cuando las células necróticas son eliminadas y la inflamación se estabiliza, los procesos proliferativos como son la angiogénesis, neurogénesis y neuroplasticidad, adquieren una posición central. [60, 61, 53].

1.6. Enfoques terapéuticos para el tratamiento del ictus isquémico

Uno de los mecanismos que conduce a la progresión del ictus es la transformación de la penumbra isquémica en una zona de lesión irreversible (**Figura 6**).

En la zona de la penumbra isquémica se produce una mayor demanda de energía debido a que aumentan las necesidades metabólicas al producirse ondas de despolarización recurrentes. Estas mayores necesidades de aporte de nutrientes no pueden ser cubiertas debido a una disminución del flujo sanguíneo cerebral, por lo que el umbral de perfusión se hace cada vez más crítico, y zonas de penumbra se incorporan progresivamente al parénquima cerebral no viable [18]. Si no se reestablece el flujo sanguíneo, o si no se aplica ninguna estrategia

protectora en las primeras horas durante la evolución de la isquemia, las células localizadas en esta área sufrirán muerte celular. Así, los enfoques terapéuticos se deberían centrar en esta área, ya que al contrario que el núcleo de la lesión, la penumbra contiene tejido potencialmente salvable.

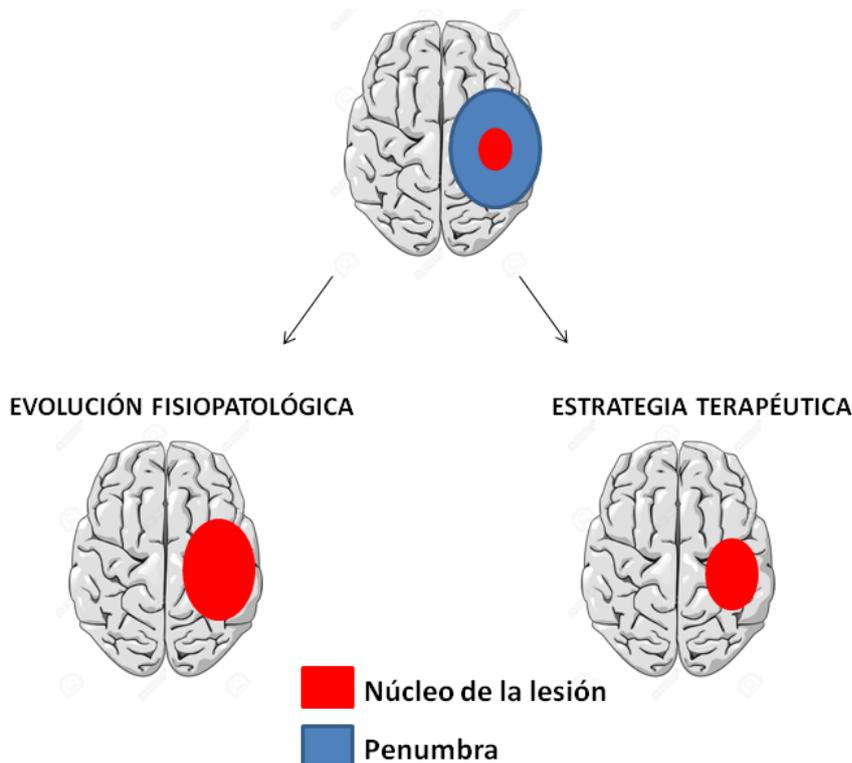


Figura 6. Progresión de la penumbra isquémica a tejido necrótico. Con una estrategia terapéutica que actúe sobre la penumbra isquémica, el núcleo de la lesión (tejido necrótico) acabará siendo menor que bajo la evolución fisiopatológica.

1.6.1. Marcadores de progresión del ictus isquémico

En la práctica clínica, hay ciertas variables modificables que tienen influencia en la evolución de la lesión, y, por tanto, en el pronóstico de los pacientes.

La estabilización del flujo sanguíneo cerebral es una de las variables más importantes en la progresión del ictus isquémico. Los pacientes de dicha patología suelen desarrollar hipertensión en la fase aguda, lo que incrementa el riesgo de transformación hemorrágica. Por otro lado, se ha relacionado la hipotensión con un mal pronóstico, seguramente debido a la hipoperfusión del tejido [62]. Además, independientemente de si ha habido reperusión o no, el flujo sanguíneo cerebral debería de ser estabilizado, impidiendo la formación de nuevos trombos. Para combatir esto, en la práctica clínica se usan agentes antiagregantes y anticoagulantes. El antiagregante más usado es el ácido acetilsalicílico, un inhibidor irreversible de la ciclooxigenasa-1 (COX-1)

Estudio preclínico de la paradoja de la obesidad en la isquemia cerebral: efecto terapéutico del tratamiento con nicotina

que reduce la síntesis de prostaglandina y tromboxano, indispensables para la agregación plaquetaria. Además, ante el riesgo tromboembólico, se suele tratar a los pacientes isquémicos con el anticoagulante heparina [63].

Con niveles de flujo sanguíneo cerebral inferiores a 22 ml/100 g/min se produce la liberación de grandes cantidades de glutamato y de otros aminoácidos neuroexcitadores, capaces de inducir ondas de despolarización recurrentes en la zona de penumbra isquémica [18]. El predictor más potente de progresión de infarto cerebral es el glutamato. Niveles plasmáticos de glutamato por encima de 200 $\mu\text{M/L}$ en las primeras 24 horas desde el inicio de la sintomatología predicen el deterioro neurológico con una probabilidad del 92%. También se han asociado niveles elevados de glicina con el aumento de la frecuencia de deterioro neurológico precoz [64]. La disminución de la concentración del GABA en plasma también es un predictor importante de deterioro neurológico en las primeras 48 horas en los infartos lacunares, sobre todos los localizados en los núcleos de la base [65].

Pero para la progresión de la isquemia cerebral son necesarios otros mecanismos secundarios. Se ha demostrado una relación entre el aumento de los depósitos de hierro (como fuente de radicales libres) y el deterioro neurológico [66]. También se ha visto que el NO es un factor importante en la progresión de la zona de penumbra isquémica, especialmente en las zonas más periféricas, donde la presencia de oxígeno facilita la producción de peroxinitrilo [67].

Los mecanismos inflamatorios también desempeñan un papel fundamental en la progresión del infarto, y concentraciones plasmáticas elevadas de IL-6 son un potente predictor de deterioro neurológico precoz [68].

La hiperglucemia, la hipertermia, la cefalea y las crisis comiciales en las primeras horas del ictus se han relacionado con el infarto cerebral progresivo. Los niveles plasmáticos de glucosa elevados durante la fase aguda del ictus isquémico aumentan la concentración de ácido láctico. Se ha visto que el efecto de la hipertermia sobre la progresión del infarto es dependiente de la neurotoxicidad del glutamato [69], y posiblemente de la IL-6 y del TNF- α . La cefalea al inicio del ictus isquémico está mediada por el glutamato, por el NO y por la IL-6 [70]. Las crisis convulsivas al inicio del ictus aparecen en los infartos corticales, y se relacionan con un empeoramiento neurológico como resultado del aumento de concentración de glutamato extracelular liberado en esta zona [71].

También existen marcadores de neuroimagen del infarto cerebral progresivo. La presencia de hipodensidad precoz en la tomografía axial computarizada (TAC) o de hiperseñal en la resonancia magnética de difusión (RM-DWI) se relaciona con la progresión del infarto cerebral. Este hecho se debe a la presencia de edema citotóxico relacionado con el glutamato [72] o de edema vasogénico relacionado con el aumento de la permeabilidad vascular originado por el NO y por los mecanismos de inflamación [67, 68, 73, 74].

1.6.2. Restauración del flujo sanguíneo

La terapia trombolítica consiste en la administración intravascular de agentes capaces de disolver el trombo *in situ* [75]. La trombolisis farmacológica o mecánica (trombectomía) son las estrategias clínicas que aportan más beneficios a los pacientes de ictus isquémico, en términos de recuperación neurológica.

➤ Trombolisis farmacológica

El agente trombolítico más común es el rt-PA, un enzima relacionado con la degradación del trombo en el vaso ocluido [76, 77]. El activador del plasminógeno tisular (tPA) es una serin proteasa que se secreta por las células endoteliales, entre otras. Es capaz de romper el zimógeno del plasminógeno en una proteasa activa, la plasmina, la cual rompe las fibras de fibrina que mantienen las plaquetas unidas al trombo sanguíneo [75]. Así, se ha generado la versión recombinante del tPA (rtPA), que aunque tiene modificaciones de la secuencia original para mejorar sus propiedades farmacológicas, mantiene propiedades indeseables como el incremento de la permeabilidad de la BBB, incrementando así el riesgo de transformación hemorrágica [75]. Su administración suele ser intravenosa, pero también se puede llevar a cabo la administración intraarterial, una forma más específica de concentrar el agente terapéutico cerca del trombo, reduciendo la cantidad del mismo para la recanalización, lo que reduce su cantidad circulante y los efectos adversos ligados [63]. Sin embargo, esta administración es más invasiva y su alta concentración en la región del trombo podría incrementar los efectos neurotóxicos.

El rtPA es el único tratamiento aprobado por la FDA (agencia estadounidense que regula la administración de fármacos y alimentos) para tratar el ictus isquémico agudo [78], sin embargo, sólo el 3-7% de los pacientes son tratados con este fármaco en la mayoría de los países. Esto podría ser debido a diferentes factores, incluyendo la pequeña ventana terapéutica y el alto riesgo de transformación hemorrágica. Se requieren nuevas estrategias neuroprotectoras para trabajar en ambos aspectos, abriendo la ventana terapéutica y reduciendo los factores de riesgo asociados. [76, 77]. La ventana terapéutica para el tratamiento trombolítico intravenoso es de 4,5 h y su extensión puede ser posible seleccionando, por técnicas de neuroimagen, pacientes con una gran área de penumbra (el área del cerebro susceptible de daño está, al mismo tiempo, protegida en las primeras 24-48 h) [79].

➤ Trombectomía mecánica

La trombectomía es una técnica que permite la extracción de un trombo del lumen vascular por un mecanismo mecánico, implicando el uso de un catéter intravascular semi-invasivo (generalmente introducido desde la arteria femoral) para llegar al vaso ocluido y coger el

Estudio preclínico de la paradoja de la obesidad en la isquemia cerebral: efecto terapéutico del tratamiento con nicotina

trombo. Se aplica a los pacientes que reciben rtPA y no responden, o a los pacientes que están en la ventana terapéutica del rtPA pero no son aptos para el tratamiento fibrinolítico debido a la existencia de coagulopatías o una cirugía mayor reciente. Aunque tiene altas tasas de recanalización y una ventana terapéutica mayor que el rtPA, su uso implica dificultad técnica, sedación, y riesgo de trauma vascular debido a la ruptura del vaso o al vasoespasmos. Además, puede causar la fragmentación del trombo provocando la embolización en tejido previamente no afectado. Debido a estas limitaciones, el uso de la trombectomía endovascular está generalmente restringida a centros especializados [78].

1.6.3. Neuroprotección

El término neuroprotección engloba diferentes estrategias que reducen el área muerta tras un evento isquémico sin afectar a la reperusión del tejido. Se han propuesto algunos compuestos para bloquear la vía de señalización que lleva a la muerte celular inducida por la isquemia, en diferentes etapas de la cascada isquémica. La mayoría de los compuestos han mostrado efectos positivos en los estudios experimentales, pero desafortunadamente ninguno de ellos ha mostrado efectos beneficiosos en los ensayos clínicos [80]. Esto puede ser en parte por el rápido desarrollo de los eventos de la cascada isquémica, lo que reduce la ventana terapéutica. A pesar de esto, el gran potencial terapéutico de la neuroprotección hace que sea un campo activo en la investigación [81]. Los fármacos neuroprotectores se pueden clasificar en diferentes grupos en función de su mecanismo de acción.

➤ Bloqueantes del calcio

El Ca^{+2} juega un papel importante en la fisiopatología del ictus isquémico. El bloqueo de los canales de calcio paraliza la entrada de calcio, reduciendo la muerte celular. La Nimodipina es un ejemplo de esta familia de compuestos. Se han publicado más de 250 estudios con animales sobre la Nimodipina en isquemia cerebral, pero solo 10 de ellos hablan de un resultado positivo [80]. Ninguno de los miembros de esta familia de componentes ha demostrado una actividad neuroprotectora clara en estudios clínicos. Una de las explicaciones puede ser que, en estos estudios, los animales son tratados generalmente en los primeros 15 minutos tras la isquemia, algo que no es trasladable a la práctica clínica. Como alternativa a moléculas complejas que bloqueen estos canales, se ha comprobado que el Mg^{+2} , un competidor del Ca^{+2} , interfiere con los canales de Ca^{+2} reduciendo su liberación incontrolada y bloqueando los canales NMDA, entre otros procesos. Hasta ahora, el efecto del Mg^{+2} muestra resultados promotores, y debe ser comprobado en estudios clínicos [82].

➤ Homeostasis de los neurotransmisores

Está bien establecido que el glutamato, el principal neurotransmisor excitatorio del SNC, es también culpable de inducir el daño excitatorio neuronal en la isquemia cerebral y otros desordenes. El glutamato y otros aminoácidos excitatorios relacionados interactúan con diferentes clases de receptores, los cuales son relevantes para la neuroprotección. Estos incluyen los receptores NMDA y AMPA.

Los antagonistas de los receptores NMDA reducen el tamaño de infarto y el déficit motor y sensorial en modelos animales de isquemia cerebral focal, pero su uso clínico ha presentado muchos efectos secundarios, especialmente efectos cardiovasculares y psiquiátricos. Por ejemplo, Selfotel, un antagonista competitivo de los receptores NMDA, ha demostrado mejorar el resultado en la fase III de estudio, pero una alta incidencia de efectos psiquiátricos adversos condicionó su retirada de las fases clínicas. De la misma manera, el Dextromethorphan y sus metabolitos destrorphan y aptiganel fueron interrumpidos por una relación no favorable entre el riesgo y el beneficio y por el incremento de los efectos adversos. El Eliprodil reduce la acción del glutamato por interferir con el sitio poliamina en el receptor NMDA, pero no mostró diferencias con el placebo. El Gavestinel, antagonista de la glicina del receptor NMDA, mostró una tolerancia excelente, pero sin eficacia [83].

Por otro lado, varios antagonistas de AMPA mostraron eficacia neuroprotectora en estudios preclínicos de isquemia focal y global, pero no tuvieron éxito en los largos estudios clínicos.

Otra opción para reducir el glutamato cerebral son los inhibidores de la liberación de glutamato, que trabajan bloqueando los canales presinápticos, previniendo la despolarización y liberación de glutamato. Un ejemplo de este tipo de fármacos es el Lubezol, un compuesto culpable de la desregulación de la vía de señalización de la óxido nítrico sintasa inducida por glutamato. Este compuesto ha mostrado neuroprotección en el hipocampo frente a la toxicidad del óxido nítrico. En estudios experimentales se ha visto una reducción del volumen de infarto del 50% tras la inyección del fármaco 3 horas después de la isquemia. Sin embargo, no se realizó ningún ensayo clínico con resultados positivos, y uno de ellos fue cancelado debido al incremento de mortalidad en el grupo tratado [84].

Ante la poca traslación de los resultados con antagonistas de receptores de glutamato e inhibidores de su liberación, una alternativa puede ser la reducción del glutamato cerebral usando un sistema para atraparlo. Este método está basado en la reducción del glutamato sanguíneo forzando su transporte, a través de la BBB, desde el cerebro a la sangre, en favor del gradiente de concentración, mostrando esperanzadores resultados terapéuticos en modelos preclínicos de isquemia cerebral [85].

Estudio preclínico de la paradoja de la obesidad en la isquemia cerebral: efecto terapéutico del tratamiento con nicotina

En el balance del glutamato también interviene GABA, el principal inhibidor de neurotransmisores del cerebro. También se estudiaron agonistas de GABA, como el Diazepam, obteniendo resultados negativos [81].

➤ **Vías de señalización de muerte celular**

También se ha estudiado el potencial neuroprotector de anestésicos y medicaciones anticonvulsivas como el Pentobarbital, Sevoflurano, Isoflurano o ketamina, revelando su habilidad para potenciar las vías de señalización pro-supervivencia que producen resultados positivos en animales. Sin embargo, la translación a la clínica fue fallida [86].

➤ **Antioxidantes**

El estrés oxidativo es otro mecanismo implicado en la muerte cerebral tras un evento isquémico. Los antioxidantes pueden jugar, por tanto, un papel importante como fármacos neuroprotectores. El antioxidante con más éxito ha sido NXY-059. Este fármaco reduce el infarto cerebral un 66% en modelos animales, cuando se inyecta incluso 5 horas después de la oclusión. El primer estudio clínico obtuvo resultados positivos, mejorando el resultado funcional de los pacientes. Sin embargo, un segundo estudio clínico mostró resultados negativos [87].

Otro antioxidante que alcanzó la fase clínica fue el ácido úrico, un antioxidante con efectos neuroprotectores en modelos animales de isquemia cerebral. Un estudio clínico reciente ha evaluado si la terapia con ácido úrico podría mejorar los resultados funcionales, a los 90 días, en pacientes con ictus isquémico agudo. Los resultados mostraron que el tratamiento con ácido úrico es seguro, pero no incrementa la proporción de pacientes que muestren resultados excelentes tras el ictus, en comparación con el placebo [88].

➤ **Antiinflamatorios**

Los compuestos antiinflamatorios actúan inhibiendo alguno de los mecanismos de la extensa cascada inflamatoria de la isquemia cerebral. El Enlinomab, un anticuerpo monoclonal contra ICAM-1, que inhibe la adhesión leucocitaria y la migración a través del endotelio vascular, es capaz de reducir el tamaño de infarto en modelos animales de isquemia cerebral focal transitoria; sin embargo, en fase III, el resultado ha sido negativo con un alto número de complicaciones. El UK-279.276, una proteína recombinante inhibidora del receptor CD11b/CD18, muestra una baja eficacia en estudios clínicos [80].

➤ Otros

La Citicolina o CDP-colina es un precursor de la síntesis de fosfato-colina, la cual se integra en la membrana de neuronas. Se ha demostrado que inhibe los niveles de norepinefrina y dopamina en el SNC, y restaura la actividad de la ATPasa mitocondrial [89]. En modelos animales, la Citicolina reduce la activación de la fofolipasa 2 tras la isquemia cerebral, reduciendo la formación del ácido araquidónico y la producción de radicales libres; por tanto, reduciendo el estrés oxidativo. Otros efectos de este fármaco son su capacidad de reducir la excitotoxicidad o de estimulación de la plasticidad cerebral [90]. En estudios preclínicos, el tratamiento con Citicolina inmediatamente después de la reperfusión, mejora el déficit funcional a los 28 días [91]. Un análisis publicado en 2002 mostró un incremento del 33% en la recuperación completa después de un ictus moderado o grave, cuando el tratamiento se empezó entre las primeras 24 horas y se mantuvo durante 6 semanas [92]. Sin embargo, un estudio clínico reciente ha demostrado que pierde la protección en pacientes de ictus [93]. Se han desarrollado algunos estudios usando otros agentes neuroprotectores como activadores de los canales de potasio neuronales (BMS-204354), modificadores de la fluidez de membrana (Piracetam), antagonistas de opioides (Namafeno), factores de crecimiento empleados como reguladores del calcio intracelular, y muchos otros. Ninguno de ellos ha demostrado eficacia definitiva de neuroprotección farmacológica [81].

1.6.4. Neuroreparación

Las estrategias de neuroreparación implican la restauración de la función cerebral, tanto por la regeneración del tejido cerebral dañado (neuroregeneración), como por el establecimiento de vías de señalización neuronales o sinapsis alternativas (plasticidad cerebral). Además, la ventana terapéutica para estas terapias es más grande que para el enfoque trombolítico o neuroprotector. El objetivo de los tratamientos para la recuperación neurológica tras un ictus no está restringido a las neuronas; está más centrado en la unidad neurovascular, incluyendo procedimientos que potencien la sinaptogénesis y la angiogénesis. Así, los tratamientos neuroreparadores pueden usar células madre, pro-neurogénicos, pro-angiogénicos y/o pro-sinaptogénicos, entre otros.

➤ Neurogénesis

En el cerebro adulto hay nichos para la producción de células madre [94], localizados en la región subventricular de los ventrículos laterales (SVZ) y el giro dentado del hipocampo. Bajo condiciones fisiológicas normales, los neuroblastos producidos en el SVZ migran al bulbo olfatorio para diferenciarse en nuevas neuronas. Tras la inducción de la isquemia cerebral focal

Estudio preclínico de la paradoja de la obesidad en la isquemia cerebral: efecto terapéutico del tratamiento con nicotina

en rata, se desarrolla un incremento de la formación de neuroblastos en el hemisferio ipsilateral, y estos neuroblastos migran a regiones que rodean la lesión [95]. Este efecto ha sido también visto en humanos [96]. El potenciamiento de los mecanismos de neurorreparación endógenos es uno de los principales objetivos en las terapias para el tratamiento del ictus.

Aunque se introduzcan células madre neonatales tras un evento isquémico, la mayoría de ellas no se integran en los circuitos neuronales. Se han usado muchas estrategias para potenciar la neurogénesis endógena. Así, estarían disponibles un gran número de neuronas recién diferenciadas, incrementando las posibilidades de supervivencia e integración en las redes neuronales, mejorando así la recuperación funcional. Como ejemplo para conseguir este objetivo, se ha usado tanto terapia celular como farmacológica que active la vía de la fosfatidilinositol-3-kinasa (PI3K-Akt), vía implicada en la supervivencia celular, proliferación, diferenciación y migración [97].

➤ **Angiogénesis**

El desarrollo del sistema vascular cerebral ocurre principalmente debido a procesos angiogénicos. Durante la vida adulta, la proliferación de células endoteliales se termina bajo condiciones fisiológicas. Sin embargo, tras un evento isquémico los capilares cerebrales que rodean la lesión proliferan, y se forman nuevos vasos entre los 2 y los 28 días tras un ictus [98-101]. El proceso angiogénico involucra un procedimiento con múltiples pasos que comprende la proliferación y migración de células endoteliales, la formación de tubulos, la ramificación y la anastomosis. El factor de crecimiento endotelial (VEGF) y su receptor (VEGFR2) inician el proceso angiogénico, mientras la angiopietina 1 y 2 y su receptor (TIE-2) son responsable de la maduración, estabilización y remodelado vascular [102]. La expresión de VEGF-1 y VEGF-2 promueve la ramificación vascular, y los vasos formados de nuevo son altamente permeables. Mientras tanto, la expresión de angiopietinas y TIE-2 estimula la maduración de los vasos, llevando a la formación de vasos cerebrales funcionales por completo.

El proceso angiogénico es esencial para la recuperación tras la isquemia cerebral y el tratamiento con VEGF o las terapias centradas en la producción de VEGF-1, VEGF-2, angiopietina o la expresión de TIE-2 podrían incrementar la angiogénesis en la región peri-ictus. En estudios experimentales se han usado tanto terapia celular como farmacológica para incrementar la angiogénesis, promoviendo la recuperación funcional de los animales isquémicos [103].

➤ **Neurogénesis y angiogénesis**

La neurogénesis y angiogénesis tras la isquemia no son procesos separados. La neurogénesis en la región peri-ictus no puede ocurrir sin angiogénesis, ya que es responsable

de la restauración del suministro de oxígeno y nutrientes. Además, las células endoteliales producen factores de crecimiento que permiten la supervivencia neuronal, y que regulan la actividad metabólica de precursores neuronales. Las células endoteliales secretan el factor derivado de células estromales-1 (SDF-1), VEGF y metaloproteasas de matriz (MMPs) que inducen y facilitan la migración de células progenitoras neuronales al lugar dañado. Por otro lado, las células progenitoras neuronales sobre-expresan angiopietina 2 y VEGFr2 llevando al incremento de la angiogénesis [104].

Algunos estudios *in vitro* e *in vivo* han demostrado una relación entre angiogénesis y neurogénesis [104, 105]. En modelos animales de isquemia, los inhibidores de TIE-2 no solo reducen la angiogénesis, también la migración de neuroblastos al área peri-infarto. Por otro lado, las células progenitoras neuronales injertadas en la región de infarto han demostrado la inducción de angiogénesis. Estos y otros estudios han reflejado que la neurogénesis y angiogénesis están altamente conectadas, y ambos promueven el remodelado neuronal y mejoran la función neurológica tras la isquemia cerebral [106, 107].

➤ **Neuroplasticidad**

En la fase crónica de la isquemia cerebral está presente un tercer mecanismo de reparación, la neuroplasticidad, que hace referencia a los procesos de remodelado sináptico y crecimiento axonal, que parecen ser los responsables de la mejora motora, sensitiva y cognitiva de los pacientes de ictus [53, 108]. En relación a esto, como ya se comentó anteriormente, después de un evento isquémico los astrocitos proliferan formando una cicatriz glial que rodea la lesión y libera proteoglicanos que inhiben el crecimiento axonal. Debe de haber mecanismos para reducir la formación de cicatrices gliales, y también para estimular el crecimiento axonal, conduciendo a una neurorreparación eficiente [109].

1.7. Modelos animales de isquemia cerebral

Los modelos animales son instrumentos fundamentales en el estudio preclínico de enfermedades, permitiendo explorar la fisiopatología, así como diseñar y evaluar nuevos enfoques terapéuticos para su posterior translación a la clínica. Cuando la enfermedad original no está presente de forma endógena en el modelo animal, debe ser inducida artificialmente, como es el caso de la isquemia cerebral.

Teniendo en cuenta la extensión del daño, los modelos animales de isquemia cerebral se pueden clasificar en dos categorías: modelos animales de isquemia cerebral global y modelos animales de isquemia cerebral focal. En el primer caso se elimina el flujo cerebral de todo el cerebro mediante la ligadura de ambas arterias carótidas, por lo que estos modelos se usan

Estudio preclínico de la paradoja de la obesidad en la isquemia cerebral:
efecto terapéutico del tratamiento con nicotina

normalmente para el estudio de las consecuencias de un infarto de corazón. Por otro lado, los modelos animales de isquemia focal se usan para mimetizar un ictus isquémico, restringiendo la interrupción del flujo cerebral a un territorio vascular focal. Además, teniendo en cuenta la duración de la interrupción del flujo sanguíneo, los modelos de isquemia cerebral focal se pueden clasificar en permanentes o transitorios, permitiendo el estudio de las consecuencias patofisiológicas del ictus y el daño por reperfusión.

Las evidencias clínicas muestran que la mayoría de los ictus en humanos ocurren por oclusiones en el territorio de la arteria cerebral media (ACM), y como consecuencia, muchos de los modelos de isquemia focal se basan en la oclusión temporal o permanente de esta arteria. Estos se pueden clasificar en los siguientes tipos:

➤ **Oclusión de la ACM mediante filamento intraluminal:** es uno de los modelos más comunes, descrito por primera vez por *Longa et al.* en 1989 [110]. Se basa en la introducción de un monofilamento a través de la carótida interna para ocluir el flujo cerebral en el origen de la ACM. Tiene como ventajas que no necesita craneotomía y que tiene una alta reproducibilidad del tamaño y localización de la lesión; sin embargo, no es útil para el estudio de terapias trombolíticas.

➤ **Tromboembólico:** este modelo fue descrito por *Kudo et al.* en 1985 y 1997 respectivamente [111]. Este modelo trató de mejorar el modelo del filamento, sustituyendo el filamento intraluminal por la inyección de trombos sanguíneos autólogos a través de la carótida interna. Tampoco necesita craneotomía y se puede usar para estudiar terapias trombolíticas. Como desventajas, presenta una baja reproducibilidad en el tamaño y localización de la lesión, y riesgo de reperfusión espontánea.

➤ **Electrocoagulación de la ACM:** fue publicado por primera vez por *Tamura et al.* en 1981 [112]. Está basado en la electrocoagulación directa de la ACM. Como es una oclusión permanente, tiene la ventaja de no sufrir reperfusión espontánea. Por el contrario, necesita craneotomía, la electrocoagulación puede dañar el tejido próximo y no se puede usar para estudiar terapias trombolíticas.

➤ **Ligadura de la ACM:** *Chen et al.* publicaron este modelo en 1985 [113]. El procedimiento es similar al modelo de electrocoagulación, requiriendo además una craneotomía; la ACM se liga con una sutura, permitiendo producir tanto oclusiones permanentes como transitorias. Su principal ventaja es la alta reproducibilidad del tamaño y localización de la lesión, pero presenta las limitaciones de que necesita craneotomía y que no es útil para el estudio de terapias trombolíticas.

➤ **Tromboembolismo de la ACM:** publicado en 2007 por *Orset et al.* [114]. Este modelo permite la microinyección de trombina *in situ* en la ACM, tratando de formar un trombo sanguíneo local. Las ventajas del modelo son que se puede usar para estudiar terapias

fibrinolíticas y que tiene una alta reproducibilidad del tamaño y localización de la lesión. Sus desventajas son la necesidad de craneotomía, el riesgo de reperfusión espontánea y que únicamente está puesto a punto en ratón y no en rata.

Otros modelos no afectan propiamente a la ACM, o producen infartos multifocales:

➤ **Inyección de endotelina 1:** fue publicado por primera vez por *Sharkey et al.* en 1993 [115]. La endotelina 1, un potente vasoconstrictor, se inyecta en el estriado por esterotaxia. Tiene una alta reproducibilidad del tamaño y localización de la lesión, pero necesita craneotomía y no se puede usar para estudiar terapias trombolíticas.

➤ **Embolismo por microesferas:** descrito por *Zivin et al.* in 1987 [116]. En este caso, se inyectan suspensiones de microesferas calibradas u otras embolias no coagulativas en la arteria carótida interna produciendo microembolización difusa. Su principal ventaja es que no necesita craneotomía, y entre sus limitaciones están la baja reproducibilidad del tamaño y localización de la lesión, además de no ser útil para el estudio de terapias trombolíticas.

La mayoría de los estudios preclínicos emplean pequeños roedores como modelos. El uso de ratas y ratones presenta las ventajas de que el mecanismo molecular que lleva a la muerte celular por isquemia está bien caracterizado, y que la capacidad de su modificación genética hace más fácil el estudio de dianas moleculares específicas. Además, los costes de mantenimiento y los requerimientos de espacio de los roedores son pequeños, permitiendo ser usados en un número más elevado de centros de investigación. Sin embargo, a pesar de estas ventajas, el uso de roedores presenta importantes limitaciones como que son animales lisencefálicos, con una pequeña proporción de sustancia blanca en comparación con los humanos, o el hecho de que el pequeño tamaño implique particularidades metabólicas y fisiológicas que son diferentes a los animales de gran tamaño como los humanos. Estas limitaciones dificultan la translación directa de resultados desde los roedores a los humanos, implicando que una vez que un fármaco muestre eficacia en roedores, debe ser probado en animales girencefálicos grandes (como gatos, perros, cerdos o monos) antes de ser probados en humanos [117].

2. Obesidad

2.5. Definición

La obesidad y el sobrepeso se definen como un incremento de la masa corporal debido sobre todo a una acumulación anormal o excesiva de grasa que puede ser perjudicial para la salud.

Estudio preclínico de la paradoja de la obesidad en la isquemia cerebral:
efecto terapéutico del tratamiento con nicotina

La Organización Mundial de la Salud (OMS) clasifica la obesidad de un individuo basándose en el Índice de Masa Corporal (IMC), una medida de asociación entre masa y la talla de un individuo (masa en kilogramos dividido por la altura en metros elevada al cuadrado) que es usada comúnmente para clasificar el bajo peso, sobrepeso y obesidad en adultos. Una persona con un IMC igual o superior a 25 es considerada con sobrepeso y con un IMC igual o superior a 30 es considerada obesa (Figura 7).

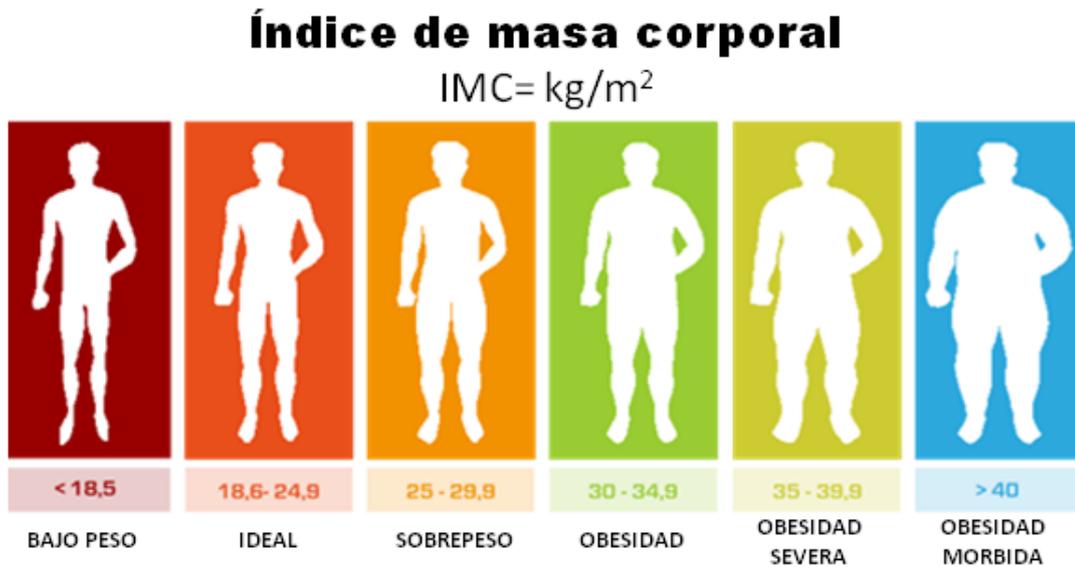


Figura 7. Índice de masa corporal calculado como kg/m². Entre 18,6 y 24,9 se considera un peso ideal, por encima se establecen sobrepeso (25-29,9), obesidad (30-34,9) y obesidad severa (35-39,9) y obesidad morbida (>40), mientras que < 18,5 se considera bajo peso. *Creative commons.*

2.6. Importancia socioeconómica

Durante el desarrollo evolutivo del Homo sapiens, la selección natural ha maximizado la capacidad para almacenar la energía en forma de grasas, permitiendo aprovechar al máximo los recursos disponibles. Pero lo que antaño supuso una ventaja muy importante para la supervivencia, actualmente, en gran parte de los países no lo es, ya que los humanos se encuentran en un ambiente en el que no existe una limitación en el acceso a los nutrientes, lo que, unido a un cambio en los hábitos de vida de la población (sedentarismo...), están provocando un incremento muy acusado en los casos de obesidad y sobrepeso [118]. Ambos se han convertido en una epidemia mundial llegando a ser un problema importante de salud pública, convirtiéndose en el sexto factor principal de riesgo de defunción en el mundo. Muchos estudios sobre la prevalencia de la obesidad en la población mundial han arrojado datos poco prometedores sobre la evolución de este problema, y se estima que la obesidad se ha duplicado desde 1980. En 2008, en Europa, el 35% de las personas adultas mayores de 20 años presentaban sobrepeso, y el 11% eran obesas [119, 120]. Un dato preocupante de 2012 habla de

más de 40 millones de niños menores de cinco años con sobrepeso. Por otro lado, el 65% de la población mundial vive en países donde el sobrepeso y la obesidad se cobran más vidas de personas que la insuficiencia ponderal. Se le atribuye a la obesidad el 9,1% del total del gasto sanitario de un país como Estados Unidos. La evolución de este problema ha llevado a calcular que alrededor de 2030 el 90% de todos sus habitantes adultos padecerán sobrepeso y que el 51,1% de ellos serán obesos. Se ha estimado que en esa década el gasto debido a la obesidad y a los problemas que provoca, supondrán alrededor del 15,8-17,6% del gasto total en sanidad en Estados Unidos; es decir, 1 de cada 6 dólares gastados [120].

El aumento de la prevalencia de sobrepeso y obesidad está asociado con muchas enfermedades crónicas como la diabetes mellitus, las enfermedades cardiovasculares, accidentes cerebrovasculares, hipertensión y ciertos tipos de cáncer; esto conduce a una mayor tasa de mortalidad y morbilidad, reduciéndose así la calidad y la esperanza de vida de quién lo padece [121, 122, 123, 124, 125].

2.7. Homeostasis energética

2.7.1. Concepto

El concepto de homeostasis o balance energético es fundamental para comprender el proceso de acumulo de grasa en el organismo. El balance energético es la relación entre la energía que capta el organismo y la energía consumida (**Figura 8**). La energía que entra en el organismo es obtenida del procesamiento de los alimentos ingeridos y la energía consumida hace referencia al gasto energético. El gasto energético se compone de:

➤ **Actividad física**

La actividad física produce un consumo de energía mediante el uso de los nutrientes en los músculos del organismo. La cantidad de energía gastada mediante esta vía va a depender en gran medida de los hábitos de vida de cada individuo.

➤ **Metabolismo basal**

Se define como la cantidad mínima de energía necesaria para que el organismo pueda llevar a cabo las funciones metabólicas básicas. El gasto energético asociado al metabolismo basal va a depender de varios factores como pueden ser altura, sexo, cantidad de masa muscular, etc.

➤ **Termogénesis**

Se define como la capacidad de generar calor mediante reacciones metabólicas. Este fenómeno es muy importante ya que ayuda a mantener la homeostasis térmica que permite que las

Estudio preclínico de la paradoja de la obesidad en la isquemia cerebral:
efecto terapéutico del tratamiento con nicotina

reacciones fisiológicas ocurran de la forma correcta. El principal tejido implicado en este proceso es el tejido adiposo pardo (BAT; del inglés *brown adipose tissue*), lo que lo sitúa en un lugar privilegiado en la regulación del balance energético [126, 127].

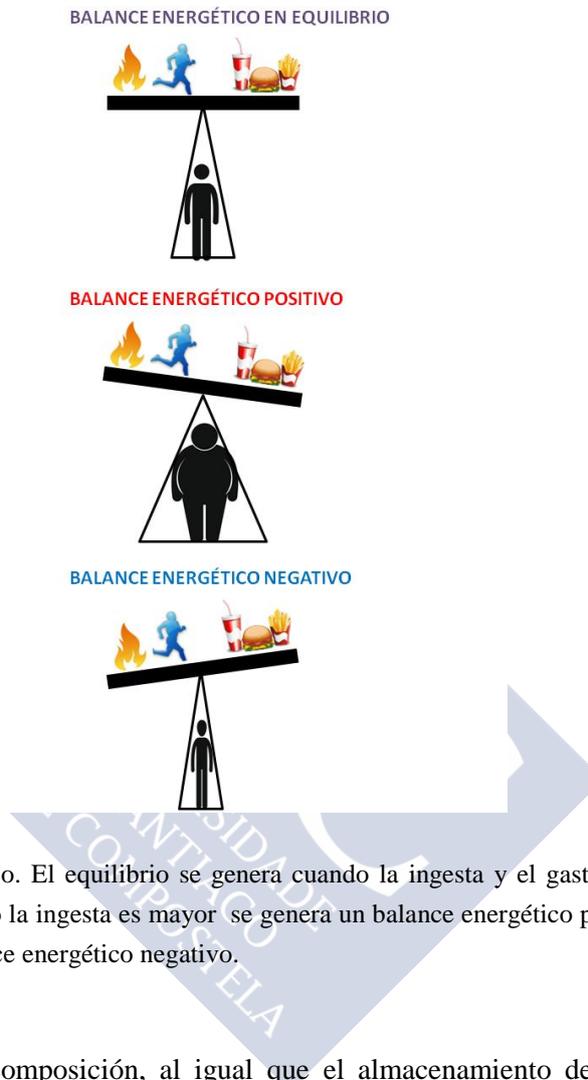


Figura 8. Balance energético. El equilibrio se genera cuando la ingesta y el gasto energético son iguales, sin embargo, cuando la ingesta es mayor se genera un balance energético positivo y cuando es menor se genera un balance energético negativo.

La masa corporal y su composición, al igual que el almacenamiento de energía como triglicéridos en el tejido adiposo blanco (WAT; del inglés *white adipose tissue*), están determinados por la interacción entre factores genéticos, ambientales y sociales. Estos factores actúan a largo plazo variando el balance energético; es decir, modifican el balance entre ingesta y gasto energético. Estudios fisiológicos han sugerido que la masa corporal y las reservas de energía están reguladas homeostáticamente, es decir, cualquier cambio en la masa corporal produce cambios en la ingesta y en el gasto energético que contrarestran la perturbación inicial. Así, desde un punto de vista termodinámico, la obesidad y la delgadez son el resultado de una alteración en este balance (positivo o negativo) entre la ingesta y el gasto energético (**Figura 8**). Asumiendo que un individuo no tiene problemas con la absorción de nutrientes, el almacenamiento de energía en forma de grasa solo se incrementará si la energía ingerida excede

el total del gasto energético (actividad física, metabolismo basal y termogénesis adaptativa) [128, 129, 130, 131]. Como consecuencia de la forma de vida en los países industrializados, la alta disponibilidad de comida y el sedentarismo, hacen que el balance energético esté inclinado hacia el almacenamiento de grasas sin gasto energético, lo que a largo plazo conduce al sobrepeso y a la obesidad [128, 132, 133].

2.7.2. Regulación de la homeostasis energética

La regulación del balance energético es un proceso altamente complejo en el que intervienen tanto señales fisiológicas como de comportamiento, además de un gran número de tejidos. A grandes rasgos, el mantenimiento de un correcto balance entre ingesta y gasto energético depende de tres elementos reguladores de la respuesta homeostática (134-136):

- Señales periféricas:
 - ❖ Señales de saciedad (procedentes del tracto gastrointestinal)
 - ❖ Señales hormonales
- Sistema nervioso central

Durante los últimos años, muchas de las investigaciones se han centrado en identificar los mecanismos moleculares de la homeostasis energética [122, 123, 128, 137]. Se han investigado moléculas clave en el desarrollo de la obesidad, como es el caso de la leptina o la grelina, y se han descubierto numerosos neuropéptidos y vías metabólicas que actuando en el sistema nervioso central (SNC) modulan la ingesta. También se ha avanzado notablemente en el conocimiento de las bases moleculares del gasto energético.

La prevención debería ser el primer mecanismo de acción contra la obesidad, pero también es muy importante el desarrollo de estrategias para el tratamiento. Nuevas señales y factores involucrados en la modulación del balance energético y del metabolismo están siendo continuamente descubiertos, proporcionando nuevas dianas terapéuticas para fármacos potenciales contra la enfermedad metabólica. Lo que se pretende es el mejor conocimiento de cómo las señales periféricas y del SNC actúan conjuntamente y cómo la manipulación de las rutas en las que están implicadas puede conducir a una mejora de la disfunción metabólica [128, 137].

2.7.2.1. Señales periféricas

Existe una clara interacción entre el SNC y la actividad de numerosos órganos involucrados en la homeostasis energética, lo que requiere la transmisión de información al cerebro. Para llevar a cabo esto, el cerebro recibe información continuada: 1) acerca de las

Estudio preclínico de la paradoja de la obesidad en la isquemia cerebral:
efecto terapéutico del tratamiento con nicotina

reservas y de flujo de energía en órganos críticos; 2) acerca de los nutrientes que están siendo ingeridos y absorbidos y, 3) sobre las necesidades energéticas basales por los tejidos. Las señales periféricas que interactúan con otros factores hipotalámicos para controlar el apetito y la masa corporal pueden ser divididas en dos categorías claramente diferenciadas, como veremos a continuación [130, 138].

Por un lado, están las señales generadas durante las comidas, que causan saciedad; es decir, señales que informan sobre la terminación de la comida o que prolongan el intervalo hasta la siguiente. La sensación de hambre puede ser definida como la motivación para buscar y consumir alimentos, que inicia el acto de comer. La saciedad es el estado en el cual el hambre y el comportamiento alimentario están inhibidos. El tracto gastrointestinal juega un papel crucial en la regulación de la ingesta de alimentos, informando al SNC sobre la cantidad de alimento ingerido y la composición nutricional del mismo [139, 140]. Esta información engloba toda una serie de estímulos mecánicos, químicos y hormonales que se denominan señales de saciedad, y son los mecanismos de control homeostático a corto plazo. El SNC recibe información sensorial procedente de estímulos mecánicos, que informan sobre el grado de distensión del tubo digestivo y aportan información sobre la cantidad de alimento ingerido, y químicos, que aportan información sobre la composición nutricional del mismo. Esta información llega al SNC, concretamente a núcleos del tronco cerebral como el núcleo del tracto solitario (NTS) y el área postrema (AP), a través de las aferencias vagales del ganglio cervical superior [130, 137, 138]. Por otro lado, el tracto gastrointestinal también informa al SNC del estado nutricional a través de la secreción de hormonas, fundamentalmente anorexigénicas (reducen la ingesta) como la colecistoquinina (CKK), el glucagón, el péptido similar al glucagón tipo 1 (GLP-1), enterostatina, polipéptido pancreático... con la excepción de la grelina, que es la hormona orexigénica (incrementa la ingesta) [141].

El otro grupo de señales incluye hormonas que se secretan en proporción a la cantidad de grasa corporal, ayudando al control homeostático a largo plazo. Estas hormonas adipocitarias llegan al cerebro transportadas a través de la barrera hematoencefálica (BBB) e interactúan con sus receptores de membrana específicos, expresados preponderantemente en el hipotálamo [130, 137, 138]. Existen dos importantes hormonas anorexigénicas que envían señales al hipotálamo del estado nutricional y de adiposidad, que son la leptina, producida por el WAT y la insulina, producida por las células β del páncreas y que también responde a los niveles de glucosa en sangre [141]. Algunas otras hormonas adipocitarias sintetizadas en el WAT son la resistina, adiponectina, IL-6...

2.7.2.2. Sistema nervioso central

Toda la información periférica procedente de los mecanismos anteriores es recibida, analizada y procesada en el SNC, el cual influye en el balance energético y la masa corporal a través de tres mecanismos: 1) efecto del ambiente, incluyendo alimentación y actividad física; 2) efectos en la actividad del sistema nervioso autónomo (SNA), que regula el gasto energético y otros aspectos del metabolismo y, 3) efectos en el sistema neuroendocrino, incluyendo secreción de hormonas como hormona de crecimiento (GH), hormonas tiroideas (THs), insulina, cortisol y hormonas sexuales. El cerebro controla los tejidos que tienen mucha importancia en la homeostasis energética, como pueden ser hígado o músculo, a través, fundamentalmente, del sistema nervioso autónomo y de la secreción de hormonas activas metabólicamente (9). La coordinación de este sistema complejo ha sido sujeto de intensos estudios y ha aportado muchos avances en el estudio de la obesidad [128, 141].

El hipotálamo es un elemento de SNC fundamental para el control y la coordinación de la actividad homeostática periférica. Esta pequeña región diencefálica localizada debajo del tálamo es considerada el centro neuroendocrino del organismo y controla un amplio número de procesos homeostáticos como son la ingesta, la saciedad, la bebida, el metabolismo, la temperatura la reproducción, la lactancia, la función cardiovascular, el ciclo sueño-vigilia y la secreción hormonal [142, 143]. Esta región está organizada anatómicamente en poblaciones de células establecidas en grupos definidos llamados núcleos, con múltiples conexiones neuronales gracias a proyecciones axonales, formando de esta forma circuitos. Estos núcleos hipotalámicos modifican la expresión de neurotransmisores específicos y de neuromoduladores de naturaleza peptídica (neuropéptidos), dependiendo de la señal homeostática proveniente de los nutrientes (aminoácidos, ácidos grasos y glucosa) y de hormonas (leptina, ghrelin, glucosa, resistina e insulina, entre otras) que alcanzan el hipotálamo e informan de la condición de las reservas energéticas dentro del cuerpo [134, 144, 145, 146, 147]. Esta información es procesada en poblaciones neuronales específicas capaces de modular la expresión o síntesis de neuropéptidos orexigénicos (promueven la ingesta de energía) o neuropéptidos anorexigénicos (inhiben la ingesta). Dentro de estos centros hipotalámicos, los más relevantes modulando la homeostasis energética son: el núcleo arcuato (ARC), el núcleo paraventricular (PVH), el núcleo dorsomedial (DMH), el núcleo ventromedial (VMH) y el área hipotalámica lateral (LHA).

Además del hipotálamo también existen otras zonas del SNC implicadas en la regulación de la ingesta. Por ejemplo, como se expuso anteriormente, en el tronco cerebral, el NTS y el AP integran la información sensorial y hormonal procedente del tracto gastrointestinal y del hígado (vía nervio vago y aferencias del ganglio cervical superior), así como la información sobre el sabor, procedente de la cavidad bucal (vía nervios craneales), el olor y la apariencia. Por otro lado, el sistema hedónico de la ingesta está formado principalmente por el área tegmental

ventral (VTA), donde se sintetiza dopamina (principal neurotransmisor de las vías de recompensa), y el núcleo accumbens (NAc), inervado por las neuronas del área VTA y que por tanto responde al estímulo de dopamina, constituyendo así el circuito dopaminérgico mesolímbico [148].

3. La paradoja de la obesidad en el ictus isquémico

3.1. La obesidad como factor de riesgo para el ictus isquémico

El sobrepeso y la obesidad (y posiblemente el bajo peso) se asocian con una mayor mortalidad por todas las causas, siendo la mortalidad más baja para un IMC entre 20 y 24,9 kg/m² [149, 150]. Esto se debe a que la obesidad está asociada con muchas enfermedades crónicas como la diabetes mellitus, las enfermedades cardiovasculares y cerebrovasculares, hipertensión y ciertos tipos de cáncer [121, 122, 123, 124, 125].

En las enfermedades cardiovasculares, el incremento del índice de masa corporal ≥ 30 kg/m², acompañado de altas demandas oxidativas del tejido adiposo metabólicamente activo, eleva el consumo total de oxígeno del cuerpo, que va acompañado de un aumento absoluto del gasto cardíaco llevando a la hipertrofia ventricular izquierda. Esto se asocia con insuficiencia cardíaca congestiva, un mayor riesgo de morbilidad y mortalidad por enfermedad coronaria y muerte súbita, así como ritmos cardíacos anormales (o arritmias) [151]. Sin embargo, también se cree que el riesgo está mediado sustancialmente por la dislipemia, la hipertensión, la resistencia a insulina, la diabetes mellitus, y la inflamación (asociado a la obesidad se han visto incrementados los niveles de la proteína C reactiva, IL-6, TNF α , MCP-1/CCL-2, IL-8 e ICAM-1) [152].

Son muchos los estudios que han examinado la asociación entre la obesidad y la enfermedad cerebrovascular, asociándose la obesidad con un mayor riesgo de ictus [153, 154]. Prácticamente la totalidad de estos estudios miden la obesidad con el IMC, pero alguno también usa las medidas de obesidad central como la relación cintura-cadera o la circunferencia de la cintura. En la mayoría se encuentra al menos una de las medidas de adiposidad significativamente asociada con el incremento de riesgo de ictus. En estudios epidemiológicos recientes, por cada unidad que incrementa el IMC, el riesgo de ictus isquémico incrementa sobre el 5%, y el riesgo parece ser casi lineal en un IMC todavía normal de 20 kg/m² [155]. Existen evidencias importantes que han surgido de los estudios de asociación entre obesidad y riesgo de ictus. Primera, que las medidas de obesidad central predicen mejor el riesgo de ictus que el IMC en la mayoría de los estudios [156], aunque no en todos [157]. Segunda, el riesgo relativo de ictus asociado a la obesidad parece ser mayor para individuos de mediana edad comparados con los de avanzada edad. Y tercera, se asocia tanto con el ictus isquémico como con el hemorrágico

[158], pero se ha demostrado de forma más consistente para el primero [154]. Es preciso señalar que la asociación entre la obesidad y el aumento de riesgo de ictus se explica, en gran medida, por la hipercolesterolemia, hipertensión y diabetes mellitus [152, 154, 155]. Pero la mayoría de los investigadores consideran que estas son variables intermedias (es decir, son causadas por la obesidad e independientemente incrementan el riesgo de enfermedad cerebrovascular) y, por tanto, las omiten para los modelos que examinan la asociación entre la obesidad y el riesgo de accidente cerebrovascular.

La prevalencia de la obesidad en los pacientes de ictus no se ha descrito, pero las estimaciones disponibles indican que puede oscilar del 18 al 44% según lo definido por la obesidad total (es decir, el IMC) y del 36% según las medidas centrales [159-162]. No resulta extraño que los supervivientes de un ictus que son obesos sean más propensos a tener ciertos factores de riesgo vascular, incluyendo diabetes mellitus, lipoproteínas de baja densidad (HDL), colesterol, hipertensión, y apnea obstructiva del sueño [159, 162, 163]. Esta última está asociada con peor resultado y alta mortalidad tras un ictus [164]. Por otro lado, un pequeño número de estudios sugieren que la obesidad confiere una peor respuesta al activador de plasminógeno tisular [165], menor probabilidad de obtener la alta a casa [160] y peor respuesta a la rehabilitación [166]. Sin embargo, la efectividad de la terapia hipotensiva tras el ictus no está afectada por el peso corporal [167].

La pérdida de peso en pacientes obesos se puede dar debido a cambios en el comportamiento alimenticio, por fármacos o por cirugía bariátrica. Desafortunadamente, hay muy pocos datos sobre el efecto de alguna de estas intervenciones en el riesgo de eventos vasculares [168].

3.2. La obesidad como indicador de buen pronóstico tras un ictus isquémico

En contraposición a los múltiples estudios que relacionan la obesidad como un factor de riesgo para padecer múltiples enfermedades incluyendo al ictus [151], en los últimos años se está teniendo una perspectiva diferente sobre el peso corporal en lo referente a pacientes con enfermedades cardiovasculares establecidas. De hecho, el sobrepeso y la obesidad están asociados con una mayor supervivencia en diversas enfermedades cardiovasculares, incluyendo la insuficiencia cardíaca [169], el infarto agudo de miocardio [170], la cirugía de bypass [171], la cirugía valvular [172] y la enfermedad coronaria [173].

Esta relación entre supervivencia y el peso corporal también es aplicable a los pacientes con ictus y, mientras que hay muchos estudios que hablan de que la obesidad podría ser un factor de riesgo de ictus, la relación entre el peso corporal y el pronóstico después de un ictus o

Estudio preclínico de la paradoja de la obesidad en la isquemia cerebral: efecto terapéutico del tratamiento con nicotina

un AIT está peor establecida. Se han llevado a cabo investigaciones para evaluar el impacto del estado nutricional y del peso corporal sobre el pronóstico después de un ictus. Los resultados muestran, de forma contradictoria a los estudios que hablan de una peor recuperación de los pacientes obesos tras un ictus [159-166], que existe una relación inversa entre el peso corporal y la mortalidad en dichos pacientes. En el ensayo FOOD se ha investigado el impacto del estado nutricional en la mortalidad de pacientes con ictus y se ha descrito que los pacientes con mala nutrición tuvieron un riesgo de morir 2,3 veces mayor, en el plazo de 6 meses, frente a los pacientes con un estado nutricional normal; mientras que los pacientes con sobrepeso no presentaron un riesgo aumentado [174]. En un proyecto danés, en el que se incluyeron 21.884 pacientes con ictus, se observó una mayor mortalidad en los pacientes con bajo peso [175]. De igual modo, los pacientes con sobrepeso y obesidad tuvieron una supervivencia significativamente mayor que los pacientes con peso corporal normal. En un estudio griego reciente, que incluyó 2.785 pacientes con ictus, se evidenció una asociación inversa entre el peso corporal y la mortalidad [161]. Por otro lado, la obesidad no se establece como un factor de riesgo para la recurrencia de ictus. Además, los resultados de estudios recientes indican que los pacientes obesos tienen un riesgo más bajo que los pacientes delgados de sufrir un evento vascular importante tras un ictus, además de mejores resultados de supervivencia y pronóstico funcional [162, 176]. De igual forma, los pacientes obesos presentan menor mortalidad y mejor recuperación funcional tras una hemorragia intracerebral [177]. Esta relación inesperada de la obesidad con un mejor pronóstico después del ictus ha sido denominada *paradoja de la obesidad*, y ha llevado a cuestionar la recomendación de pérdida de peso en estos pacientes [161]. La paradoja de la obesidad es particularmente desconcertante porque la pérdida de peso se asocia con mejoras en los principales factores de riesgo cardiovascular, incluyendo la dislipemia, la diabetes mellitus, la hipertensión y las medidas de inflamación. Por eso, también se ha sugerido que la subestimación del efecto adverso de la obesidad podría explicarse por sesgo [178]. Por otro lado, otros estudios clínicos recientes se contraponen a *la paradoja de la obesidad* en los pacientes de ictus isquémico [179, 180, 181].

Ante esta falta de consenso, se deja abierto un campo de estudio para poder obtener resultados más concluyentes para dos patologías muy prevalentes en la actualidad, el ictus y la obesidad. Sin embargo, es preciso matizar que los estudios clínicos son observacionales, no es factible el estudio experimental en los pacientes y, a su vez, es difícil de analizar esta asociación en la fase aguda tras la isquemia. En general, los estudios clínicos investigan el efecto positivo o negativo de la obesidad sobre la morbilidad y mortalidad a largo plazo tras un ictus, pero los mecanismos a través de los cuales la obesidad tiene un efecto beneficioso o perjudicial no se han elucidado en los estudios clínicos. Además, en los ensayos clínicos está presente el sesgo de selección [182] que da lugar a relaciones no causales o asociaciones entre los diferentes efectos. Cuando son efectos medidos puede hacerse un ajuste estadístico, pero el problema está con los

efectos no medidos que pueden distorsionar la relación entre la obesidad y el pronóstico tras la isquemia cerebral [183]. Por otro lado, los estudios clínicos existentes han utilizado principalmente el IMC como medida de la obesidad, y esto no siempre es el mejor indicador de adiposidad ya que no discrimina entre la masa corporal magra y grasa. Otras medidas de la obesidad pueden reflejar con mayor precisión la adiposidad nociva, como por ejemplo la obesidad visceral/abdominal [184,185].

3.3. Efecto de la obesidad en los modelos animales de isquemia cerebral

En contra de la perspectiva clínica, hay un claro consenso en los estudios preclínicos de que la obesidad empeora el resultado tras un ictus. Este efecto nocivo de la obesidad en el pronóstico ha sido principalmente demostrado en roedores sometidos a una isquemia cerebral experimental. En ambos modelos de obesidad, rata y ratón, los roedores sufren un incremento del daño isquémico cerebral y tienen peores resultados de comportamiento en comparación con los animales control. Este efecto desfavorable fue inicialmente observado en modelos genéticos de obesidad, como los ratones ob/ob [186, 187, 188, 189, 190, 191, 192, 193] los ratones db/db [194, 195, 196, 197, 198] o las ratas Zucker [199, 200, 201], los cuales desarrollan obesidad debido a la deficiencia de leptina o del receptor de la misma, respectivamente. Este resultado negativo se ha confirmado también en modelos de obesidad inducidos por dieta, en los que el animal se convierte en obeso por estar alimentado con una dieta alta en grasa, tanto en rata [202, 203, 204, 205, 206, 207] como ratón [193, 208, 209, 210] y gerbil [211, 212, 213]. Se han usado gran variedad de modelos de isquemia cerebral en estos estudios, incluyendo oclusión permanente y transitoria de la arteria cerebral media, ligación de la arteria carótida común y exposición a un ambiente hipóxico. En ratón, se ha descrito recientemente que el impacto negativo de la obesidad inducida por dieta en el pronóstico tras la isquemia depende de la gravedad del daño isquémico inicial (volumen de isquemia) [60]. Sin embargo, no está claro si estos efectos nocivos de la obesidad en estos estudios preclínicos son permanentes, o reversibles, con la reducción de peso.

➤ Efecto de la obesidad en la inflamación

❖ Neuroinflamación

La inflamación crónica de bajo grado que resulta de la obesidad puede afectar al resultado tras un ictus modulando la inflamación del SNC previa al ictus. Los pacientes obesos suelen mostrar niveles elevados de citoquinas pro-inflamatorias en el plasma, incluyendo CRP, IL-6, TNF α y CCL-2/MCP-1 [152]. Las citoquinas circulantes pueden acceder directamente al

Estudio preclínico de la paradoja de la obesidad en la isquemia cerebral: efecto terapéutico del tratamiento con nicotina

parénquima cerebral, o transmitir señales inflamatorias sobre la BBB indirectamente, a través de receptores en las células endoteliales de la vasculatura cerebral o por la estimulación de fibras nerviosas aferentes. Sin embargo, la elevación sistémica de mediadores de inflamación en la obesidad puede que no sea suficiente para elevar la respuesta inflamatoria en el SNC. En su lugar, puede dar origen a consecuentes estímulos inflamatorios en las células, por ejemplo leucocitos o plaquetas en la circulación [191, 214]. Los ratones que desarrollan obesidad tras ser alimentados con una dieta alta en grasa muestran un incremento de la activación de astrocitos y microglía, e incremento de mediadores de inflamación en el cerebro, principalmente debido a la activación de NF- κ B [215, 216]. Sin embargo, esta respuesta puede ser debido a las grasas de la dieta, más que el resultado de la obesidad. El incremento en la inflamación basal puede, por tanto, alterar la reactividad de las células dentro del SNC a estímulos isquémicos posteriores, cambiando la consecuente respuesta inflamatoria.

Además de mostrar el daño isquémico incrementado, se ha visto reducida la reactividad microglial y la expresión de citoquinas inflamatorias en los cerebros de ratones db/db, ob/ob y con dieta alta en grasa tras la isquemia cerebral [188, 191, 210, 217, 218]. Esto puede ocasionar un fallo para generar una respuesta inflamatoria adecuada, lo que puede impedir la transición apropiada de la inflamación aguda a la reparación y recuperación. Además, los ratones db/db expresan factores de crecimiento y otros marcadores de reparación en el cerebro de forma retrasada y disminuída [217]. Por el contrario, otros estudios han visto que los niveles de expresión de citoquinas y quimioquinas están incrementados en el tejido cerebral isquémico de ratas y ratones obesos [195, 199, 202, 208]. Esta respuesta puede ser debido al incremento del daño en los roedores obesos, a pesar de que la elevada expresión de mediadores de inflamación se observe temprano sobre 2,5 horas tras la reperusión [199].

❖ Respuesta inflamatoria periférica tras la isquemia experimental

El ictus isquémico desencadena una respuesta inmune periférica tanto por vía humoral como por vía neural, con liberación de linfocitos en órganos inmunes (médula ósea, timo y bazo), liberación de proteínas de fase aguda en el hígado, aumento de mediadores de inflamación en varios órganos y aumentos sostenidos en otros marcadores de inflamación circulantes [219, 220]. Dado que esta respuesta periférica posterior al ictus se produce a medida que el daño central está evolucionando, se cree que este proceso amplifica la reacción inflamatoria tras el ictus y el daño resultante. En la obesidad, la respuesta inmune periférica después de la isquemia parece estar aumentada, ya que la IL-6 plasmática, CCL-2/MCP-1 y CXCL-1 (KC) aumentan significativamente en ratones obesos con isquemia [191, 208]. La inhibición de CCL-2/MCP-1 utilizando un anticuerpo de bloqueo reduce el daño en los ratones ob/ob, lo que sugiere que la respuesta inflamatoria periférica pueda contribuir al daño en la obesidad [191]. De la misma forma, tanto la Rosuvastatina (una estatina) como la Dargilitazona

(un agonista de PPAR γ) parecen ser antiinflamatorios y neuroprotectores en ratones ob/ob pero no ob/- [188, 192].

❖ Alteración de adipocinas

Los niveles plasmáticos de adiponectina en adultos sanos son elevados, pero se reducen en correlación con el aumento de adiposidad [221, 222]. La adiponectina tiene una variedad de acciones antiinflamatorias y recientemente se ha demostrado que es neuroprotectora en el ictus [223, 224]. En humanos, los niveles incrementados en plasma correlacionan con la disminución del daño isquémico, y al contrario, niveles bajos están asociados con un incremento de la mortalidad tras la isquemia cerebral. [225]. Se han hecho observaciones similares en modelos de isquemia focal transitoria en roedores, donde se ve que con la administración de adiponectina se disminuye el tamaño de infarto y déficit motor y sensorial [223, 224], y la deficiencia de la misma incrementa los daños [226]. Los efectos neuroprotectores de la adiponectina parecen estar mediados principalmente por el endotelio cerebrovascular isquémico, donde la adiponectina se localiza selectivamente después de la isquemia cerebral. Los mecanismos de esta localización no se entienden completamente ya que la adiponectina no se sintetiza localmente y no es capaz de atravesar una BBB intacta [227], pero puede implicar la adhesión al colágeno del endotelio lesionado y el paso sobre la barrera endotelial isquémicamente dañada [224, 226]. La acumulación de adiponectina resultante, puede tener una variedad de efectos beneficiosos; parece promover la integridad de la BBB reduciendo su permeabilidad, la expresión microvascular de MMP-9 y la acumulación de leucocitos [224]. Además, la adiponectina induce la activación de la óxido nítrico sintasa endotelial y, consecuentemente, aumenta el flujo sanguíneo cerebral durante la isquemia [223]. Finalmente, se ha demostrado que la adiponectina reduce la expresión de citoquinas pro-inflamatorias, supuestamente inhibiendo NF- κ B posiblemente debido a la activación de los receptores de adiponectina [224, 227]. Se encontró una disminución similar en la expresión de citoquinas inflamatorias en células endoteliales de cerebro cultivadas y tratadas con adiponectina [227]. Debido a estas acciones, se ha demostrado ampliamente que protege el endotelio vascular en la periferia [228]. Por lo tanto, una pérdida de estos efectos protectores puede explicar aumentos en el daño por isquemia cerebral y complicaciones microvasculares en ratones obesos, donde los niveles de adiponectina están crónicamente disminuidos. En concordancia, datos recientes demuestran que la obesidad exacerba la isquemia cerebral mediante el aumento de la apoptosis de las neuronas que expresan adiponectina [203].

➤ **Efectos de la obesidad en la vasculatura**

❖ **Incremento de la disrupción microvascular**

Los estudios de roedores sugieren que la obesidad exagera la disrupción inflamatoria de microvasos cerebrales, lo que empeora el resultado de la isquemia cerebral. Esto se ve experimentalmente como un aumento de la permeabilidad de la BBB, el aumento de la incidencia de transformación hemorrágica y mayor edema cerebral. Este aumento en la permeabilidad de la BBB en ratones obesos se observa a las 4 horas tras reperusión, y parece estar mediada por un aumento de las vesículas endoteliales transcitóticas en lugar de por una menor integridad de la unión [186]. Las complicaciones vasculares que ocurren tras la reperusión pueden ser mediadas por una regulación positiva de las metaloproteasas de matriz (MMP). Se han encontrado un aumento de expresión de MMP-2 y MMP-9 en el hemisferio isquémico de los roedores obesos [104, 189, 196, 206, 209]. La mayor disrupción de la BBB, transformación hemorrágica y el daño isquémico están ausentes en ratones con dieta alta en grasa *knockout* para MMP-9 [209], sugiriendo un papel causal de la MMP-9 en los efectos perjudiciales de la obesidad. En este sentido los vasos sanguíneos cerebrales expresan MMP-9 tras la isquemia cerebral en ratones *ob/ob* [189], pero también puede originarse a partir de leucocitos adherentes, particularmente los neutrófilos que liberan grandes cantidades de MMP-9 tras la desgranulación [229]. En concordancia, se ha visto que en los vasos cerebrales de roedores obesos se encuentran neutrófilos y otros leucocitos tras la isquemia cerebral [191, 199], igual que el reclutamiento de neutrófilos en el parénquima [194, 208]. Además, el número total de leucocitos circulantes aumenta en personas obesas, incluyendo el aumento de la abundancia de monocitos y neutrófilos y la actividad oxidativa [230, 231], y también en ratones obesos [208, 232]. Los ratones obesos también muestran un aumento de la inflamación vascular tras la isquemia cerebral, que se caracteriza por un aumento de la expresión vascular de ICAM-1, que puede mediar en el reclutamiento de neutrófilos [195, 199, 202]. Estos datos sugieren que la obesidad exagera los procesos inflamatorios que convergen en el endotelio de la microvasculatura cerebral, lo que resulta en el reclutamiento de leucocitos y la ruptura de la BBB. Sin embargo, actualmente no está claro si estos efectos están mediados por cambios dentro o fuera de la vasculatura. Por ejemplo, la obesidad puede dar lugar a cambios en la vasculatura que posteriormente empeora la respuesta vascular a una isquemia cerebral. Alternativamente, pueden ser causados por la convergencia de otras causas no vasculares en la BBB.

No está muy claro si hay una mayor alteración microvascular en los humanos obesos tras un ictus, ya que ningún estudio ha comparado todavía la salida de la BBB en pacientes obesos versus no obesos, o en pacientes con comorbilidades similares. Sin embargo, en pacientes seguidos la primera semana tras un ictus isquémico, el riesgo de transformación hemorrágica

disminuyó en pacientes obesos ($\text{IMC} \geq 35 \text{ kg/m}^2$) [233]. Además, en pacientes que recibieron trombólisis intravenosa después de un ictus, la obesidad no tuvo efecto sobre el desarrollo de la transformación hemorrágica [234, 235]. Esto contrasta con los ratones genéticamente deficientes de leptina (ob/ob) o de su receptor (db/db) y los ratones obesos inducidos por dieta, que muestran una mayor incidencia de transformación hemorrágica después de una isquemia cerebral experimental [186, 189, 196, 209].

❖ Efecto en la estructura y tono vascular

La obesidad tiene efectos sobre la estructura y capacidad de respuesta de la vasculatura cerebral, lo que es probable que afecte negativamente a los resultados de la isquemia cerebral. En los roedores con dieta alta en grasa y genéticamente obesos, las arterias cerebrales medias experimentan remodelación que se caracteriza por una disminución en el diámetro del lumen y un aumento en el grosor de la pared vascular, aumentando la resistencia vascular [201, 206, 209]. Esta remodelación estructural parece depender de las MMPs 2 y 9 y presenta un aumento de la deposición de colágeno 1 en la pared vascular [206, 209]. La obesidad también afecta a la producción y respuesta a factores que afectan al tono vascular. En particular, las arterias cerebrales de animales obesos muestran una mayor vasoconstricción en respuesta a la 5-hidroxitriptamina (5-HT), al cloruro de potasio (KCl) y a la endotelina-1 (ET-1), así como la vasodilatación reducida en respuesta a la acetilcolina [201, 207, 236]. Sin embargo, otros estudios no mostraron ningún efecto de la dieta rica en grasa sobre la respuesta vascular, o la atribuyeron a la hipertensión comórbida [200, 206]. Estos cambios pueden tener un impacto funcional en el flujo sanguíneo cerebral, por ejemplo, los ratones obesos muestran una respuesta alterada en el flujo sanguíneo cerebral tras la estimulación de los bigotes [203, 237].

Se han hecho otros descubrimientos similares en los vasos sanguíneos periféricos de los pacientes obesos. La obesidad se asocia con un aumento del grosor intima-media y una disminución de la elasticidad en las arterias, así como un deterioro de la vasodilatación mediada por el endotelio y un aumento de la actividad de la endotelina [238, 239]. Aunque estas observaciones no se han realizado directamente en los vasos cerebrales, los pacientes obesos muestran otros marcadores indicadores de la disfunción cerebrovascular. Por ejemplo, el incremento del IMC está asociado con la baja velocidad del flujo sanguíneo cerebral, con el incremento de la resistencia cerebrovascular y la reducción del flujo cerebral [240, 241]. De esta forma, tanto los datos preclínicos como clínicos sugieren que la disfunción cerebrovascular caracterizada por la resistencia vascular incrementada y la alteración de la autorregulación, pueden contribuir al empeoramiento de los resultados tras la isquemia cerebral o riesgo en obesidad.

Estudio preclínico de la paradoja de la obesidad en la isquemia cerebral: efecto terapéutico del tratamiento con nicotina

Un aspecto a considerar en los modelos de obesidad es que, además del peor resultado tras un ictus en los mismos, tanto en la obesidad genética como en la inducida por dieta, también se desarrollan otras patologías debido al incremento de su adiposidad, que se asocian con el síndrome metabólico observado en los pacientes obesos. Al igual que en la clínica, los modelos obesos presentan otras comorbilidades como la hipertensión, diabetes y dislipemias [195, 242, 243]. Debido a esto, es difícil establecer que la obesidad es la única causa del mal resultado tras la isquemia en los modelos animales, por lo que, estos modelos animales de obesidad imitan la situación en personas obesas, la posible contribución de otras comorbilidades debe ser considerada al intentar estudiar específicamente los efectos de la obesidad en la isquemia cerebral. En los estudios clínicos esto se puede explicar, en cierta medida, aplicando test estadísticos multivariantes.

Por otro lado, los estudios preclínicos que evalúan los efectos de la obesidad sobre los resultados funcionales tras la isquemia cerebral son todos experimentales y presentan limitaciones comunes. Mientras que los estudios clínicos suelen evaluar el resultado en términos de recuperación funcional o mortalidad a las semanas o años posteriores al accidente cerebrovascular, la mayoría de los estudios preclínicos se han centrado en la evolución de la lesión isquémica dentro de las 48 h de reperfusión. Este enfoque en los resultados a corto plazo podría explicar por qué no se encuentra *paradoja de la obesidad* en los estudios preclínicos. Por ejemplo, una razón hipotética de que la obesidad es protectora en pacientes con ictus es que las reservas metabólicas presentes en la obesidad protegen contra la pérdida de peso después del episodio cerebrovascular y la pérdida de masa muscular asociada [244]. Las consecuencias metabólicas del ictus han sido, en general, poco estudiadas preclínicamente, y menos aún en el contexto de la obesidad. En los estudios preclínicos, el ictus suele inducirse quirúrgicamente en ratones obesos, en lugar de esperar a que se produzcan espontáneos. Por tanto, si la paradoja de la obesidad se debe principalmente a los efectos de la obesidad sobre el riesgo, por ejemplo aumentando el riesgo en un derrame cerebral más temprano en la vida, entonces esto no sería detectable en los estudios de animales actuales. Otro problema es que los animales son casi todos jóvenes y macho, y este estricto control de variables, como sexo y edad, es útil para establecer vínculos causales en estudios experimentales, pero no refleja la situación clínica. Una gran desventaja de los estudios preclínicos es su uso exclusivo de roedores, y si la fisiología de roedores puede modelar con precisión una isquemia cerebral de humano [245, 246]. Aunque tanto los modelos obesos genéticos como los inducidos por dieta reproducen la situación clínica encontrada en pacientes obesos, ambos tienen otros inconvenientes específicos. Las mutaciones monogénicas que conducen a la obesidad son en realidad muy raras en la población general y la leptina tiene otros papeles inmunológicos más allá de la regulación del equilibrio energético [247, 248]. En la obesidad inducida por la dieta, la constitución de la dieta (principalmente la proporción de macronutrientes de grasas, proteínas e hidratos de carbono) afectan al fenotipo

resultante. El uso de una dieta alterada también añade una variable adicional a considerar, ya que los efectos sobre el resultado pueden deberse a la dieta en sí, más que a la obesidad resultante. Los estudios preclínicos también utilizan animales que son obesos de forma más homogénea y robusta que la población de pacientes. Aunque esta homogeneidad facilita la interpretación de la contribución de la obesidad en estudios experimentales, ignora los efectos potencialmente protectores de la obesidad leve (por ejemplo, sobrepeso) [208]. Hay que decir que tanto en los ratones como en las ratas, los efectos nocivos de la obesidad sobre el resultado tras un ictus no se observan hasta que se obtiene un nivel umbral de obesidad [205, 208].

A pesar de que parece estar bien establecido el vínculo entre la obesidad y el riesgo de ictus isquémico, no se puede obviar la idea de que varios estudios clínicos han informado de que los pacientes con sobrepeso u obesos han mejorado la mortalidad y morbilidad. Esto contrasta claramente con el consenso de estudios preclínicos que han demostrado claramente que la obesidad empeora los resultados tras la isquemia cerebral en roedores. Hay muchas razones potenciales para la disparidad, incluyendo el diseño experimental, modelos, objetivos y análisis de resultados de estudios preclínicos y clínicos. Por todo esto, se requiere profundizar en este tema para poder obtener resultados más coherentes.

3.4. Implicación de rutas moleculares relacionadas con el control de la homeostasis energética en el ictus isquémico

3.4.1. La ruta de la AMPK

La dinámica de los procesos metabólicos en cualquier organismo vivo gira en torno al ATP, la molécula que actúa como moneda energética en la célula. Los procesos anabólicos utilizan ATP (endergónicos) para construir la maquinaria celular a partir de moléculas pequeñas, y los procesos catabólicos producen ATP (exergónicos). La utilización de la energía conduce a la hidrólisis de uno o dos enlaces de fosfato de alta energía en el ATP, dando lugar a la formación de adenosin difosfato (ADP) o adenosin monofosfato (AMP), respectivamente, y otros productos de la reacción interconvertibles. Por lo tanto, una elevada relación ADP o AMP/ATP implica la caída de los almacenes de energía, lo que conduce a señales que activan los caminos para restaurar la homeostasis energética, ya que el funcionamiento de un organismo depende del mantenimiento de esta. Las moléculas que pueden percibir la interrupción del equilibrio energético son fundamentales para la supervivencia. La proteína kinasa activada por AMP (AMPK), una serin treonina kinasa, está emergiendo como un regulador de la homeostasis energética crítico para muchos organismos, desde levaduras hasta mamíferos. Es el principal sensor energético, que no sólo detecta, sino que también controla y responde al estado energético alterado en la mayoría de las células eucariotas.

➤ **Estructura, expresión, función y regulación de la AMPK**

AMPK es un complejo heterotrimérico compuesto de tres subunidades, α , β y γ ; α es la subunidad catalítica, β y γ son subunidades reguladoras. La subunidad α tiene dos isoformas $\alpha 1$, $\alpha 2$; La subunidad β tiene dos isoformas, $\beta 1$, $\beta 2$; Y la subunidad γ tiene tres isoformas, $\gamma 1$, $\gamma 2$ y $\gamma 3$. Cada subunidad tiene patrones de expresión específicos en el SNC, y diferentes combinaciones de subunidades pueden ser importantes para la heterogeneidad de la función de AMPK en diferentes tipos celulares [249, 250]. Por ejemplo, la subunidad $\alpha 1$ no se expresa en astrocitos [251], un tipo de célula clave implicado en la respuesta a la isquemia, lo que implica que puede darse cierta especialización de la función AMPK basada en la expresión de la subunidad.

La AMPK se activa a través de la fosforilación de la treonina 172 (Thr 172) en el extremo N-terminal del dominio catalítico α en condiciones de estrés metabólico, ya sea fisiológico (ejercicio) o patológico (hipoxia, hambre). La activación de AMPK mediante fosforilación por las kinasas *downstream* de la misma, tales como la kinasa B1 del hígado (LKB1), la proteína kinasa β de la quinsa dependiente de Ca^{+2} /Calmodulina (CaMKK β), la kinasa 1 activada por el factor de crecimiento transformante β (TAK1), y por las fosfatasas de la proteína, conduce a la restauración del balance energético mediante la activación de vías catabólicas que producen ATP (oxidación de ácidos grasos, glucólisis, descomposición proteica) e inhibición de vías anabólicas que utilizan energía (síntesis de ácidos grasos, colesterol y triglicéridos). Una de las principales dianas es la acetil-Coa carboxilasa (ACC); la pAMPK inhibe su actividad por fosforilación. La AMPK también reduce la expresión de la ácido graso sintasa (FAS) [249, 250].

Esta kinasa se encuentra en medio de varios procesos metabólicos y está involucrada en los cambios metabólicos que se producen en el envejecimiento, la obesidad, la muerte celular y la supervivencia de la célula [251]. Por ejemplo, se ha visto que la vía de la AMPK está disminuída en el modelo de obesidad inducida por dieta debido al elevado contenido de grasa de la misma, tanto en hipotálamo y músculo [252] como en médula espinal [253]. Cada vez se reconoce que la activación de AMPK puede conducir a diferentes resultados fisiológicos del organismo, dependiendo de la gravedad, del factor de estrés y del tejido examinado [251].

➤ **La AMPK en la isquemia cerebral**

El ictus isquémico conduce a una cascada de rutas oxidativas y de muerte celular, que conducen al fallo energético celular. Este desequilibrio energético conduce a un aumento de la AMPK fosforilada (pAMPK, la forma activa de la kinasa) en un intento de restaurar los niveles de ATP en el cerebro isquémico [254]. Sin embargo, si la activación de AMPK es beneficiosa o

perjudicial, depende de muchos factores, y los resultados contradictorios han llevado a un debate considerable en la literatura.

❖ Estudios *in vitro*

Parte de esta confusión proviene de los modelos utilizados, muchos de los cuales se han centrado en los efectos de la lesión en los sistemas de cultivo celular, en los que sólo un tipo de célula se examina y las condiciones están lejos de ser las fisiológicas. Se ha observado que el mantenimiento de la glucosa fisiológica [255] y los niveles de oxígeno [256] en el medio de cultivo, hace que la AMPK responda mejor a los cambios metabólicos. La activación de AMPK con el ribonucleótido 5-aminoimidazol-4-carboxamida (AICAR) aumenta la supervivencia en neuronas embrionarias del hipocampo de rata bajo la privación de glucosa, hipoxia química o exposición al glutamato [257]. La inhibición de la AMPK por el compuesto C disminuye la viabilidad de los cultivos primarios de neuronas corticales bajo condiciones fisiológicas de oxígeno y glucosa [256]. De forma similar, un estudio más reciente muestra que la inhibición de AMPK por el compuesto C aumenta la lesión neuronal en cultivos neuronales puros causada por la privación de glucosa y oxígeno (OGD), mientras que la activación de AMPK por AICAR la disminuye [258]. Por otra parte, varios estudios han demostrado que la activación de AMPK es perjudicial. Se ha demostrado que la activación de AMPK conduce a la apoptosis neuronal, como en células humanas indiferenciadas de neuroblastoma SH-SY5Y expuestas a AICAR [259] o neuronas corticales expuestas a la neurotoxina tributiltina [260].

El reconocimiento creciente del concepto de que los efectos de AMPK son dependientes de la duración y el alcance de su activación, también pueden explicar algunos de estos resultados divergentes. Se ha encontrado una correlación positiva en los niveles de pAMPK inducidos por AICAR y la muerte celular en neuronas hipóxicas, lo que sugiere que la muerte celular depende del grado de activación de AMPK [261]. La sobreactivación de AMPK no sólo incrementa la muerte celular, sino que también afecta a la polarización y reparación axonal. Los estudios en cultivos neuronales corticales muestran que la sobreactivación de AMPK inhibe la axogénesis en condiciones de estrés metabólico, simuladas por AICAR o por tratamientos con metformina (un activador de AMPK que se usa como fármaco contra la diabetes mellitus) [262]. El mecanismo de esto ha sido explorado recientemente y se ha visto que la activación de AMPK conduce a la fosforilación de la cadena ligera de la quinesina de la proteína motora de la neurita Kif5, causando una interrupción de su asociación con la fosfatidilinositol-3-kinasa (PI3K). Por lo tanto, PI3K no puede dirigirse a la punta axonal, y la polarización axonal y el crecimiento se inhiben [263]. Es posible que la activación de AMPK también inhiba la axogénesis y la reparación después de un evento isquémico. Se necesitan estudios dirigidos a identificar los efectos más crónicos de la activación de AMPK en la axogénesis en modelos animales de ictus isquémico.

❖ **Estudios *in vivo***

▪ **Activación e inhibición farmacológica de la AMPK**

Por otro lado, el efecto de la manipulación de AMPK *in vivo*, cuando los astrocitos y las neuronas están en estrecha proximidad y cooperan entre ellos, puede diferir. Los estudios *in vivo* utilizando un modelo de oclusión transitoria de la cerebral media (tMCAO) en ratones han demostrado que la activación de AMPK en ratones es perjudicial, al menos cuando el daño es agudo (días después de la isquemia). La administración con AICAR en ratones aumenta la lesión en un modelo de MCAO y la inhibición farmacológica de AMPK usando C75 (que modula los niveles de ATP neuronal) o el compuesto C reduce la lesión [264], demostrando que la inhibición de AMPK es protectora en el ictus isquémico. Estos estudios examinaron la señalización de AMPK después de una isquemia severa y prolongada y una reperusión. Está cada vez más claro que la activación inicial de AMPK es un intento de restaurar la homeostasis en el cerebro isquémico. Sin embargo, después de comenzar la muerte celular, los intentos adicionales de producir ATP en las células metabólicamente dañadas conducen únicamente a un empeoramiento de la herida y a una disfunción metabólica adicional [265]. El tratamiento con metformina durante 3 días (agudo) antes de un ictus isquémico (modelo MCAO) condujo a un aumento de la lesión, a una mayor activación de la AMPK y a una acidosis láctica inducida por el ictus isquémico exagerada [266]. Cabe señalar que la activación farmacológica de AMPK con fármacos puede conducir a efectos secundarios fuera del objetivo [265]. El AICAR, por ejemplo, tiene baja especificidad y baja potencia [267], por lo que también se han llevado a cabo estudios más concluyentes utilizando modelos genéticos, aclarando más el papel de AMPK en el ictus isquémico.

Por otro lado, algunos estudios han sugerido que la activación de AMPK, puede ser beneficiosa durante la lesión isquémica. La activación de AMPK inducida por el ictus isquémico conduce a la fosforilación de la serina 783 en la subunidad R2 del receptor GABA, potenciando la inhibición sináptica lenta mediante la rectificación de los canales de K⁺ hacia el interior. Se ha sugerido que esto provocaría una reducción en el daño excitotóxico que condujo a una mayor supervivencia neuronal. Cabe señalar que la fosforilación inducida por lesiones de GABA se observó principalmente en la región del hipocampo, que no suele lesionarse con la oclusión de la ACM. Estos resultados dispares deben aclararse con otros estudios [268].

▪ **Modelos de delección genética de AMPK**

El estudio de los modelos de ratón con la subunidad $\alpha 1$ o $\alpha 2$ de AMPK delecionada ha ayudado a entender el papel de AMPK en la isquemia cerebral, aunque estos modelos también tienen limitaciones. Es preciso señalar que un *knockout* completo de la subunidad α es embrionariamente letal [269]. En un modelo de isquemia por MCAO, los ratones *knockout* de

AMPK α 2 tienen menos lesión en comparación con los compañeros de camada de tipo salvaje, mientras que no se observó diferencia en la lesión en ratones *knockout* α 1 [270]. Esta protección isquémica observada en ratones *knockout* AMPK α 2 se ha encontrado también en otros estudios [271, 272]. La administración del compuesto C disminuyó la lesión en ratones de tipo salvaje, pero no en ratones *knockout* α 2, lo que sugiere que los efectos perjudiciales de AMPK en el accidente cerebrovascular están mediados por la subunidad α 2 [270]. Sin embargo, otro grupo ha demostrado un aumento de los volúmenes de infarto en ratones *knockout* α 2 de AMPK en comparación con el tipo salvaje, posiblemente como resultado del uso de una oclusión isquémica más prolongada (120 min de MCAO) [258]. Los estudios que utilizan el activador de AMPK metformina en ratones *knockout* para AMPK, han demostrado la complejidad de la señalización de AMPK. Los efectos deletéreos del tratamiento agudo con metformina se suprimieron en ratones *knockout* para α 2 de AMPK, lo que confirma que la metformina actúa a través de las vías de AMPK. Estos resultados son consistentes con la hipótesis de que la activación de AMPK es perjudicial en el ictus isquémico, pero cuestionan el mecanismo que conduce a sus beneficios para la prevención del ictus isquémico en la clínica. Cuando se cambió la duración del tratamiento de un régimen agudo a crónico (3 semanas antes de la isquemia cerebral), se observó una disminución significativa en la lesión isquémica. Curiosamente, se encontró que el tratamiento crónico con metformina condujo a una disminución significativa de los niveles de pAMPK inducidos por el ictus isquémico, redujo la formación de lactato y mejoró el daño del infarto [266]. Este trabajo sugiere que la duración y la cronificación de la actividad de AMPK (aguda *versus* crónica) son determinantes críticos de los resultados del ictus isquémico.

La hipotermia es neuroprotectora después de la isquemia experimental [273, 274], probablemente reduciendo la demanda metabólica. En un modelo de MCAO en ratones, 6 horas de hipotermia condujeron a una reducción significativa en el volumen de infarto y también a una reducción en pAMPK en el cerebro. El efecto neuroprotector de la hipotermia fue mediado por la reducción de los niveles de pAMPK inducidos por el accidente cerebrovascular, ya que tanto la inhibición farmacológica con compuesto C, como la delección del gen AMPK α 2 no proporcionaron ninguna reducción en la lesión debido a la hipotermia (más allá a la reducción por la pérdida de AMPK solamente). Si la protección inducida por hipotermia fuese mediada por un mecanismo que no incluyera a AMPK, se esperaría un efecto aditivo (protección mejorada). Sin embargo, estos resultados deben ser interpretados con cautela, porque bajo lesiones pequeñas se reduce la posibilidad de observar diferencias significativas en el volumen. Curiosamente, los ratones que recibieron el compuesto C desarrollaron hipotermia de forma espontánea, lo que sugiere que una reducción en el estímulo que señala la demanda metabólica (bajos niveles de pAMPK) conduce a la hipotermia. Esto puede tener relevancia clínica, ya que

Estudio preclínico de la paradoja de la obesidad en la isquemia cerebral:
efecto terapéutico del tratamiento con nicotina

tanto la hipotermia como la inhibición de AMPK disminuyen el metabolismo neuronal, prolongando potencialmente la ventana de tiempo para la terapia de reperfusión [275].

❖ **La AMPK en los diferentes tipos celulares**

En condiciones normales (normoxia y disponibilidad de glucosa) las neuronas utilizan la glucosa como principal sustrato energético a través del metabolismo oxidativo, en lugar de obtener energía de la glucólisis. Mientras tanto, los astrocitos utilizan la glucosa a través de la glucólisis anaeróbica para producir piruvato y lactato, el cual es absorbido por las neuronas para una posterior degradación oxidativa y producción de ATP [276]. Sin embargo, en condiciones de hipoxia e hipoglucemia, el metabolismo oxidativo cesa y se induce la actividad metabólica diferencial en astrocitos y neuronas. Bajo estas condiciones, las neuronas, debido a la degradación proteosomal constante de la fosfofructokinasa 2 (PFK2) y a la baja reserva de glucógeno, son incapaces de regular positivamente la glucólisis y no oxidan eficientemente los ácidos grasos. Los astrocitos tienen más actividad de la enzima PFK2 y almacenan grandes cantidades de glucógeno, por lo que, en condiciones de estrés, tienen una mayor tasa de glucólisis y oxidan más eficientemente ácidos grasos para producir ATP que la neurona [277]. Por eso, parece que los astrocitos (a diferencia de las neuronas) están equipados para mejorar la producción de energía a través de mecanismos de señalización por AMPK (induce glicolisis y oxidación de ácidos grasos) y se cree que la activación de esta vía realza el metabolismo y supervivencia astrocítica proporcionando así un mejor entorno de soporte para las neuronas mediante la potenciación del lactato. La delección de la AMPK α 2 astrocítica, de forma específica, es deletérea tras un ictus isquémico, conduciendo a un aumento del edema y del volumen de infarto, así como a peores resultados conductuales y de transformación hemorrágica. Esto sugiere que la AMPK astrocítica puede proteger al cerebro de la lesión isquémica, quedando pendiente el estudio de la delección específica en neuronas [278].

En las células endoteliales, la hipoxia también conduce a la activación de AMPK [279], pero, en contraste con lo que se observa en neuronas, la activación de AMPK es protectora en las células endoteliales. Esto puede ser debido un aumento de la eNOS y la vasodilatación aguda [280]. La activación de AMPK también se requiere específicamente para la migración y diferenciación de células endoteliales en condiciones de hipoxia [279]. La angiogénesis después del ictus isquémico es necesaria para la reparación y recuperación, por lo que hay que tener en cuenta que el momento de administración de los inhibidores de AMPK (neuroprotectores en modelos animales) es crítico, ya que debe mantenerse la reparación tras el ictus isquémico [281].

❖ La AMPK en el precondicionamiento

El precondicionamiento isquémico es un fenómeno por el cual la exposición a un breve estímulo de isquemia conduce a la protección del organismo de un próximo daño isquémico grave [286]. *In vitro*, se ha visto que el precondicionamiento isquémico por la exposición a glutamato (lesión excitotóxica) condujo a la activación y translocación de AMPK a la membrana plasmática, con la consecuente activación y translocación del transportador de glucosa 3 (GLUT 3) [287] y la hiperpolarización del potencial de membrana mitocondrial [288]. *In vivo*, algunos estudios demostraron que el precondicionamiento isquémico (inducido por una breve isquemia de 3 min 72 h antes de la isquemia cerebral) conduce a la neuroprotección, de forma paralela a la inhibición significativa de la pAMPK. La activación farmacológica de AMPK con metformina eliminó los efectos neuroprotectores del precondicionamiento y los ratones *knockout* de AMPK α 2 no mostraron respuesta al precondicionamiento. Sin embargo, la coadministración de un inhibidor de AMPK al precondicionamiento, no supuso una protección adicional [271].

❖ La AMPK en la apoptosis

Se hace evidente que breves períodos de activación de AMPK mejoran la supervivencia neuronal, mientras que la activación sostenida de AMPK induce la muerte celular.

El efecto proapoptótico de la AMPK se ha demostrado en diferentes tipos celulares y a través de diferentes rutas moleculares (**Figura 9**). La primera demostración se ha visto en el hígado de ratas, a través de la activación de la proteína kinasa c-Jun N-terminal (JNK) y la caspasa 3 [289]. Hay otros estudios que relacionan a la activación de AMPK con la activación de p53 seguido de la activación apoptótica [290], la cual también se ha visto que puede ser desencadenada por la inhibición del complejo TORC1 causada por la AMPK [291]. También se ha visto que la inhibición del complejo TORC1 disminuye la translocación de proteínas antiapoptóticas [292].

La activación prolongada de AMPK activa la proteína proapoptótica Bim [293]. Curiosamente, la activación de esta proteína durante la lesión excitotóxica no sólo requiere la desfosforilación y translocación nuclear del factor de transcripción Forkhead FOXO3, sino también una segunda etapa de activación en la que FOXO3 tiene que ser directamente fosforilado por AMPK en el núcleo [294]. Se ha demostrado que FOXO3 promueve la resistencia al estrés oxidativo en *C. elegans* [295]. Por lo tanto, la exposición a corto plazo de AMPK provoca sólo translocación nuclear de FOXO3, precondicionamiento y supervivencia celular. Sin embargo, la actividad prolongada de pAMPK estimula la segunda etapa de activación de FOXO3, dando lugar a la expresión de Bim y a la muerte celular [294, 295].

Estudio preclínico de la paradoja de la obesidad en la isquemia cerebral:
efecto terapéutico del tratamiento con nicotina

Recientemente, se ha propuesto un nuevo mecanismo que explica la apoptosis inducida por AMPK, a través de la ruta del ER stress; se ha visto que el tratamiento con metformina, en la leucemia linfoblástica, lleva a la apoptosis por la activación de la endonucleasa 1 α que requiere inositol (IRE1 α), la proteína homóloga de C/EBP (CHOP), caspasas y JNK [296].

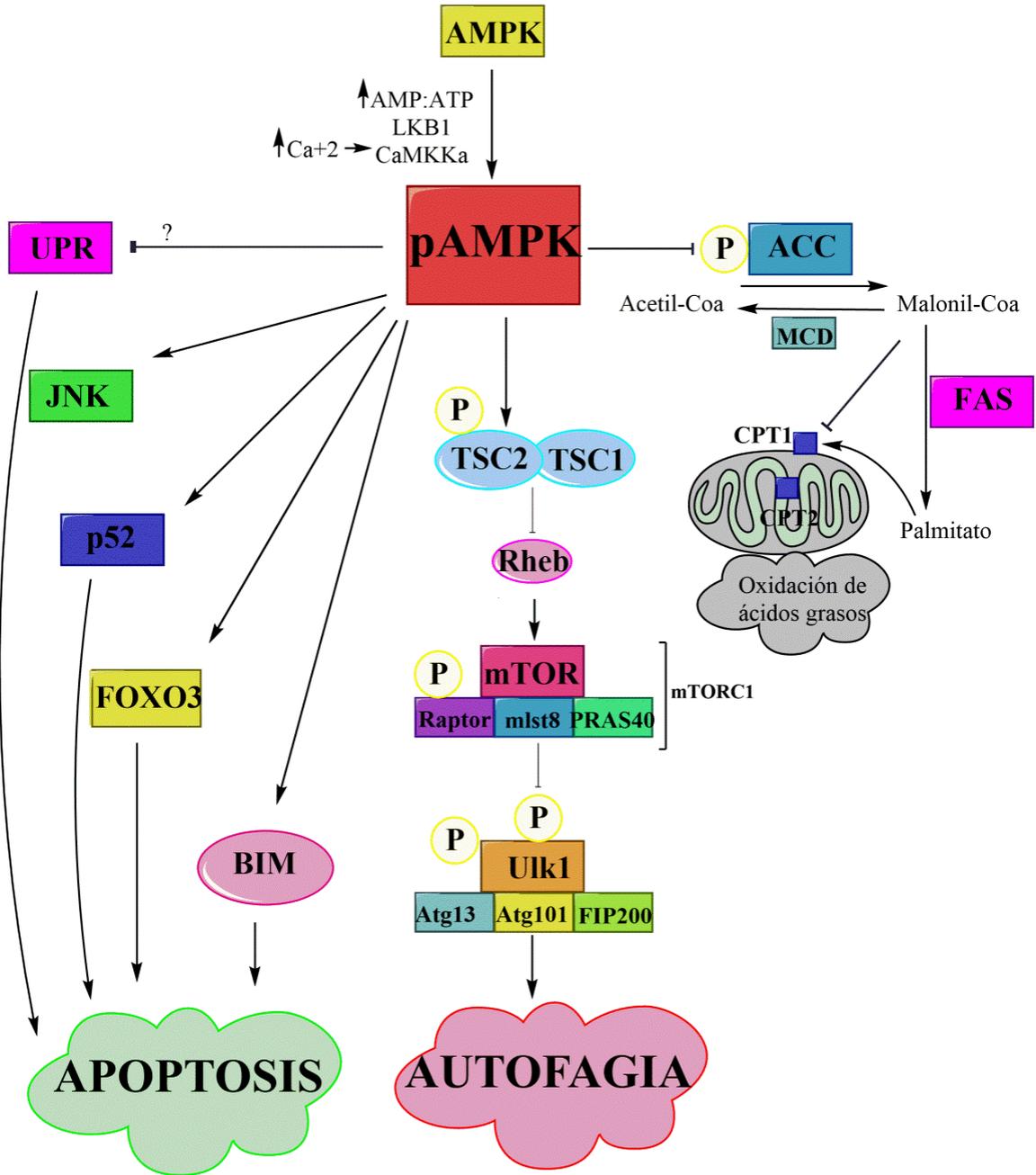


Figura 9. La ruta de la AMPK y su implicación en la supervivencia celular tras el ictus isquémico.

❖ La AMPK en la autofagia

Además de la necrosis y apoptosis, en el cerebro isquémico también se induce la muerte celular llamada autofagia. Este tipo de muerte celular permite que las células produzcan energía durante períodos de inanición de nutrientes a través de la absorción de material citoplasmático y orgánulos y permite el reciclaje de aminoácidos y otros nutrientes. La AMPK induce la autofagia (**Figura 9**) en respuesta a las necesidades energéticas [297, 298] mediante la inactivación del complejo diana de la rapamicina 1 (TORC1) y la fosforilación directa de la kinasa iniciadora de autofagia en mamíferos, Ulk1 [298, 299, 300]. El complejo TORC1 funciona como un sensor de ATP y aminoácidos para equilibrar la disponibilidad de nutrientes y crecimiento celular, por lo que bajo disponibilidad de nutrientes responde fosforilando y activando la kinasa ribosomal S6 de 70 KDa (S6K), llevando a la síntesis proteica [301]. La AMPK fosforila a una de las proteínas que forman parte del complejo TORC1, RAPTOR, en la Ser 722/Ser 792, inhibiendo así dicho complejo [302]. Además, la AMPK activa la tuberina 2 (TSC2) por fosforilación en la Ser 1387, la cual inhibe al complejo TORC1 [302]. Por otro lado, la activación del complejo TORC1 lleva a la inhibición de la autofagia por fosforilación de Ulk1 [298]. La AMPK también fosforila a Ulk1, pero en este caso concretamente en la Ser 555 causando su activación [300].

Se ha demostrado que el agotamiento de la energía en los mutantes de AMPK de *Drosophila* desencadena un aumento de la autofagia que promueve la neurodegeneración [304]. No se conoce si la autofagia estimulada por AMPK ocurre en la isquemia cerebral, por lo que se necesitan futuros estudios para investigar la contribución de la autofagia al daño del infarto después de la isquemia cerebral.

3.4.2. El estrés del retículo endoplasmático

El retículo endoplasmático (ER) es responsable de las modificaciones de plegamiento y postraduccionales de las proteínas. Estos procesos son llevados a cabo por enzimas que están reguladas directa e indirectamente por Ca^{+2} , un ion que en condiciones fisiológicas está en alta concentración en el lumen del ER. Sin embargo, cuando el fallo energético ocurre como consecuencia de la isquemia, las bombas de Ca^{+2} fallan y la concentración intraluminal de Ca cae comprometiendo las funciones del ER, un proceso conocido como *estrés del retículo endoplasmático*, más conocido como ER stress (**Figura 10**). Las proteínas desplegadas se acumulan en el lumen del ER, y la chaperona GRP78 (BiP), se disocia de sus receptores para resolver el problema de desplegamiento y evitar la agregación de proteínas. La disociación de GRP78 de sus receptores en la membrana del ER desencadena una cascada de señalización conocida como *respuesta a proteínas desplegadas* (Unfolded Protein Response, UPR), la cual

Estudio preclínico de la paradoja de la obesidad en la isquemia cerebral:
efecto terapéutico del tratamiento con nicotina

está interrelacionada con muchas rutas de inflamación y con diferente tipo de señalización de estrés, como en el caso de la isquemia [305] o de la obesidad [306]. Estos receptores son la kinasa reticular endoplasmática del tipo ARN, la endonucleasa que requiere inositol 1 y el factor de activación transcripcional 6 (PERK, IRE1 y ATF6 respectivamente) [305, 306]. PERK está principalmente involucrado en la reducción de la síntesis de proteínas globales por medio de la inhibición del factor de iniciación de la traducción eucariótica 2α (eIF2 α), y aumenta la expresión de los genes relacionados con la UPR mediante la activación del factor de transcripción 4 (ATF4). Por otro lado, IRE1 promueve la expresión de chaperonas de plegamiento y proteínas relacionadas con la proteólisis mediante la activación del factor de transcripción XBP1 y activa la proteína JNK relacionada con la activación de la apoptosis. El ATF6 se disocia de la membrana del ER, y después de ser activado por proteólisis, actúa regulando los genes relacionados con la UPR, de forma complementaria a IRE1 [307]. Por último, aunque la principal función de la UPR es promover la supervivencia celular, si el ER stress dura, la UPR puede señalar muerte celular por medio de CHOP (en cuya activación desencadena la señalización a partir de los 3 receptores), o JNK, activando finalmente a las caspasas [305].

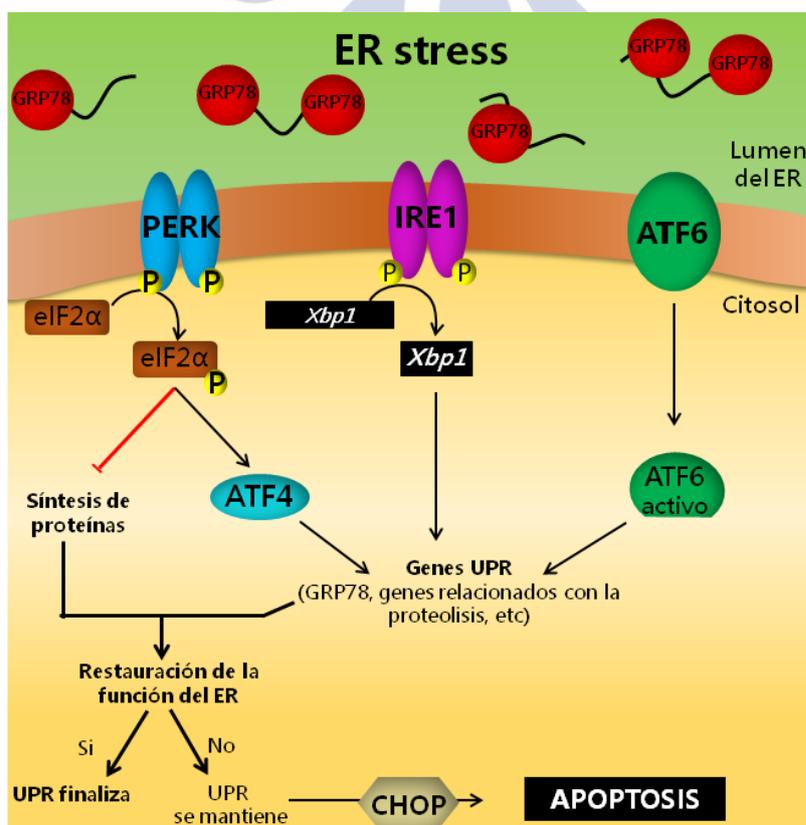


Figura 10. ER stress en la isquemia cerebral. Cuando se mantiene la activación de los receptores de la membrana del retículo endoplasmático PERK, IRE1 y ATF6, debido a la activación de la *respuesta a proteínas desplegadas* (UPR) que ocurre bajo la isquemia cerebral, se activa la apoptosis vía CHOP.

3.5. El tratamiento dual con nicotina de la obesidad y el ictus isquémico

3.5.1. La nicotina

Está muy bien establecido que el hábito de fumar tiene consecuencias negativas en la salud. Sin embargo, el uso del tabaco está creciendo todavía globalmente [308]. La nicotina no es una causa directa de las enfermedades relacionadas con el tabaco, pero es altamente adictiva. La adicción causada por la nicotina desencadena un continuo uso del tabaco (el cual se puede fumar, masticar o esnifar) causando la exposición a diversos carcinógenos y otros compuestos bioactivos del mismo, un hecho que provoca muertes prematuras en los países desarrollados [309]. El tabaco es la única causa prevenible de la muerte por cáncer; la gran mayoría de los fumadores lo quieren dejar, pero debido a la adicción de la nicotina solo un pequeño porcentaje de los mismos son capaces de hacerlo [310]. La medicación con nicotina se usa como terapia de reemplazamiento para poder parar de fumar, aunque también se ha estudiado como terapia experimental en la enfermedad de Parkinson, la enfermedad del Alzheimer y la colitis ulcerosa [311].

La nicotina constituye sobre el 0,6-3% del peso en seco de la planta del tabaco y es un potente repelente e insecticida natural. Es el principal alcaloide del tabaco, de media abarca sobre un 1,5% del peso de un cigarrillo comercial, que supone aproximadamente una media de 10-14 mg de nicotina, de los que se absorben sistémicamente una media de 1-1,5 mg de nicotina. Parte de la nicotina se absorbe a través de la boca hasta que se comienza con la absorción pulmonar llegando al torrente sanguíneo. Tras una bocanada, en 10-20 segundos llegan grandes niveles de nicotina al cerebro produciendo un refuerzo conductual rápido mediante la activación del sistema de recompensa dopaminérgico [312].

La nicotina es un compuesto altamente lipofílico, por lo que, una vez en el cerebro, se une a los receptores nicotínicos de acetilcolina neuronales (nAChRs). Estos representan una familia heterogénea de canales iónicos pentaméricos, los cuales responden al neurotransmisor endógeno acetilcolina (ACh) y a la nicotina exógena, y están envueltos en un gran número de procesos fisiológicos y efectos farmacológicos [313]. La activación de los nAChR excita células diana y media una rápida transmisión sináptica en neuronas ganglionares autónomas y en varias áreas del cerebro. Estos receptores regulan la liberación tanto de neurotransmisores excitatorios como inhibitorios, y como consecuencia, la activación de los nAChRs puede tener efectos de modulación opuestos en el mismo circuito dependiendo en si se expresan en neuronas exitatorias o inhibitorias [314].

3.5.2. Efecto de la nicotina en la obesidad

A pesar del esfuerzo para identificar los mecanismos celulares y moleculares que controlan el equilibrio energético, la búsqueda de objetivos moleculares y tratamientos farmacológicos no ha sido totalmente exitosa y la mayoría de los fármacos aprobados han mostrado efectos secundarios indeseados o baja efectividad después del tratamiento a largo plazo [316]. Además, varios factores que normalmente inducen un balance energético negativo, como la leptina, la insulina y el péptido similar al glucagón 1 (GLP-1), son en gran medida ineficaces en los modelos de obesidad de roedores y en los pacientes obesos [317]. Una estrategia para identificar los mecanismos moleculares involucrados en el control del peso corporal es obtener más conocimiento sobre las sustancias ya usadas comúnmente, con efectos farmacológicos establecidos y propiedades farmacocinéticas.

Los fumadores de todo el mundo suelen tener un aumento del peso corporal después del abandono del hábito de fumar [318], y numerosos estudios controlados en humanos y roedores han informado que la nicotina ejerce efectos potentes sobre la homeostasis energética. De hecho, se ha demostrado que la nicotina disminuye la ingesta de alimentos mediante la modulación de los sistemas de neuropéptidos hipotalámicos. Además, la nicotina afecta al metabolismo periférico. La termogénesis del tejido adiposo marrón (BAT) en ratas se incrementa mediante la nicotina a través de la activación del sistema nervioso simpático y el aumento de la expresión de la proteína desacoplante 1 (UCP-1), hechos mediados por la regulación de la AMPK en el hipotálamo [319]. Además, el tratamiento crónico periférico con nicotina reduce el peso corporal al disminuir la ingesta de alimentos y aumentar la termogénesis del tejido adiposo marrón tanto en ratas con dieta baja en grasa, como con dieta alta en grasa. Este balance energético global negativo se asoció con una disminución de la activación de la AMPK hipotalámica en ambos modelos. Además, la nicotina mejora el perfil lipídico del suero, disminuye los niveles séricos de insulina, al igual que reduce la esteatosis, la inflamación y el ER stress en el hígado de ratas con dieta alta en grasa pero no en el de ratas con dieta baja en grasa. En general, esto sugiere que la nicotina disminuye el peso corporal y mejora los trastornos metabólicos vinculados a la dieta alta en grasa, por lo que, puede ofrecer una estrategia clara para desarrollar nuevos enfoques terapéuticos contra la obesidad y sus complicaciones metabólicas [320].

3.5.3. Efecto de la nicotina en el ictus isquémico

3.5.3.1. La paradoja del tabaquismo en pacientes con ictus isquémico

El tabaco es un factor de riesgo bien establecido para la aterosclerosis prematura [321], infarto de miocardio [322] e ictus [323]. Al igual que lo que se ha visto en el infarto de

miocardio agudo, se espera que el tabaquismo incremente el riesgo de muerte y eventos cardiovasculares en pacientes con ictus [324, 325]. Sin embargo, numerosos estudios muestran resultados contradictorios al respecto. Algún estudio habla de que sólo los ex fumadores presentan peores resultados [326], otros no encuentran una asociación entre el tabaquismo en el momento del ictus y los resultados a largo plazo [327] y otros hablan de que los pacientes que fuman en el momento del ictus o que han fumado antes tienen mayor riesgo de muerte o de un evento vascular recurrente en comparación con los pacientes que nunca han fumado o son ex fumadores [328].

Por otro lado, otros estudios han demostrado que los fumadores con infarto de miocardio tienen menores tasas de mortalidad después de la trombolisis que los no fumadores [329, 330]. Pero también son muchos los estudios en los que se ha cuestionado la denominada *paradoja del tabaquismo*, atribuyéndole el efecto a los bajos perfiles de riesgo clínico de estos pacientes [331]. Por otra parte, los estudios de imagen han demostrado una perfusión miocárdica mejorada después de la trombolisis en fumadores a pesar del ajuste por edad y otras comorbilidades, ofreciendo una explicación alternativa [330]. La mejora de la reperfusión tisular en los fumadores puede explicarse por el incremento de un mecanismo causal. El tPA es un factor fibrinolítico liberado del endotelio para prevenir la formación de trombos intravasculares; el tabaquismo impide la liberación endógena de tPA y hace que los niveles circulantes de fibrinógeno aumenten [332]. Algunos estudios han demostrado que la exposición al humo del cigarrillo altera la dinámica del coágulo y la composición del trombo, haciendo que la sangre se vuelva hipercoagulable [333]. Se ha sugerido que el riesgo aumentado de enfermedad isquémica cardíaca asociada con el tabaquismo está mediado en gran medida por el aumento de las concentraciones intraarteriales de fibrina. Aunque esto puede predisponer a los fumadores a la oclusión temprana de los vasos, el trombo rico en fibrina en los fumadores puede ser más susceptible al tratamiento fibrinolítico [334]. Así, el tPA puede actuar más específicamente en los fumadores, lo que contrarresta los efectos adversos de este factor de riesgo fisiopatológico.

En el ictus isquémico agudo, los pacientes fumadores tratados con rtPA intravenoso presentan mejores resultados para dicho tratamiento trombolítico. Un estudio reciente habla de que los fumadores en el momento del ictus presentan mayores tasas de recanalización en las primeras 24 h tras el inicio de los síntomas en comparación con los no fumadores. Además se ve que el tabaquismo está asociado de forma independiente con la recanalización y la reperfusión, indicando que la terapia trombolítica actúa de forma más efectiva en fumadores [335]. Las razones para esta asociación no se entienden completamente, y las evidencias contradictorias de los estudios previos con rtPA intravenoso, dificultan la visión del efecto potencialmente beneficioso [336, 337]. En un estudio más reciente vieron que la administración intraarterial de

Estudio preclínico de la paradoja de la obesidad en la isquemia cerebral:
efecto terapéutico del tratamiento con nicotina

rtPA fue más eficaz logrando la completa recanalización arterial tanto en fumadores en el momento del ictus como en ex fumadores [338]. La caracterización de la fisiopatología de la *paradoja del tabaquismo* puede conducir a la identificación de una población de pacientes con una respuesta favorable a la terapia con rtPA, aunque este hecho no debe ser malinterpretado y no debe utilizarse para promover el tabaquismo. No hay que olvidar los numerosos estudios que indican que el tabaquismo sigue siendo un factor de riesgo indiscutible para padecer una enfermedad cardiovascular, incluyendo un ictus isquémico [323].

3.5.3.2. Efecto de la nicotina en modelos animales de isquemia cerebral

Como ya se ha comentado, está ampliamente aceptado que el tabaquismo está altamente correlacionado con la incidencia de ictus isquémico [323], sin embargo, la administración aguda de nicotina, uno de los principales constituyentes del tabaco, ha demostrado protección contra la neurotoxicidad *in vitro*, concretamente, previniendo la neurotoxicidad del glutamato a través de los nAChRs $\alpha 4$ y $\alpha 7$ y de la vía PI3K-Akt que inhibe la apoptosis [339].

Desde hace años, se han visto algunas evidencias epidemiológicas que demuestran que la nicotina tiene, hasta cierto punto, un efecto preventivo en los trastornos neurodegenerativos como el Parkinson y el Alzheimer [340]. Además, se ha descubierto que la administración exógena de nicotina ejerce efectos beneficiosos en estos trastornos [341, 313]. Dichos efectos favorables de la nicotina se han explicado por el incremento de factores tróficos, liberación de diferentes neurotransmisores y mejora de la plasticidad cerebral [313]. Incluso se ha observado un mejor rendimiento cognitivo en Parkinson tras la exposición a la nicotina durante un período corto [342]. También se ha visto que los fármacos que modifican los receptores nicotínicos de acetilcolina neuronales, ampliamente distribuidos por todo el cerebro, pueden tener efectos en el tratamiento de varios trastornos neurológicos y neurodegenerativos. En enfermedades como el Alzheimer, el Parkinson, el Síndrome de Down y el autismo se ha descrito una disminución de los receptores nicotínicos [343].

En el ictus isquémico, además de las evidencias neuroprotectoras de la nicotina *in vitro*, algunos estudios preclínicos *in vivo*, han demostrado que la nicotina tiene un efecto beneficioso sobre la recuperación tras un ictus [344, 345]. Aunque también hay estudios que hablan de un efecto nocivo tras la isquemia [346], se ha visto que la nicotina promueve el crecimiento dendrítico en regiones corticales motoras acompañado de una mejora en el comportamiento de los animales [344]. También se ha visto que el pretratamiento con nicotina mejora los resultados de lesión isquémica tras la tMCAO, a través de la activación del sistema endocannabinoide [345]. La activación de los receptores nAChR también ha obtenido resultados positivos en el ictus; se ha visto que la activación del nAChR $\alpha 7$ en un modelo de hemorragia subaracnoidea de rata [347] y en un modelo de hemorragia intracerebral de ratón [348] redujo la lesión cerebral.

Además, la modulación alosterica de este receptor reduce la lesión cerebral y mejora la función neurológica después de la isquemia cerebral focal transitoria en ratas [349]. Aunque estos artículos atribuyen la neuroprotección del receptor $\alpha 7$ a su efecto prosupervivencia [348, 349, 350], también hay muchos trabajos que hablan de la influencia de los receptores nicotínicos, y de la nicotina, por tanto, sobre la inflamación tras un ictus, en base a la conocida implicación del receptor nicotínico $\alpha 7$ en la inflamación [350]. En un modelo de isquemia cerebral permanente se ha visto que su activación reduce la neuroinflamación (potencia el estado M2 de la microglía/macrófagos, antiinflamatorio) y el estrés oxidativo, acompañados de menor apoptosis y mejores resultados en los test de comportamiento [351]. En otro estudio de isquemia cerebral global transitoria, se ha visto como la nicotina, a través del receptor nAChR $\alpha 7$ de la microglía, tiene un papel antiinflamatorio y neuroprotector tras el daño cerebral [352].





INTRODUCCIÓN
HIPÓTESIS
OBJETIVO
MATERIALES Y MÉTODOS
RESULTADOS
DISCUSIÓN
CONCLUSIONES





HIPÓTESIS

En la presente tesis se establecen dos grandes hipótesis:

1. La obesidad se asocia a menor volumen de lesión y mejor recuperación funcional en un modelo animal de isquemia cerebral.
2. Por otra parte, la nicotina podría ejercer un efector neuprotector en la isquemia cerebral debido a su función inhibidora de la AMPK, ruta molecular involucrada en el daño cerebral tras el ictus isquémico. Igualmente, la inhibición de AMPK ocasionaría un balance energético negativo en la obesidad.





INTRODUCCIÓN

HIPÓTESIS

OBJETIVOS

MATERIALES Y MÉTODOS

RESULTADOS

DISCUSIÓN

CONCLUSIONES





OBJETIVOS

El presente estudio tiene 2 objetivos principales, con sus correspondientes objetivos específicos.

1. Entender la fisiopatología y el mecanismo molecular que subyace de la paradoja de la obesidad, con la finalidad de identificar nuevas dianas moleculares que puedan ser empleadas para mejorar el pronóstico del ictus isquémico, más allá de la población obesa.
 - Evaluar el efecto paradójico de la obesidad en el modelo animal de isquemia cerebral por oclusión transitoria de la arteria cerebral media.
 - Identificar nuevas dianas moleculares, a través del estudio de rutas de señalización celular, asociadas al efecto paradójico de la obesidad en la isquemia cerebral.
2. Evaluar el efecto neuroprotector de la nicotina en el ictus isquémico a través de la ruta de la AMPK.
 - Evaluar el efecto neuroprotector de la nicotina en el modelo animal de isquemia cerebral por oclusión transitoria de la arteria cerebral media.
 - Identificar nuevas dianas terapéuticas mediante el estudio del efecto de la nicotina sobre la ruta de la AMPK en la isquemia cerebral.



INTRODUCCIÓN
HIPÓTESIS
OBJETIVOS
MATERIALES Y MÉTODOS
RESULTADOS
DISCUSIÓN
CONCLUSIONES





MATERIALES Y MÉTODOS

4. Modelo preclínico

4.1. Manejo de animales

Todos los procedimientos experimentales y protocolos de manipulación de animales llevados a cabo durante la realización de esta tesis han sido aprobados previamente por el jefe del servicio provincial de ganadería del departamento territorial de la Consellería do Medio Rural e do Mar de la provincia de A Coruña, siendo responsable el Prof. Dr. Miguel Antonio López Pérez. Los experimentos se realizaron bajo el número de procedimiento: ID 15010/14/006 (cumpliendo el actual y vigente RD 53/2013 del 1 de febrero, por el que se establecen las normas básicas aplicables para la protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia), de acuerdo con la legislación vigente; Ley 30/1992 del 26 de noviembre del régimen jurídico de las administraciones públicas y del procedimiento administrativo común, modificada por la Ley 4/1999, del 14 de enero, por la que se establece que la resolución que proponga fin al procedimiento decidirá todas las cuestiones expuestas por los interesados y aquellas otras derivadas de este; el Decreto 296/2008, del 30 de diciembre, de protección de los animales utilizados para la experimentación y otros fines científicos, incluida la docencia, y por el que se crea el “Registro de centros de cría” de suministradores y usuarios y la “Comisión Galega de Bienestar de los Animales de Experimentación”; orden del 15 de septiembre de 2006 por la que se crea el “Comité de Bioética da Consellería Rural”; Decreto 153/1998, del 2 de abril, por el que se aprueba el reglamento que desarrolla la Ley 1/1993 del 13 de abril (protección de animales domésticos y salvajes en cautividad); Ley 32/2007, del 7 de noviembre, para el cuidado de los animales en su explotación, transporte y sacrificio; siguiendo también la Directiva Europea de Experimentación Animal (2010/63/UE).

Se utilizaron ratas macho comunes (*Rattus Norvegicus*) de la cepa *Sprague-Dawley* suministrados por el Animalario General de la Universidad de Santiago de Compostela, con una masa corporal de unos 50 gramos aproximadamente (unas 4 semanas, recién destetadas).

Los animales fueron estabulados en condiciones estables de temperatura ($21\pm 2^{\circ}\text{C}$), con ciclos de luz-oscuridad de 12 horas y con un período de aclimatación a las instalaciones de unos 7 días aproximadamente, previo a cualquier procedimiento.

Los animales fueron mantenidos en condiciones de acceso libre a agua y comida.

La estabulación de los animales fue colectiva teniendo en cuenta el comportamiento social de estos animales. Luego, una vez realizado el procedimiento para desarrollar el modelo de isquemia cerebral, se estabularon individualmente. Se trató de valorar su correcto aspecto físico

Estudio preclínico de la paradoja de la obesidad en la isquemia cerebral:
efecto terapéutico del tratamiento con nicotina

y acostumbrarlos al manejo por el personal de laboratorio para reducir en todo lo posible el estrés generado durante los experimentos llevados a cabo.

El procedimiento de cirugía y el seguimiento de la lesión isquémica mediante resonancia magnética se realizan bajo anestesia por sevoflurano (6% para la inducción y 4% para el mantenimiento, en una mezcla de gases de 70% NO₂ y 30% O₂). Mientras, la temperatura corporal de los animales se controla, manteniendo la temperatura rectal a 37±0.5°C con una manta eléctrica controlada con termostato (NeoBiotec, Spain).

4.2. Modelo de obesidad inducida por dieta

En este estudio existen dos grupos principales de animales en función de la dieta que se les suministra durante 12 semanas antes de generar el modelo de isquemia cerebral y durante el seguimiento de los animales tras la misma:

➤ **El grupo control, con dieta estándar** (STD; 3,1% de grasas, 2,791 Kcal/g, Scientific Animal Food & Engineering, Nantes, France). Composición en **Tabla 2**.

➤ **El grupo de obesidad inducida por dieta, con dieta alta en grasa** (HFD; 45% de grasas, 4,73 Kcal/g, Research Diets, New Brunswick, NJ). Composición en **Tabla 2**.

Composición (%)	STD	HFD
Grasas	3,1	45
Hidratos de carbono	59,9	35
Proteínas	16,1	20

Tabla 2. Composición de la dieta estándar (STD) y alta en grasa (HFD).

Para la evaluación del modelo de obesidad inducida por dieta se realizó un seguimiento periódico del peso de la masa corporal y la ingesta de todos los animales, con el uso de una balanza de precisión. Todos los animales parten de un peso similar, en torno a los 50 gramos (tienen aproximadamente 4 semanas y están recién destetados de la madre). Durante 12 semanas, previas a la isquemia cerebral, los animales y su comida fueron pesados semanalmente, y la ingesta se promedió en función del número de individuos de cada caja. Tras la isquemia cerebral, la masa corporal e ingesta se registran diariamente, siempre más o menos a la misma hora (en el ciclo de luz, a las 9:00). Una vez sacrificados los animales, se pesa la grasa blanca y parda de los mismos.

4.3. Modelo de isquemia focal transitoria

Se induce una isquemia focal transitoria (60 minutos) por la oclusión intraluminal transitoria de la arteria cerebral media (ACM), tMCA, siguiendo el método descrito por Longa et al. (**Figura 11**) [110]. De forma resumida, bajo un microscopio de cirugía, se realiza una incisión en la línea media del cuello, exponiendo el sistema carotideo. La arteria carótida común (ACC) derecha y la ramificación externa de la ACC (ACE) se ligan permanentemente, mientras la ramificación interna de la ACC (ACI) se liga provisionalmente, todas ellas con suturas de seda de 6-0. Se utiliza una sutura comercial con una cabeza recubierta de caucho de silicona (Doccol, USA) de 450-490 μm de diámetro y 2,3-5,6 mm de largo para introducir a través de la ACE y la ACI mediante la eliminación temporal de la ligación de la ACI. Se tiene que situar la sutura en el origen de la ACM, bloqueando el flujo cerebral. Durante el período de oclusión, la arteria carótida común izquierda se liga provisionalmente, permitiendo que se reduzca el flujo cerebral sanguíneo global y se incremente la reproducibilidad de la lesión. Durante la cirugía, el flujo cerebral sanguíneo se monitoriza con el sistema de láser Doppler Periflux 5000 (Perimed AB, Sweden) situando la sonda doppler (modelo 411, Perimed AB, Sweden) en la superficie del hueso parietal cerca de la cresta sagital, bajo el músculo temporal (la zona irrigada por la ACM).

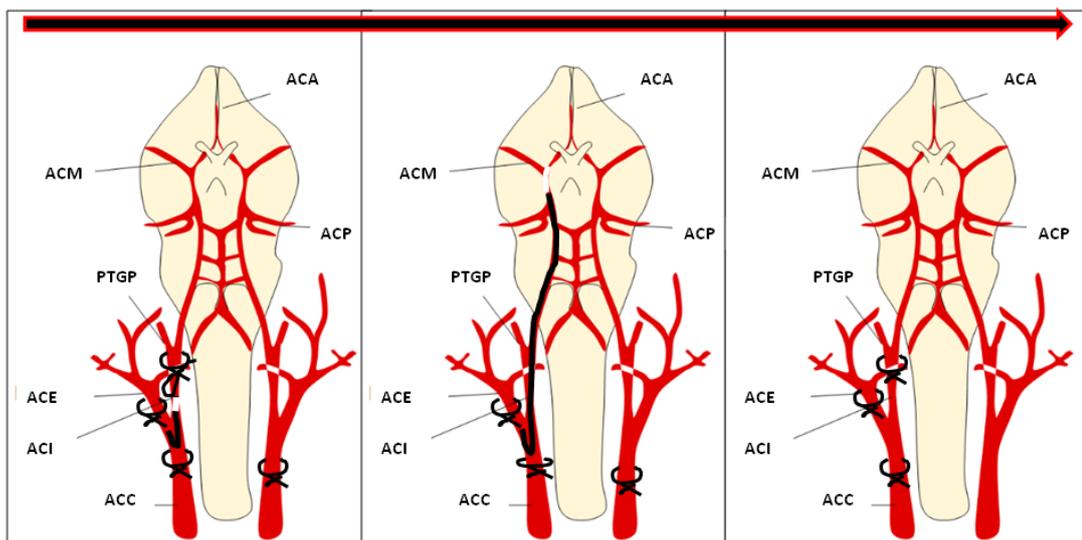


Figura 11. Esquema de la tMCAO

Una vez que la ACM está ocluida, hecho que se determina por la reducción de la señal del doppler, los animales se trasladan rápidamente desde el puesto de cirugía hasta el aparato de resonancia magnética (RM), con el objetivo de determinar la lesión isquémica basal por los mapas del coeficiente de difusión. También se realiza una imagen de angiografía para confirmar que la ACM sigue ocluida mientras se lleva a cabo el estudio de RM y descartar malformaciones en los vasos. Tras el análisis basal por RM, los animales vuelven al puesto de

Estudio preclínico de la paradoja de la obesidad en la isquemia cerebral:
efecto terapéutico del tratamiento con nicotina

cirugía y se les vuelve a poner la sonda doppler. La reperfusión se lleva a cabo 1 hora después de la oclusión, mediante la retirada de la sutura que ocluye la ACM siguiendo el recorrido por las arterias de forma inversa.

4.4. Criterios de inclusión

Para garantizar los criterios de homogeneidad de los grupos de estudio antes de los tratamientos, se usaron los siguientes criterios de inclusión:

- Cirugía correctamente completada.
- Una reducción relativa del flujo cerebral sanguíneo mayor del 70%, medido con el laser doppler cuando se ocluye la ACM (**Figura 12**).

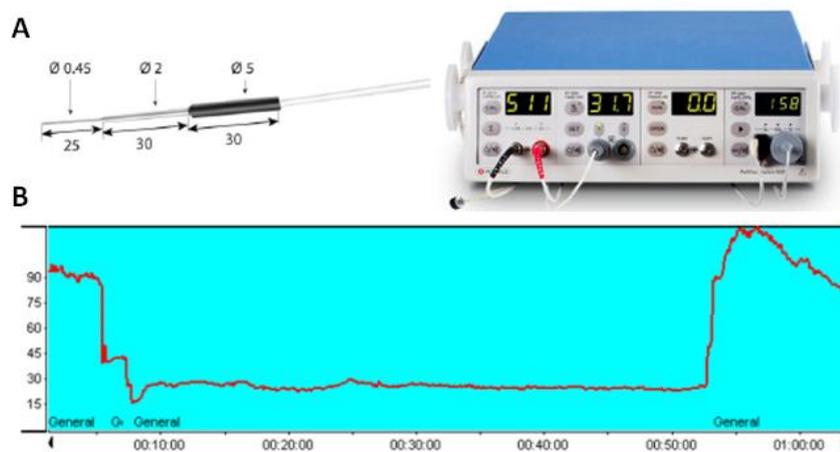


Figura 12. Registro doppler durante la oclusión de la arteria cerebral media. A - Sonda doppler. B – Representación gráfica del registro doppler. Se representa la caída del flujo sanguíneo durante la oclusión de la ACM y su posterior subida durante la reperfusión.

- Ausencia de malformaciones arteriales en la angiografía por RM (**Figura 13**).
- Arteria cerebral anterior no ocluida por el filamento introducido, detectando su flujo en la angiografía por RM (**Figura 13A**).
- Volumen basal entre 30-45% respecto al hemisferio ipsilateral, medido en los mapas del coeficiente de difusión (**Figura 13B**).
- Tratamiento correctamente completado

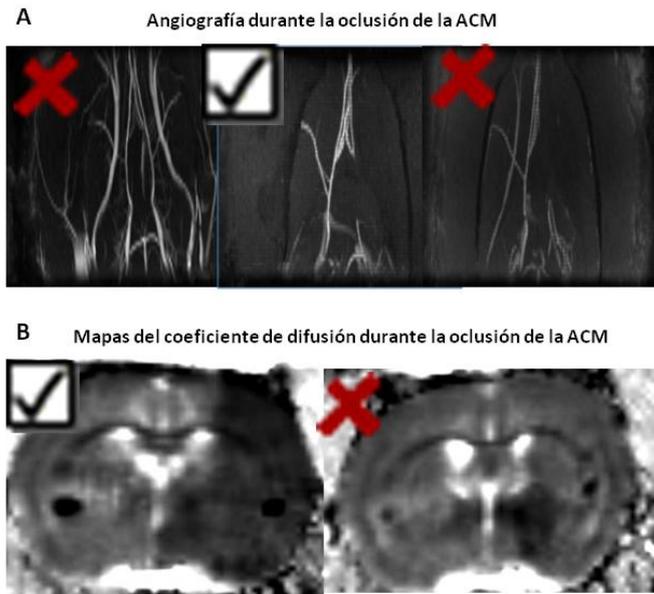


Figura 13. Resonancia durante la oclusión de la ACM. A – Angiografía. B – Mapas del coeficiente de difusión.

4.5. Aleatorización de los grupos

Dentro de cada grupo de estudio con diferente dieta, los animales que cumplen los criterios de inclusión son aleatorizados en los grupos de tratamiento mediante números aleatorios generados por un ordenador. Así, en cada grupo de dieta hay 3 subgrupos de animales en función del tratamiento administrado:

- **El grupo vehículo**, tratado con salino.
- **El grupo nicotina**, tratado con nicotina.
- **El grupo nicotina + AICAR**, tratado con nicotina y AICAR.

4.6. Diseño experimental

Se han llevado a cabo dos diseños experimentales para desarrollar el trabajo.

- **Seguimiento de los animales durante 28 días.**

Tras la tMCAO y la evaluación basal de los animales, se estudia la lesión isquémica por resonancia magnética, al igual que la recuperación funcional y el déficit motor y sensorial, a lo largo de 28 días hasta su sacrificio, de la forma indicada en la **Figura 14**. Desde 1 hora después de la reperfusión, se administra el tratamiento de nicotina o el vehículo, según el grupo al que corresponda. Esto se realiza para ambos grupos de dieta, STD y HFD.

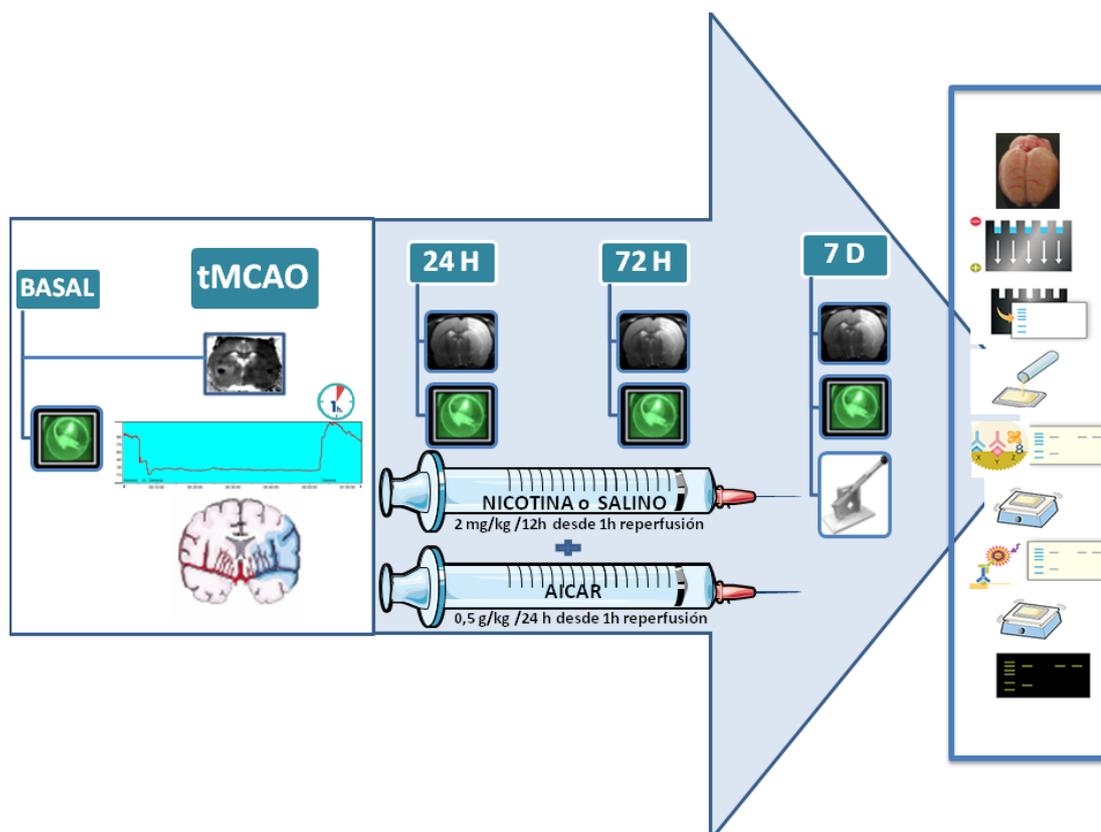


Figura 15. Protocolo de estudio con un período de seguimiento de 7 días tras la tMCAO.

5. Procedimientos para el seguimiento de los animales

5.1. Administración de tratamientos

Todos los tratamientos realizados en este estudio se realizan bajo una administración subcutánea. Este tipo de administración no requiere anestesia y se realiza por la zona lateral dorso-caudal del animal, por encima de la pata posterior. Se inmoviliza el animal con la ayuda de un trapo cubriéndole la cabeza, se pellizca el lomo del animal con la misma mano; con la otra mano se introduce la aguja, paralelamente a la columna vertebral. Este procedimiento puede ser llevado a cabo durante varios días seguidos.

El tratamiento con nicotina (Nicotine tartrate salt, MP Biomedicals, USA) se lleva a cabo en una dosis de 2 mg/kg cada 12 horas [319, 320] desde 1 hora tras la repercusión hasta el sacrificio de los animales (dependiendo del experimento, a los 28 o 7 días), y en un volumen total de 100 μ l (en salino), igual que el tratamiento con vehículo (salino).

El tratamiento con AICAR (5-aminoimidazol-4-carboxamida-1- β -D-ribofuranosido, TRC Inc., Canadá) se lleva a cabo en una dosis de 0.5 g/kg [264] cada 24 horas desde 1 hora tras la repercusión hasta los 7 días que se sacrifican los animales, y en un volumen total de 4 ml (en

agua). Este tratamiento sólo se realiza a 7 días porque, ante sus efectos secundarios, es lo recomendable en la bibliografía [264].

5.2. Estudios por resonancia magnética

5.2.1. Equipo de resonancia

Los estudios de imagen por resonancia magnética (MRI) se realizan en un imán de diámetro horizontal de 9,4 T (Bruker BioSpin, Alemania) con antenas de gradiente blindadas de 20 cm de ancho (440 mT/m). La transmisión de radiofrecuencia se lleva a cabo por un resonador de volumen de tipo jaula; se detecta la señal usando una antena de superficie de cuatro elementos colocada sobre la cabeza del animal, el cual se fija con una barra que sujeta los dientes, unos palos que sujetan los oídos y cinta adhesiva. Se realizaron exploraciones piloto de eco de gradiente al comienzo de cada sesión de adquisición de imágenes, para un posicionamiento preciso del animal dentro del hueco del imán.

5.2.2. Protocolo de neuroimagen por resonancia magnética

5.2.2.1. Angiografía por resonancia magnética

La angiografía por resonancia magnética (MRA) se utiliza para identificar el polígono de Willis y para evaluar el flujo sanguíneo relativo durante la tMCA. Las imágenes axiales de MRA del cerebro de rata son 58 cortes apilados que mapean todo el cerebro. Los parámetros utilizados para la secuencia Flash 3D TOF de MRA fueron: FOV 30,72 x 30,72 x 14 mm³, matriz de imagen 256 x 256 x 58 (en resolución plana 120 mm/píxel x 120 mm/píxel x 240 mm/píxel), tiempo de repetición 15 ms, 2 promedios y tiempo de eco 2,4 ms.

5.2.2.2. Imágenes de difusión y mapas de coeficiente de difusión aparente

Con el fin de evaluar la extensión y localización de la región hipoperfundida del cerebro durante la oclusión, se realizan imágenes de difusión (DWI) en la resonancia magnética. Es importante señalar que en la práctica clínica la región del infarto de las imágenes de difusión en resonancia magnética se muestra como una señal hiperintensa, mientras que en las imágenes preclínicas es normalmente una señal hipointensa. Esto se debe a que las imágenes clínicas por resonancia magnética presentan la imagen para el valor “b” más alto de la secuencia (DWI) mientras que las imágenes preclínicas son normalmente mapas del coeficiente de difusión aparente (ADC), resultado del ajuste de todos los valores “b” a un decaimiento exponencial. Atendiendo a estos mapas, la tMCAO está afectando al territorio de la ACM donde se puede observar una reducción del flujo sanguíneo cerebral en la corteza y estriado (oscuro en escala de

grises). Durante la tMCAO, los mapas de coeficiente de difusión aparente se obtienen utilizando secuencias de imagen spin-eco eco-planar con los parámetros de adquisición: FOV 24 x 16 mm², matriz de imagen 96 x 64 (en resolución plana 200 mm/pixel x 200 mm/pixel), 14 intervalos consecutivos de 1 mm de grosos, tiempo de repetición 4 s, 4 promedios, tiempo de eco 26,91 ms, ancho de banda espectral 200.000 Hz y 7 valores de difusión b: 0; 300; 600; 900; 1200; 1600 y 2000. Las imágenes de difusión fueron adquiridas durante la oclusión de la ACM, de forma basal.

5.2.2.3. Secuencia T2

Con el fin de evaluar el modelo de obesidad inducida por dieta y la eficacia de los tratamientos estudiados en este trabajo, se obtuvieron imágenes con peso T2 por resonancia magnética y se calcularon mapas T2 para cuantificar el volumen de infarto a lo largo del tiempo. La imágenes con peso T2 se obtuvieron utilizando una secuencia spin-eco “multieco” y “multislides” con los siguientes parámetros de adquisición: FOV 19,2 x 19,2 mm², matriz de imagen 192 x 192 (resolución isotrópica en el plano de 100 μm /pixel x 100 μm/pixel), 14 cortes consecutivos de 1 mm de espesor, tiempo de repetición de 3 s y 16 ecos con 9 ms de tiempo de eco. Las imágenes con peso T2 fueron adquiridas en diferentes momentos (24 y 72 horas y 7, 14 y 28 días) tras la isquemia.

5.2.3. Análisis de las imágenes de resonancia magnética

Todas las imágenes fueron procesadas usando ImageJ (Rasband WS, ImageJ, NIH, <http://rsb.info.nih.gov/ij>). Los volúmenes de infarto se determinaron a partir de mapas de ADC y mapas T2 seleccionando manualmente las áreas de valores ADC reducidos o de señal T2 hiperintensa. La suma de las áreas de los 14 cortes axiales del cerebro que son del grosor de 1 mm, nos aporta el resultado de volumen en mm³ (**Figura 15**).

La formación de edema se determinó mediante la cuantificación de la desviación de la línea media del cerebro, representada como la relación entre el volumen del hemisferio ipsilateral (donde está la lesión isquémica) y el contralateral. Se calculó el volumen de lesión en mm³ como el volumen de lesión en mm³ / Edema. El volumen de lesión en % del hemisferio ipsilateral se calculó como: [(volumen de la lesión en mm³ / Edema) / volumen del hemisferio ipsilateral en mm³] x 100.

Estudio preclínico de la paradoja de la obesidad en la isquemia cerebral:
efecto terapéutico del tratamiento con nicotina

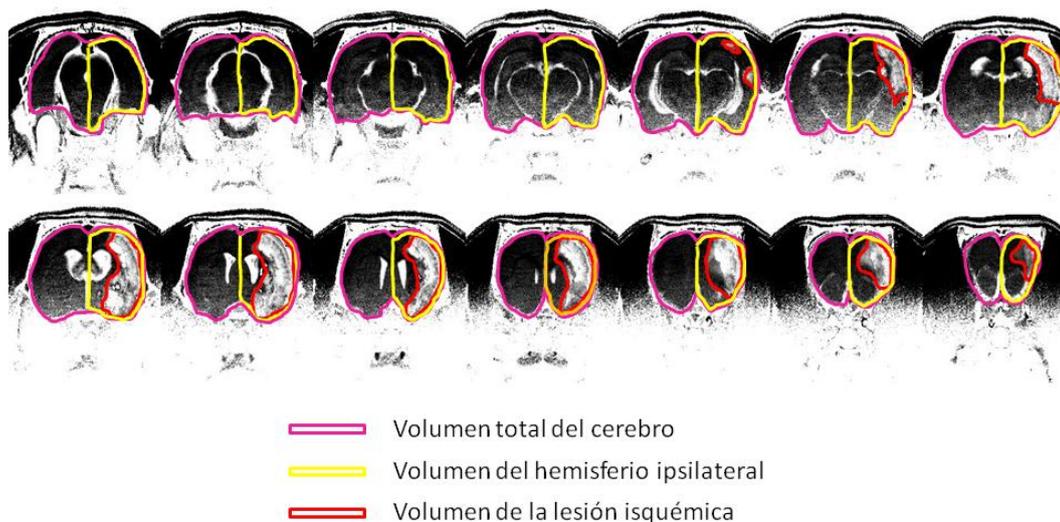


Figura 16. Medición del volumen de lesión en las imágenes de resonancia magnética. En las imágenes de RM se obtienen 14 cortes de 1 mm de grosor, por lo que la suma del área de estos 14 cortes nos aporta el resultado de volumen. Se mide el volumen total, el del hemisferio ipsilateral y el de la lesión para poder calcular el edema y el % de lesión respecto al hemisferio ipsilateral.

5.3. Evaluación funcional y del déficit motor y sensorial

Para la evaluación de la recuperación funcional se realizó el test funcional del Cilindro [353] y la evaluación del déficit motor y sensorial mediante la escala de Bederson antes de la tMCAO (basal), a las 24 y 72 horas y a los 7, 14 y 28 días. La examinación funcional y del déficit motor y sensorial se realiza siempre en el período de actividad de los animales (las primeras 6h del ciclo de oscuridad).

El test del Cilindro está diseñado para evaluar la asimetría locomotora en modelos de roedores con trastornos del SNC. En esta prueba, mientras el animal se mueve dentro de un cilindro de plástico transparente de 20 x 30 cm, se registra la actividad de sus extremidades anteriores durante 10 minutos con una cámara de video de infrarrojos (Sony, Japón). El uso de las extremidades anteriores se define por la colocación de toda la palma en la pared del cilindro, lo que indica su uso para el soporte del cuerpo. Se apuntan 10 contactos de las extremidades anteriores para cada animal registrados durante la grabación, anotando cuántos de ellos son con la derecha o con la izquierda (**Figura 17**). Con esto se observa la lateralidad de los animales, es decir cuánto más usan una extremidad que otra. Tras el modelo de tMCAO hay una hemiparesia izquierda causada por la lesión isquémica en el hemisferio derecho, por lo que se usa más la extremidad derecha. El índice de lateralidad se calcula como el número de contactos con la extremidad izquierda respecto al total de contactos (está cerca de 0,5 en animales sanos y tiende a 0 en animales isquémicos ya que tienen una preferencia de uso de la extremidad derecha).



Figura 17. Imagen representativa de la exploración de una rata en el test del cilindro.

La escala de Bederson se utiliza para ver la recuperación del déficit motor y sensorial, evaluando diferentes ítems (**Tabla 3**) que reflejan el déficit motor y sensorial causado por la lesión isquémica en uno de los hemisferios cerebrales. Tras la realización de los diferentes ítems por parte de los animales, se obtiene una puntuación final de la escala en base a las puntuaciones de los mismos. La escala de Bederson [353] va desde 0 (asintomático) hasta 8 (déficit grave).

	Puntuación normal	Déficit
Nivel de actividad	0 muy alto; 1 alto	2 bajo; 3 muy bajo
Movimiento circular espontáneo	0	1
Flexión espontánea de la extremidad parética	0	1
Giro al levantar el animal por la cola	0	1
Incapacidad de extensión de la extremidad parética al suspender el animal por la cola	0	1
Detección de bordes con la extremidad parética	0	1
TOTAL	0	8

Tabla 2. Evaluación del déficit motor y sensorial mediante la escala de Bederson. En cada ítem estudiado se otorga un punto ante la incapacidad de realizar la tarea, salvo el nivel de actividad que se puntúa como: 0; muy alto, 1; alto, 2; bajo y 3; muy bajo.

5.4. Sacrificio, disección y extracción de tejidos

Al término de cada procedimiento experimental se sacrificaron los animales por luxación cervical y decapitación posterior según las normas y leyes de experimentación animal. Se extrajeron los tejidos (cerebro, grasa blanca subcutánea y epididimal, grasa parda, hígado y músculo) y se conservaron a -80°C hasta su procesamiento y análisis. La grasa blanca subcutánea y epididimal, así como la grasa parda, se pesan antes de su congelado.

6. Análisis molecular de proteínas en el hemisferio ipsilateral

6.1. Extracción de proteína

En primer lugar se separó la porción del cerebro de interés para el estudio, y el resto de la muestra se volvió a congelar a -80°C . Concretamente, empleando una matriz se extrajo un corte axial de 2 mm de grosor del hemisferio ipsilateral correspondiente a la zona media de la lesión isquémica (**Figura 18**).

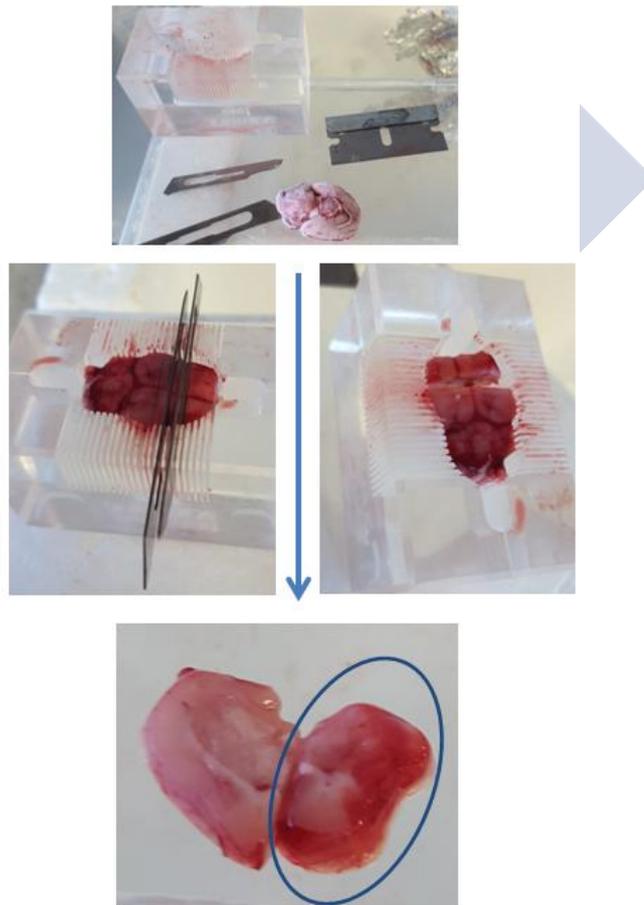


Figura 18. Extracción de un corte axial de la zona isquémica en el hemisferio ipsilateral para la extracción de proteína.

Luego, durante todo el proceso de extracción, las muestras estuvieron refrigeradas a 0°C para evitar la degradación de las proteínas. En un tubo eppendorf de 2 ml con cierre de seguridad (Safe-Lock Tubes 2.0 ml, Eppendorf, Hamburgo, Alemania) se le añadió un volumen de 1 ml de tampón de lisis (Composición del tampón de lisis: 2,5 ml Tris-HCl pH 7,5; 2,5 ml EGTA 0,2 M pH8; 2,5 ml EDTA 0,2 M pH8; 5ml Triton X-100; 5 ml Ortavanadato Sódico 0,1 M, 1 g Fluoruro Sódico; 1,1 g Pirofosfato Sódico; 46 g Sacarosa; H₂O hasta 500 ml y ajustar pH a 7,5) con inhibidor de proteasas (Complete TM, Roche, Mannheim, Alemania). Las muestras se homogeneizaron por un proceso de disgregación y rotura celular mecánica mediante un homogeneizador (TissueLyser II, Qiagen, Germantown, MD, USA) durante 2-3 min con una frecuencia de unos 30 Hz. Posteriormente, se centrifugaron durante 30 minutos a 13.200 rpm y a 4°C. Se retiró el sobrenadante en otra alícuota y se congeló a -80°C, hasta el momento de su análisis.

6.2. Cuantificación de proteína

Para determinar la concentración de proteína en las alícuotas obtenidas en la extracción, mantenidas a 4°C en hielo, se utilizó el método colorimétrico de Bradford, utilizando el kit *Bio-Rad Protein Assay* (Protein Assay Dye Reagent, Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Para ello, se procedió a diluir cada muestra por un factor de 1:26 en H₂O destilada dentro de tubos eppendorfs. En una placa de 96 pocillos, se cargaron por duplicado 10 µl de cada muestra, y posteriormente se añadieron 250 µl de reactivo de Bradford diluido en proporción 1:4 en H₂O destilada y a una temperatura de 37°C. Además, en cada placa se realizó una recta de calibrado, mediante una dilución seriada de BSA (Albumin bovine fraction V powder, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) con 7 puntos duplicados, (0,03125; 0,0625; 0,125; 0,125; 0,25; 0,5; 0,7 y 1 mg/ml). Luego en un lector de placas (Multiskan Go Microplate Spectrophotometer, Thermo Scientific, Rockford, IL, USA) se incubó la placa durante 5 min a 37° y se midió la colorimetría en OD (optical density) en cada pocillo a una longitud de onda de $\lambda=595\text{nm}$. A través de la extrapolación de los valores de la recta de calibrado se determinó la concentración de proteína de cada muestra. Una vez determinada la cantidad de proteína de cada muestra se prepararon alícuotas a la concentración necesaria para cada análisis (20 µg/14 µl en cada pocillo para un gel).

6.3. Western blot

6.3.1. Preparación de las muestras

Las proteínas son separadas mediante electroforesis desnaturalizante en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE, Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrilamide Gel Electroforesis). Al

Estudio preclínico de la paradoja de la obesidad en la isquemia cerebral: efecto terapéutico del tratamiento con nicotina

tratarse de una técnica que se basa en la separación de proteínas por su masa molecular, en base a su migración en un campo eléctrico, es necesario neutralizar una serie de características de las proteínas que darían lugar a patrones de migración erróneos e identificaciones incorrectas. Por un lado, es necesario eliminar la estructura cuaternaria de la proteína para poder reproducir una migración en el gel lo más proporcional posible a su tamaño. Y por otro lado, dado que las proteínas van a estar sometidas a un campo eléctrico, es necesario eliminar la carga intrínseca de los polipéptidos, (desnaturalizarlos) y otorgarles el mismo signo de carga. Para ello, se preparó una alícuota de cada muestra, con la misma concentración de proteína total (20 µg/14 µl en cada pocillo para un gel) en tampón de lisis con inhibidor de proteasas. A cada muestra además se le añadió la misma proporción de solución de carga 5x. Este tampón de carga proporciona a la alícuota la eliminación de la estructura cuaternaria de la proteína (β -mercaptoetanol, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), uniformiza su carga eléctrica de forma proporcional a su longitud (SDS, Sodium DodecylSulfate, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) y le da una densidad mayor (Glicerol, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA). Todo esto facilita su carga en el gel y además tiene un colorante para identificar el frente de migración (azul de bromofenol, MERK, Darmstadt, Alemania).

6.3.2. Electroforesis

La electroforesis se realizó en un gel que tiene una estructura tridimensional, en forma de red, formada por la polimerización de acrilamida y bis-acrilamida (N,N-metilenobisacrilamida). El proceso de polimerización se cataliza por amonio persulfato (APS) (Ammonium persulfate, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) y TEMED (N,N,N,N-tetramethyletilenediamina, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA). La concentración de acrilamida y bis-acrilamida (30% Acrylamide/Bis Solution 29:1, Bio-Rad, Hercules, CA, USA) en el gel determina el tamaño de los poros de la red tridimensional y el grado de migración de las proteínas según su tamaño. El gel consiste de dos fracciones, una fracción concentradora con 4% de acrilamida/bis-acrilamida, en la que se agrupan las muestras a cargar, de manera que la separación de las proteínas de las diferentes muestras ocurra de forma simultánea, y una fracción separadora con 6%, 8% y 10% en función del tamaño de la proteína de interés (Composición gel concentrador 4%: H₂O destilada 3,4 ml; Acrilamida/bisacrilamida (30%) 0,83 ml; 1,5M Tris (pH 8,8) 0,63 ml; SDS 10% 50 µl; APS 10 % 50 µl; TEMED 5 µl). También se emplearon geles SDS-PAGE comerciales con la fracción separadora del 7,5 o 10% (Criterion™ TGX™ Precast Midi Protein Gel, BioRad, USA) con 24 pocillos, para poder cargar un mayor número de grupos. Los geles se montaron en un kit de electroforesis (Mini-PROTEAN Tetra Cell, Bio-Rad, Hercules, CA,

USA) y se sumergieron en tampón running 1x (Composición del tampón de running 5X: 72 g de Glicina, 15 g de Trizma base, 5 g de SDS, H₂O destilada hasta 1L).

Previamente a la carga de las muestras en el gel se agitaron y se calentaron a 95° C durante 10 minutos para la desnaturalización de las proteínas y se volvieron a agitar. En cada pocillo del gel se cargaron 14 µl de muestra. En uno de los carriles se cargaron 5 µl de un marcador de pesos moleculares (Precision Plus Protein Standards-Dual Color, Bio-Rad, Hercules, CA, USA). En cada gel se cargaron siempre muestras de todos los grupos experimentales.

Una vez esto, se sometieron las muestras a un campo eléctrico (voltaje constante de 140 V-120 V y amperaje de 180 mA durante 1 h en los geles sintetizados, y voltaje constante de 200 V durante 40 min en los geles comerciales), conectando el kit de electroforesis a una fuente de energía (PowerPac HC High Current Power Supply, Bio-Rad, Hercules, CA, USA), en el que se indujo la migración de las proteínas hacia el cátodo. Se detuvo la electroforesis cuando el frente de migración llegó a una distancia aproximada de unos 0,5 cm del final del gel.

6.3.3. Transferencia

Una vez finalizada la electroforesis las proteínas deben ser transferidas a una membrana para poder realizar el análisis de expresión de cada proteína; para ellos son sometidas a un campo eléctrico capaz de movilizar las proteínas hasta la membrana donde quedarán adsorbidas y donde se realizarán las incubaciones con los diferentes anticuerpos. Se realizó una transferencia de tipo semi-seca, donde la membrana y el gel se sitúan uno debajo del otro separados por papeles absorbentes de las placas que crean el voltaje (Trans-Blot Semy-Dry Transfer Cell, Bio-Rad). Se utilizaron membranas de PVDF (Polivinylidene Fluoride Immobilion-P membrane, Millipore), cortadas con unas dimensiones de 8,5 x 6,5 cm en los geles sintetizados y 14 x 7 cm en los geles comerciales, activadas previamente durante 5 min en metanol, 5 min en H₂O destilada y 5 min en tampón de transferencia. Composición del tampón de transferencia 25X: 36,5 g de Glicina, 72,5 g de Trizma base, 4,5 g de SDS, H₂O destilada hasta 500 ml. Composición del tampón de transferencia 1X: 40 ml de tampón de transferencia 25X, 200 ml de Metanol, H₂O destilada hasta 1L.

El papel de transferencia (Extra Thick Blot Paper, Bio-Rad) se empapó en tampón de transferencia para que a través de él pudiera crearse el campo eléctrico necesario para la transferencia; el gel y la membrana se colocaron entre dos piezas de papel de transferencia de manera que así se creó un campo eléctrico necesario para la correcta transferencia; se eliminaron las posibles burbujas que podían quedar entre esta, el papel y el gel con un rodillo. Se realizó la transferencia durante 1 h y 40 min a un voltaje constante de 250 V conectando el kit de electroforesis a una fuente de energía (PowerPac HC High Current Power Supply, Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Para comprobar la correcta transferencia se tiñeron las membranas

Estudio preclínico de la paradoja de la obesidad en la isquemia cerebral:
efecto terapéutico del tratamiento con nicotina

con colorante Rojo de Ponceau (Ponceau S Red, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA). Para eliminar la tinción fue suficiente con hacer un par de lavados con tampón de lavado. Componentes tampón de lavado 10X: 24,2 g de Trizma base, 80 g DE NaCl, H₂O destilada hasta 1 L; ajustar pH a 7,6. Componentes tampón de lavado 1X: 100 ml de tampón de lavado 10X, 1 ml de Tween 20, H₂O destilada hasta 1 L.

6.3.4. Inmunodetección de proteínas

Tras la transferencia, la membrana se incubó a temperatura ambiente durante 1 h con tampón de bloqueo (Componentes del tampón de bloqueo: 3 g BSA en 100 ml de tampón de lavado). De esta manera se eliminaron las uniones inespecíficas ofrecidas por la membrana en todas aquellas áreas donde no existía proteína transferida. Posteriormente, se cortó la membrana tomando como referencia el marcador de pesos moleculares, de manera que, pudiéramos detectar en una misma membrana proteínas diferentes, de esta forma se pudieron detectar diferentes proteínas simultáneamente. Cada fragmento de membrana se incubó durante 1 h a temperatura ambiente o bien toda la noche a 4°C con el anticuerpo primario diluido previamente en el tampón de bloqueo (las condiciones específicas de los diferentes anticuerpos empleados están en la **Tabla 4**).

Transcurrido el tiempo de incubación con el anticuerpo primario, se retiró y se hicieron 3 lavados de 5 min con tampón de lavado a temperatura ambiente. Seguidamente se incubaron las membranas durante 1 hora a temperatura ambiente con un anticuerpo secundario (anti-mouse o anti-rabbit dependiendo del anticuerpo primario, para que pueda reconocer y unirse específicamente al mismo) conjugado con la *Horseradish Peroxidase* (Dako, Produktionsvej 42, Dinamarca), una enzima que reacciona ante el luminol (o sus derivados) emitiendo luz.

Anticuerpo Primario	Casa comercial	Dilución
ACC α	Millipore; Billerica, MA, USA	1:1000
pACC	CellSignaling; Danvers,MA,USA	1:1000
AMPK α 1	Millipore; Billerica, MA, USA	1:1000
AMPK α 2	Upstate; Temecula, CA, USA	1:1000
pAMPK	Cell Signaling; Danvers,MA,USA	1:2000
FAS	BD, Franklin Lakes, NJ, USA	1:1000
pmTOR	Cell Signaling; Danvers,MA,USA	1:1000
pS6K	Cell Signaling; Danvers,MA,USA	1:1000
pRAPTOR	Cell Signaling; Danvers,MA,USA	1:1000
pTSC2	Cell Signaling; Danvers,MA,USA	1:1000
pUlk1 (Ser 555)	Cell Signaling; Danvers,MA,USA	1:1000
GRP78 (BiP)	Cell Signaling; Danvers,MA,USA	1:1000
ATF6 α	SCBT; Dallas, Texas, USA	1:1000
pPERK	SCBT; Dallas, Texas, USA	1:1000
peIF2 α	SCBT; Dallas, Texas, USA	1:1000
CHOP	SCBT; Dallas, Texas, USA	1:1000
pIRE1 α	Abcam; Cambridge, UK	1:1000
p-SAPK/JNK	Cell Signaling; Danvers,MA,USA	1:2000
Caspasa 3	Cell Signaling; Danvers,MA,USA	1:1000
Cleaved Caspasa 3	Cell Signaling; Danvers,MA,USA	1:1000
β -actina	SIGMA; St. Louis, MO, USA	1:5000

Tabla 4. Anticuerpos empleados en el estudio por western blot. Se representa la casa comercial a la que pertenece y la dilución realizada con el tampón de dilución.

6.3.5. Revelado y fijación de la señal

Se retira el anticuerpo secundario y se vuelven a hacer tres lavados; para proceder al revelado de la membrana se utilizó 1 ml de un sustrato de revelado que detecta el *Horseradish Peroxidase* en proporción 1:1 (Pierce ECL Western Blotting Substrate, Cultiak). Se incuban las membranas durante 2 min en oscuridad con este sustrato. Una vez pasado el tiempo de incubación se colocaron las membranas en una casete de revelado (Hypercassette, Amersham Biosciences, Little Chalfont, Reino Unido) y se impermeabilizaron con la ayuda de papel transparente.

Se procedió a su revelado en una sala oscura destinada a tal fin. Se introdujo una hoja de revelado (FujiMedical X-Ray Film Super RX, Fujifilm Corporation, Tokio, Japón) sobre las

Estudio preclínico de la paradoja de la obesidad en la isquemia cerebral: efecto terapéutico del tratamiento con nicotina

membranas y se cerró el casete; se dejó exponer la señal quimioluminiscente durante unos segundos o minutos en función de la proteína. Luego se retiró la película y se sumergió en una solución reveladora (dilución 1:10) (G150, Developer/Replenisher, Agfa-Gevaert Group, Dubendorf, Suiza) hasta que se visualiza la señal buscada y en ese momento se sumerge la película en líquido fijador (dilución 1:5) (G354, Manual Fixing Bath, Agfa-Gevaert Group, Dubendorf, Suiza) durante un par de minutos con el fin de fijar la señal. Por último se lava la película con agua corriente y se deja secar.

6.3.6. Cuantificación

La cuantificación de la señal se realizó mediante la medición de la densidad óptica de la señal de cada muestra, a partir de las imágenes escaneadas en resolución 400 ppp (CanonScan 9900F, Canon, Tokio, Japón) de las películas autorradiografiadas, con el software informático ImageJ (ImageJ 1.40g, Wayne Rasband, NIH, USA). Cada medición de densidad óptica se corrigió por la medición de la densidad óptica de una región adyacente a la señal de las muestras.

7. Análisis estadístico

Los datos obtenidos en todos los experimentos se analizaron mediante los softwares estadísticos IBM SPSS Statistics for Windows version 20.0 (IBM Corp., Armonk, NY, USA) y GraphPad Instad (GraphPad Instad Software, v5, La Jolla, CA, USA). Se ha comprobado la distribución de los datos mediante el test estadístico Kolmogorov Smirnov. Ante una distribución normal de los datos, el grado de significación estadística se determinó por el test estadístico t-Student para la comparación entre 2 grupos y el análisis estadístico ANOVA seguido del test estadístico post-hoc Bonferroni para la comparación entre más de 2 grupos. Los resultados se representaron como la media y la desviación estándar de la media (SEM) ($\text{media} \pm \text{SEM}$). Se consideraron significativos todos los resultados con una $p < 0,05$; muy significativos con una $p < 0,01$ y extremadamente significativos con $p < 0,001$.





INTRODUCCIÓN
HIPÓTESIS
OBJETIVOS
MATERIALES Y MÉTODOS
RESULTADOS
DISCUSIÓN
CONCLUSIONES





RESULTADOS

8. Animales incluidos en el estudio

En el presente trabajo se han utilizado un total de 184 animales, clasificados en 94 con dieta estándar (**Figura 19**) y 90 con dieta alta en grasa (**Figura 18**). Siguiendo los criterios de inclusión del estudio, dentro de los animales con STD, el 8% (N=7) de los animales se ha excluido por su muerte durante la cirugía necesaria para la oclusión transitoria de la ACM, el 1% debido a una caída del flujo cerebral sanguíneo en el registro doppler menor del 70%, el 38% (N=35) se excluyen por los criterios de neuroimagen a través del estudio de resonancia que se realiza durante la oclusión de la ACM, por lo que se incluyeron un total de 51 animales (54%). Dentro de la exclusión por la resonancia magnética, 14 animales son excluidos por la oclusión de la ACA, 19 por un volumen de difusión fuera del rango establecido como criterio de inclusión y 2 por algún defecto en sus arterias observado en la angiografía. Del total de animales incluidos, mueren 6 durante el período de seguimiento, por lo que un total de 45 animales concluyeron el periodo de estudio dentro del grupo de dieta estándar (**Figura**).

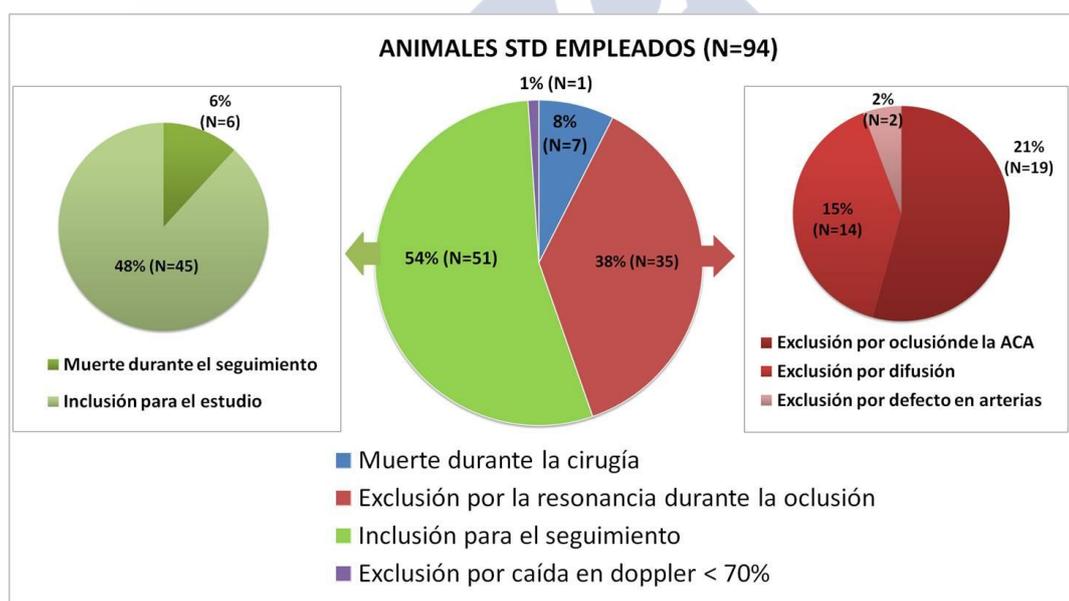


Figura 19. Animales con dieta estándar incluidos en el estudio y criterios de inclusión. Del total de 94 animales empleados, son 45 los animales incluidos para el estudio cumpliendo con los criterios de inclusión establecidos; una reducción relativa del flujo cerebral sanguíneo medida con el laser doppler mayor del 70%, ausencia de malformaciones arteriales determinadas con la imagen de angiografía por RM, volumen basal entre 30-45% respecto al hemisferio ipsilateral medido en los mapas de coeficiente de difusión, la ACA no ocluida y cirugía o tratamiento correctamente completados.

Estudio preclínico de la paradoja de la obesidad en la isquemia cerebral: efecto terapéutico del tratamiento con nicotina

Estos 45 animales incluidos en el estudio fueron aleatorizados en los diferentes grupos de estudio de la siguiente forma:

- Grupo vehículo seguido durante 28 días: N=10
- Grupo nicotina seguido durante 28 días: N=10
- Grupo vehículo seguido durante 7 días: N=8
- Grupo nicotina seguido durante 7 días: N=9
- Grupo nicotina + AICAR seguido durante 7 días: N=8

En el caso de los animales HFD, el 2% (N=2) de los animales se ha excluido por su muerte durante la cirugía, el 43% (N=39) se excluyeron por el estudio de neuroimagen por resonancia que se realiza durante la oclusión de la ACM, por lo que finalmente son incluidos un total de 49 animales (55%). Dentro de la exclusión por la resonancia magnética, 7 animales son excluidos por la oclusión de la ACA, 30 por un volumen de difusión fuera del rango establecido como criterio de inclusión y 2 por algún defecto en sus arterias observado en la angiografía. De los 49 animales incluidos para ser seguidos, mueren 7 durante el período de seguimiento y se incluyen finalmente 42 animales en el estudio con animales de dieta alta en grasa (**Figura 20**).

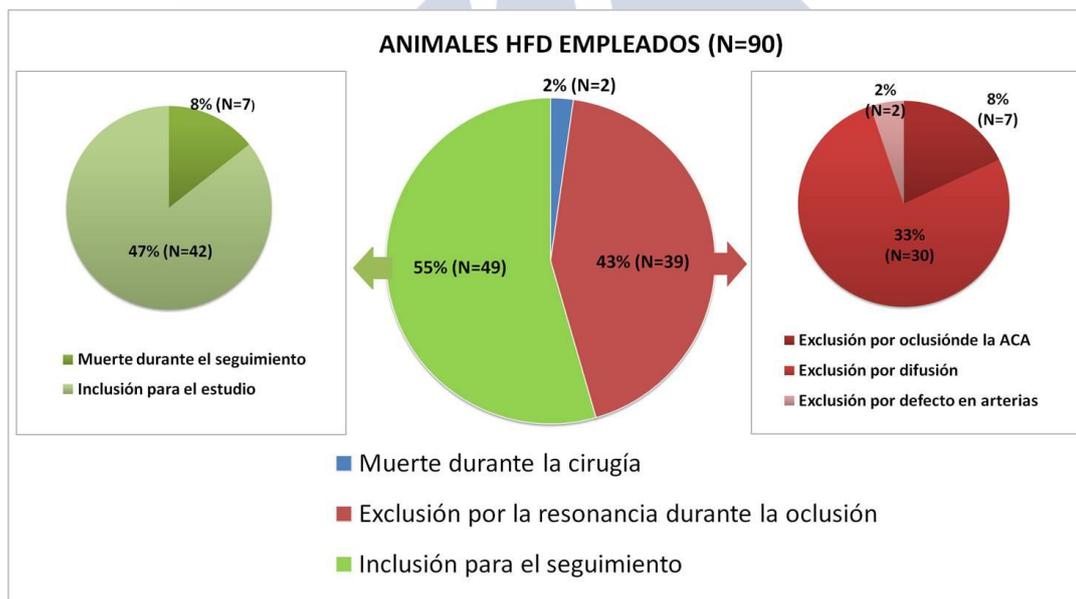


Figura 20. Animales con dieta alta en grasa incluidos en el estudio y criterios de inclusión. Del total de 90 animales empleados, son 42 los animales incluidos para el estudio cumpliendo con los criterios de inclusión establecidos; una reducción relativa del flujo cerebral sanguíneo medida con el laser doppler mayor del 70%, ausencia de malformaciones arteriales determinadas con la imagen de angiografía por RM, volumen basal entre 30-45% respecto al hemisferio ipsilateral medido en los mapas de coeficiente de difusión, la ACA no ocluida y cirugía o tratamiento correctamente completados.

Estos 42 animales incluidos en el estudio fueron aleatorizados en los diferentes grupos de estudio de la siguiente forma:

- Grupo vehículo seguido durante 28 días: N=8
- Grupo nicotina seguido durante 28 días: N=8
- Grupo vehículo seguido durante 7 días: N=9
- Grupo nicotina seguido durante 7 días: N=9
- Grupo nicotina + AICAR seguido durante 7 días: N=8

9. Efecto de la obesidad en el modelo animal de isquemia cerebral

9.1. Evaluación del modelo de obesidad inducida por dieta

Se ha generado el modelo de obesidad inducida por dieta mediante el suministro de una dieta alta en grasa (HFD) con el 45% de las calorías aportadas a partir de grasa, suponiendo un aporte calórico de 4,73 kcal/g, durante las 12 semanas previas a la tMCAO. Como control se usa un grupo de animales alimentados durante el mismo tiempo con dieta estándar (STD), con un aporte calórico de 2,79 kcal/g. La influencia de la dieta alta en grasa en el modelo de obesidad inducida por dieta, se refleja en una diferencia de los valores de su peso corporal, ingesta y grasa blanca corporal respecto al grupo alimentado con dieta estándar.

Antes de comenzar las 12 semanas de dieta, todos los animales parten de un peso corporal homogéneo, en torno a los 50 gramos, ya que todos tienen 4 semanas y están recién destetados de la madre. Sin embargo, tras el suministro de las diferentes dietas, el incremento de peso corporal es diferente entre los dos grupos (HFD y STD), siendo significativamente mayor para el grupo HFD ya desde la primera semana (**Figura 21A**). A medida que avanzan las 12 semanas, la diferencia se va haciendo más clara y el peso corporal en el momento de la tMCA es significativamente mayor en el caso del grupo HFD respecto al STD (**Figura 21B**); $461,81 \pm 11,50$ g frente a $411,55 \pm 8,80$ g, $p < 0,001$.

Se observa que la ingesta del grupo HFD es significativamente menor que la del grupo STD a lo largo de las 12 semanas de dieta (**Figura 21C**), un hecho coherente con el elevado aporte calórico de la dieta alta en grasa. Y este aporte es tal que, aún con menor ingesta, el consumo calórico semanal es significativamente mayor en el grupo HFD (**Figura 21D**); $469,53 \pm 19,45$ Kcal frente a $394,28 \pm 12,73$ Kcal, $p < 0001$, en concordancia con el mayor incremento de peso corporal de este grupo.

Estudio preclínico de la paradoja de la obesidad en la isquemia cerebral:
efecto terapéutico del tratamiento con nicotina

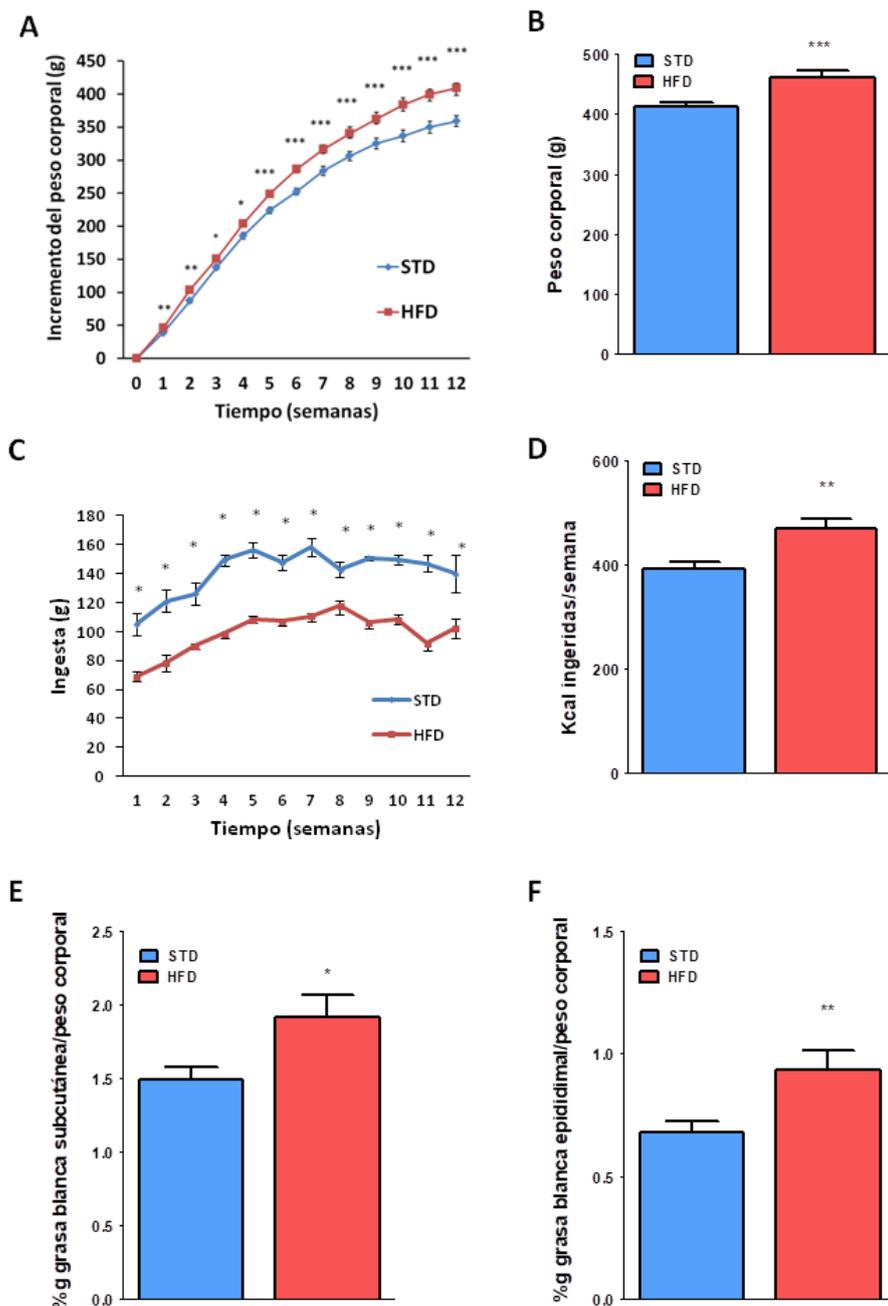


Figura 21. Evaluación del modelo de obesidad inducida por dieta. **A** - Incremento del peso corporal en los grupos HFD o STD a lo largo de las 12 semanas, expresado como los gramos incrementados respecto al peso basal. **B** - Peso corporal en el momento de la tMCAO en ambos grupos de dieta, expresado en gramos. **C** - Ingesta de la dieta HFD o STD a lo largo de 12 semanas, en gramos de comida consumida. **D** - Kcal consumidas por semana en ambos grupos de dieta. **E** - Peso de la grasa blanca subcutánea en ambos grupos de dieta, expresado como % de gramos de grasa respecto a los gramos de peso corporal. **F** - Peso de la grasa blanca epididimal en ambos grupos de dieta, expresado como % de gramos de grasa respecto a los gramos de peso corporal. Los datos se muestran como la media \pm SEM. * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$ respecto al grupo STD; empleando el test estadístico t-Student (N=20 para el grupo STD y N=16 para el grupo HFD en el incremento de peso, peso en la tMCAO, ingesta y Kcal/semana, N=10 y N=8, respectivamente, para las grasas blancas)

Se ha pesado la grasa blanca (subcutánea y epididimal) y la grasa parda, una vez sacrificados los animales. De acuerdo con el mayor incremento de peso corporal en el grupo HFD, se ha visto que, tanto la grasa blanca subcutánea como la epididimal, tienen un peso significativamente mayor en el grupo HFD respecto al STD (**Figura 21E, 21F**); $1,96 \pm 0,151\%$ frente a $1,487 \pm 0,089\%$ de grasa respecto el peso corporal y $0,962 \pm 0,08\%$ frente a $0,682 \pm 0,043\%$ de grasa respecto el peso corporal, respectivamente, mientras que no se observan diferencias estadísticamente significativas para la grasa parda. En este caso no se tienen en cuenta los animales de cada grupo que tras la tMCAO han sido tratados, ya que dicho tratamiento puede tener un efecto sobre el peso de las grasas.

9.2. Influencia de la obesidad en el volumen de la lesión isquémica

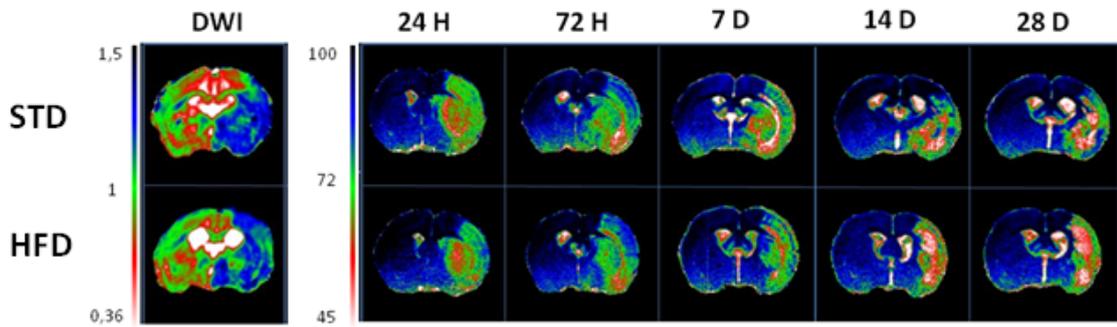
El seguimiento mediante imágenes de resonancia magnética para la evaluación de los volúmenes de lesión se ha realizado de forma basal, a las 24 y 72 horas, y a los 7,14 y 28 días tras la isquemia, tanto en el grupo STD como HFD. En este caso, para comparar los resultados entre el modelo de obesidad inducida por dieta y el grupo con dieta estándar, se emplean los grupos de ambas dietas tratados con vehículo (salino).

De acuerdo con nuestros criterios de inclusión, el volumen de lesión basal de cada animal, determinado mediante mapas ADC, está entre el 30-45% del hemisferio ipsilateral: $38,07 \pm 1,20\%$ en el grupo STD vehículo y $37,33 \pm 1,20\%$ en el grupo HFD vehículo (**Figura 22**).

Partiendo de estos volúmenes basales homogéneos, el modelo de obesidad inducida por dieta (grupo HFD vehículo) tiene menores volúmenes de lesión tras la isquemia cerebral respecto el grupo STD vehículo, como se puede comprobar observando los valores de lesión, tanto en mm^3 en la **Tabla 5** como en % de lesión respecto al hemisferio ipsilateral en la **Tabla 5** y **Figura 22**, a lo largo de los diferentes puntos de seguimiento durante 28 días. Mientras que, a corto plazo, a las 24 y 72 horas, sólo se observa una tendencia a menores volúmenes de infarto en el grupo HFD respecto al STD que se va acentuando a los 7 días tras la isquemia, es a largo plazo, a los 14 días, cuando se observa una diferencia muy próxima a la significancia estadística ($p=0,068$); un volumen de infarto de $22,36 \pm 1,96\%$ del hemisferio ipsilateral en el grupo HFD frente al $27,48 \pm 1,6\%$ del grupo STD.

Estudio preclínico de la paradoja de la obesidad en la isquemia cerebral:
efecto terapéutico del tratamiento con nicotina

A



B

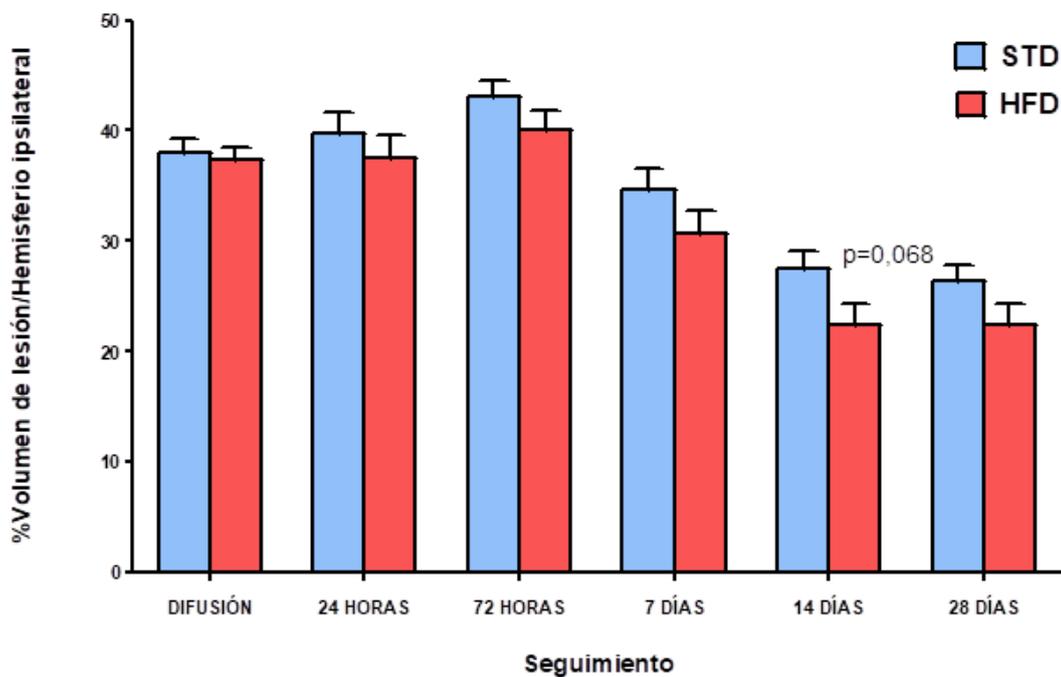


Figura 22. Evolución de la lesión isquémica mediante el seguimiento por resonancia magnética. Los mapas ADC (DWI o difusión) se adquieren antes del tratamiento para asegurar que todos los animales incluidos en el estudio tengan daños isquémicos basales homogéneos. La evaluación de la lesión isquémica se lleva a cabo mediante una secuencia de peso T2 registrada a las 24 y 72 horas, y 7, 14 y 28 días tras la isquemia. **A** – Imágenes por resonancia magnética de la evolución de la lesión durante 28 días en los animales STD y HFD vehículo. **B** – Análisis cuantitativo de los volúmenes de lesión a partir de las imágenes por RM en % del hemisferio ipsilateral. Los datos se muestran como la media±SEM. * $p < 0.05$ en comparación con el grupo STD; empleando el test estadístico t-Student (N=18 para el grupo STD y N=17 para el grupo HFD en los seguimientos a 24 horas, 72 horas y 7 días, N=10 y N=8, respectivamente, en los seguimientos a 14 y 28 días).

Volumen de infarto (mm ³)		STD	HFD
	Basal		272,75±11,65
24 horas		370,61±26,54	351,44±26,09
72 horas		408,76±21,87	373,62±20,35
7 días		268,05±17,93	244,64±19,74
14 días		178,86±9,81	152,74±12,37
28 días		164,78±9,22	144,94±12,42
Volumen de infarto (%Hemisferio ipsilateral)	Basal	38,07±1,20	37,33±1,2
	24 horas	39,78±1,89	37,47±2,09
	72 horas	43,06±1,42	39,99±1,81
	7 días	34,59±1,98	30,68±2,11
	14 días	27,48±1,6	22,34±1,96
	28 días	26,34±1,55	22,37±1,97

Tabla 5. Volúmenes de lesión a lo largo de 28 días tras la isquemia cerebral. Los datos se muestran como la media±SEM (N=18 para el grupo STD y N=17 para el grupo HFD en los seguimientos a 24 horas, 72 horas y 7 días, y N=10 y N=9, respectivamente, en los seguimientos a 14 y 28 días).

9.3. Influencia en la formación del edema cerebral

Se evaluó la formación de edema isquémico midiendo la desviación de la línea media del cerebro, la cual se calcula como el volumen del hemisferio ipsilateral entre el volumen del hemisferio contralateral. En un cerebro sano, sin presencia de edema, la igualdad entre ambos hemisferios hace que la desviación de la línea media sea 1. Sin embargo, tras un daño isquémico, la consecuente formación de edema isquémico lleva a que la desviación de la línea media sea superior a 1, puesto que el hemisferio ipsilateral se ve incrementado respecto al contralateral.

En este caso, no se han observado diferencias estadísticamente significativas en los valores de edema isquémico entre el grupo HFD vehículo y el grupo STD vehículo (**Figura 23**); 1,14±0,012 en el grupo STD vehículo frente al 1,13±0,014 en el grupo HFD vehículo a las 24 horas, 1,17±0,013 en el grupo STD vehículo frente al 1,17±0,011 en el grupo HFD vehículo a las 72 horas y 1,05±0,013 en el grupo STD vehículo frente al 1,03±0,015 en el grupo HFD vehículo a las 7 días tras la isquemia.

Estudio preclínico de la paradoja de la obesidad en la isquemia cerebral:
efecto terapéutico del tratamiento con nicotina

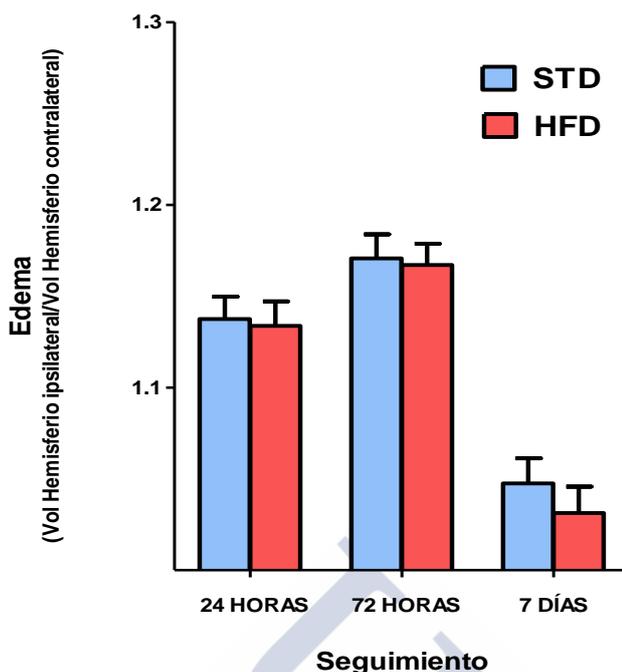


Figura 23. Análisis cuantitativo del edema isquémico en base a los datos de imagen por resonancia magnética. El edema se mide por la desviación de la línea media del cerebro calculada como el volumen del hemisferio ipsilateral entre el volumen del hemisferio contralateral. Los datos se muestran como la media \pm SEM (N=18 para el grupo STD y N=17 para el grupo HFD).

9.4. Análisis funcional y del déficit motor y sensorial

En la comparación entre el modelo de obesidad inducida por dieta (grupo HFD vehículo) y los animales con dieta estándar (grupo STD vehículo), también se han estudiado las diferencias en la función sensoriomotora y en el déficit motor y sensorial. La evaluación funcional mediante el test del Cilindro analiza la lateralidad de los animales, la cual, por la hemiparesia izquierda causada por la tMCA, tiende a 0 en animales isquémicos (mientras en un animal sano es aproximadamente de 0,5). Por otro lado, la escala de Bederson estudia diferentes ítems de déficit motor y sensorial, también característico tras la tMCAO, y da una puntuación que va desde 0; asintomático, hasta 8; déficit grave.

No se han observado diferencias estadísticamente significativas entre el grupo HFD y STD para la recuperación funcional a lo largo de 28 días tras la isquemia cerebral (**Figura 24A**). En el caso del déficit motor y sensorial, a los 7 días tras la isquemia cerebral, se ha visto que el grupo HFD tiene una puntuación significativamente más baja (menor déficit motor y sensorial) en la escala de Bederson respecto al grupo STD (**Figura 24B**), un dato que concuerda con los menores valores de lesión isquémica de este grupo a partir de los 7 días.

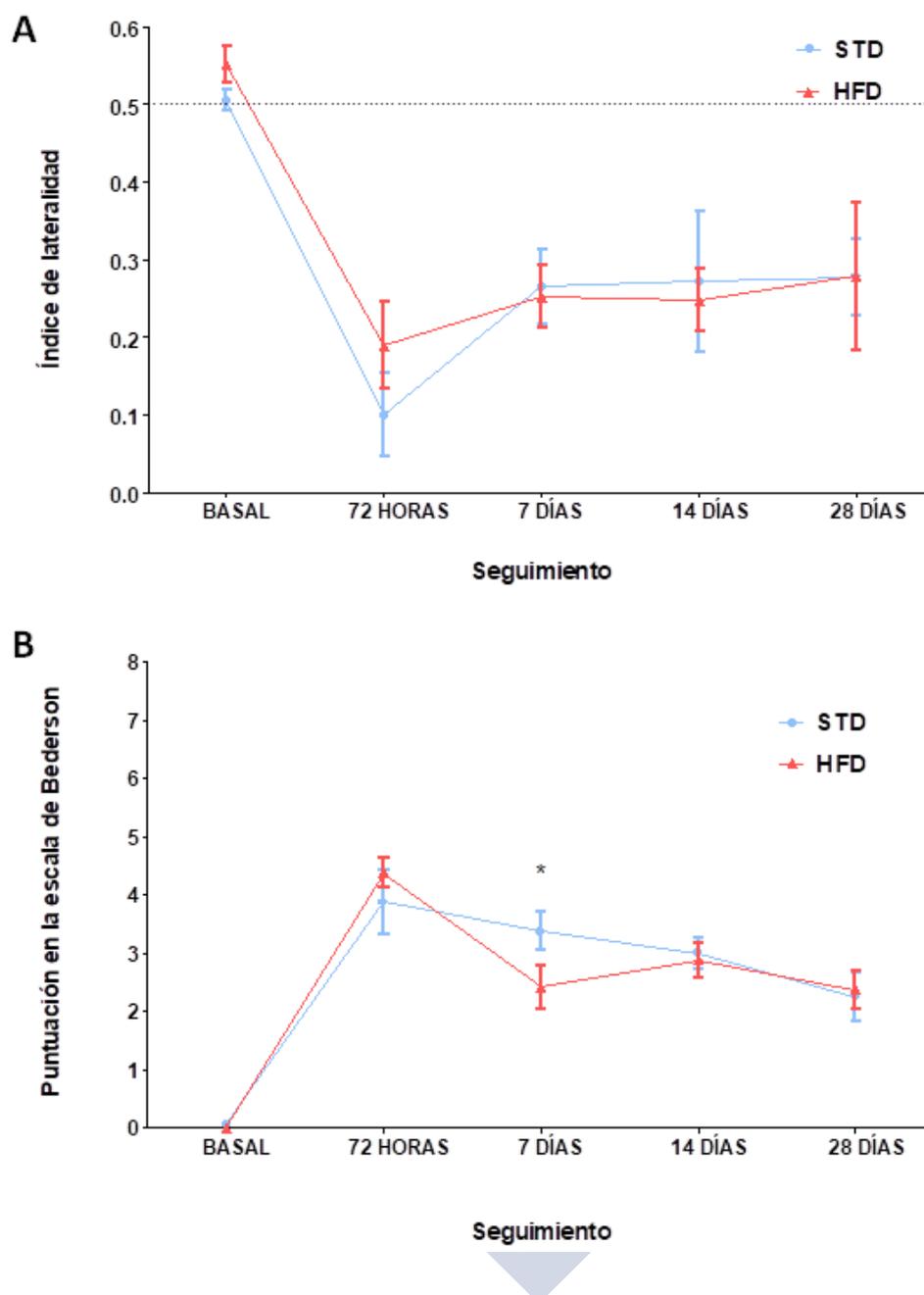


Figura 24. Evaluación de la función sensoriomotora y del déficit motor y sensorial mediante el test del Cilindro y la escala de Bederson respectivamente. El análisis funcional y del déficit motor y sensorial se realiza antes del daño isquémico (basal), a las 72 horas, y a los 7, 14 y 28 días tras la isquemia. **A** – Índice de lateralidad en los grupos STD y HFD (vehículos) para evaluar la función sensoriomotora, calculado como; el número de contactos con la extremidad izquierda/ número total de contactos. **B** – Puntuación en la escala de déficit motor y sensorial de Bederson en los grupos STD y HFD (vehículos), que va desde 0; asintomático, hasta 8; déficit grave. Los datos se muestran como la media±SEM. * $p < 0.05$ en comparación con el grupo STD; empleando el test estadístico t-Student (N=18 para el grupo STD y N=17 para el grupo HFD en la evaluación basal y a los 7 días, N=8 y N=9, respectivamente, en la evaluación a las 72 horas, N=10 y N=8, respectivamente, en la evaluación a 14 y 28 días).

9.5. Influencia de la obesidad en las rutas moleculares implicadas en la homeostasis energética

9.5.1. La ruta de la AMPK

Teniendo en cuenta los múltiples estudios que observan un incremento de la ruta de la AMPK tras la isquemia cerebral relacionándola con la mala prognosis en dicha enfermedad [264-266, 270-272, 275], así como algunos estudios que relacionan la inhibición de esta ruta molecular en el ámbito de la obesidad debido al exceso energético [252, 253], se ha realizado un estudio cualitativo, mediante western blot, de las diferentes proteínas que engloban la ruta de la AMPK, a los 28 días tras la isquemia cerebral y en ambos grupos de dieta.

Aunque se podría esperar un descenso de la ruta de AMPK en el modelo de obesidad inducida por dieta debido al exceso energético [252, 253], no se ha visto diferencias estadísticamente significativas para los niveles de pAMPK (activa) entre los grupos STD vehículo y HFD vehículo (**Figura 25**). Además, se observa un incremento estadísticamente significativo en la cantidad de AMPK α 2 en el grupo HFD respecto al STD. Contradictoriamente, los niveles de pACC (*downstream* de pAMPK) están disminuidos de forma estadísticamente significativa en el grupo HFD frente al STD.

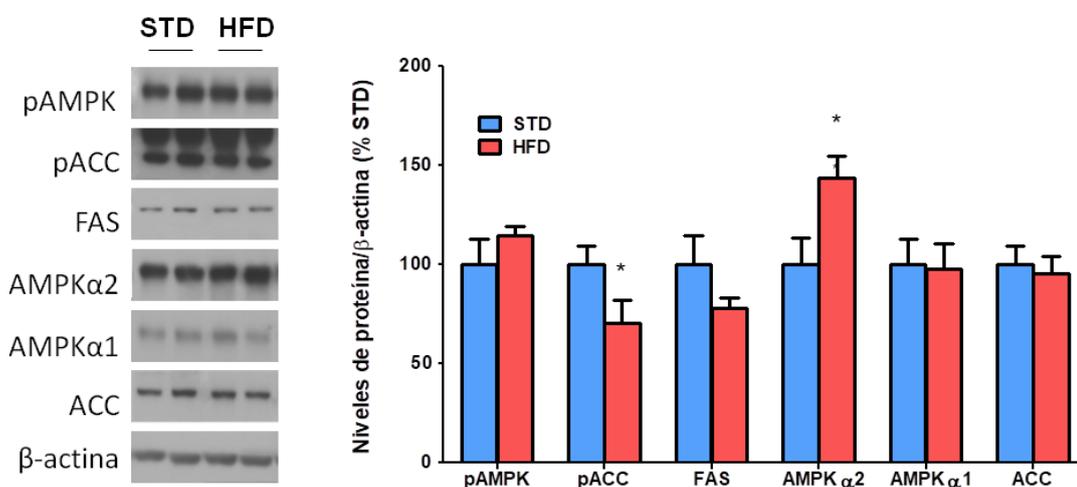


Figura 25. La ruta de AMPK en STD y HFD a los 28 días tras la isquemia cerebral. Niveles de proteínas (panel derecho) e imágenes autorradiográficas representativas (panel izquierdo) de la ruta de AMPK en los grupo STD vehículo y HFD vehículo (hemisferio ipsilateral). Los niveles de proteína se han calculado como % respecto al grupo STD vehículo, y han sido previamente normalizados por los niveles de β -actina. Los datos se muestran como la media \pm SEM. * $p < 0.05$ en comparación con el grupo STD vehículo; empleando el test estadístico t-Student (N=6 para cada grupo).

9.5.2. La ruta de mTOR y de la autofagia

Se ha descrito que la pAMPK activa la autofagia, tanto de forma directa fosforilando a la kinasa iniciadora de autofagia, Ulk1, como a través de la inhibición de la ruta de mTOR, inhibidora de la autofagia [300]. Por eso, se ha estudiado cualitativamente los niveles de las proteínas que engloban a la ruta de mTOR (incluyendo pTSC2 y pRAPTOR con las fosforilaciones sobre las que actúa la AMPK y que, consecuentemente, inhiben la ruta de mTOR) [302, 303] y de Ulk1 fosforilado en la Ser 555 (fosforilación sobre la que actúa la AMPK). El estudio, de nuevo, se realiza a los 28 días tras la isquemia cerebral y en ambos grupos de dieta.

Se observa que existe una tendencia al incremento de pmTOR en el modelo de obesidad inducida por dieta (grupo HFD vehículo) frente al grupo STD vehículo (**Figura 26**), un hecho que concuerda con el descenso muy próximo a la significancia estadística de pUlk1 en el grupo HFD respecto al STD, intuyendo una posible reducción de la autofagia en este grupo. Sin embargo, no se observan diferencias para la proteína *downstream* de pmTOR (pS6K) y las proteínas que bajo la fosforilación de pAMPK inhiben dicha ruta (pTSC2 y pRAPTOR), contradictoriamente al incremento de mTOR, tienen también una tendencia al incremento en el grupo HFD respecto al STD (que si coincide con la tendencia al incremento de pAMPK).

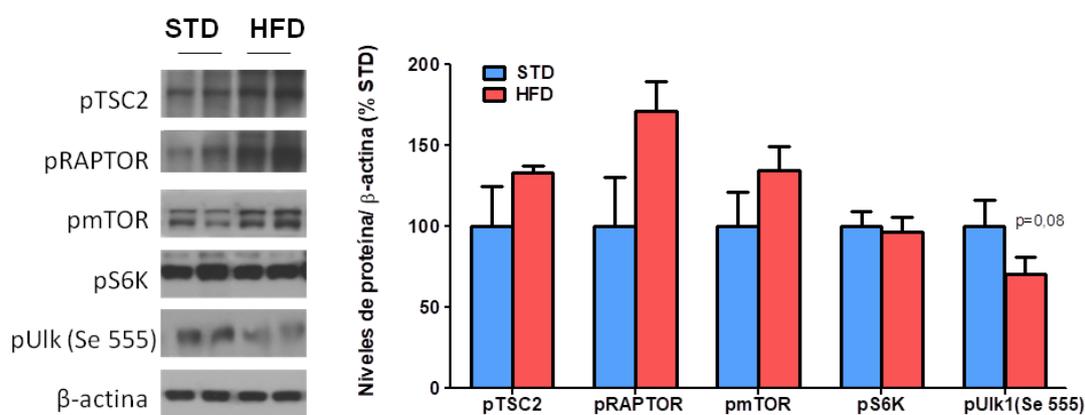


Figura 26. La ruta de mTOR y la autofagia en STD y HFD a los 28 días tras la isquemia cerebral. Niveles de proteínas (panel derecho) e imágenes autorradiográficas representativas (panel izquierdo) de la ruta de mTOR y de pUlk1 (Ser 555) en los grupos STD vehículo y HFD vehículo (hemisferio ipsilateral). Los niveles de proteína se han calculado como % respecto al grupo STD vehículo, y han sido previamente normalizados por los niveles de β -actina. Los datos se muestran como la media \pm SEM. * $p < 0.05$ en comparación con el grupo STD vehículo; empleando el test estadístico t-Student (N=6 para cada grupo).

9.5.3. El ER stress

Los estudios que demuestran la importancia del estrés del retículo endoplasmático (ER stress) en la patología de la isquemia cerebral [305, 307], nos han llevado al estudio cualitativos de la cantidad de proteínas que forman parte del llamado ER stress, a los 28 días tras la isquemia cerebral y en ambos grupos de dieta.

No se han observado diferencias estadísticamente significativas en la mayor parte de los componentes del ER stress, aunque se observa una leve tendencia al incremento de los mismos en el grupo HFD vehículo respecto al grupo STD vehículo (**Figura 27**), un hecho que concuerda con el incremento de ER stress en la obesidad descrito en la bibliografía [306]. Sin embargo, contradictoriamente, los niveles de *peIF2 α* (*downstream* de pPERK) aparecen con una reducción estadísticamente significativa en el grupo HFD frente al STD. No hay diferencias entre estos grupos para CHOP, la principal proteína que relaciona el ER stress con la apoptosis.

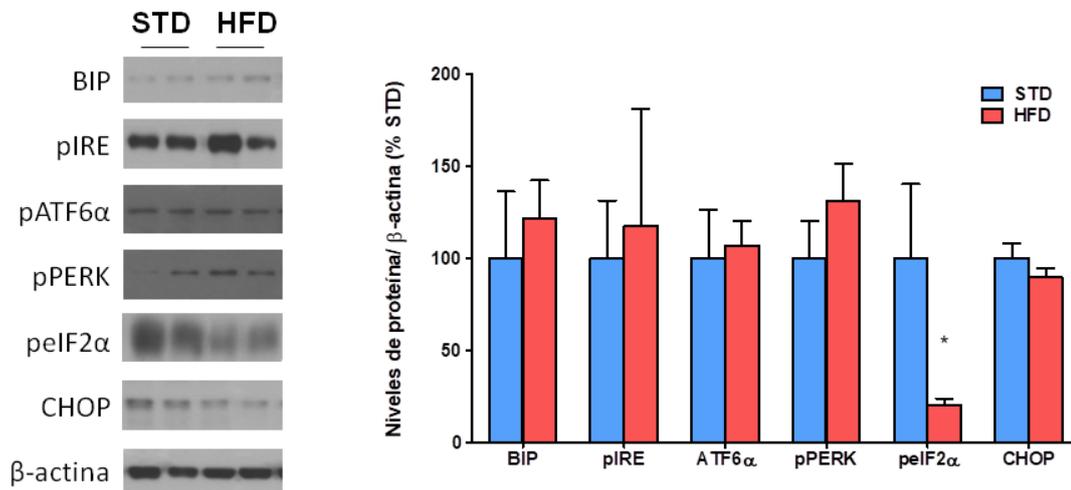


Figura 27. La ruta de ER stress en STD y HFD a los 28 días tras la isquemia cerebral. Niveles de proteínas (panel derecho) e imágenes autorradiográficas representativas (panel izquierdo) de la ruta de ER stress en los grupos STD vehículo y HFD vehículo (hemisferio ipsilateral). Los niveles de proteína se han calculado como % respecto al grupo STD vehículo, y han sido previamente normalizados por los niveles de β -actina. Los datos se muestran como la media \pm SEM. * $p < 0.05$ en comparación con el grupo STD vehículo; empleando el test estadístico t-Student (N=6 para cada grupo).

9.5.4. La apoptosis

Queriendo profundizar más en el estudio de la influencia de la obesidad inducida por dieta en la apoptosis, proceso clave en la prognosis tras una isquemia cerebral [43, 45-50] e inducido por la ruta de AMPK [289-296] e ER stress [305-307], se han estudiado los niveles de uno de

los efectores finales de dicho proceso, la caspasa 3 (completa y *cleaved*, que está en estado activo), a los 28 días y en ambos grupos de dieta.

Se ha observado una disminución estadísticamente significativa de los niveles de la caspasa 3 *cleaved* (activa) en el modelo de obesidad inducida por dieta (HFD vehículo) frente al grupo STD vehículo (**Figura 28**), mientras que no hay diferencias entre estos grupos para la caspasa 3. La disminución de la forma activa de la caspasa 3 es un hecho que concuerda con la tendencia a mejores resultados del grupo HFD en los volúmenes de lesión y déficit motor y sensorial.

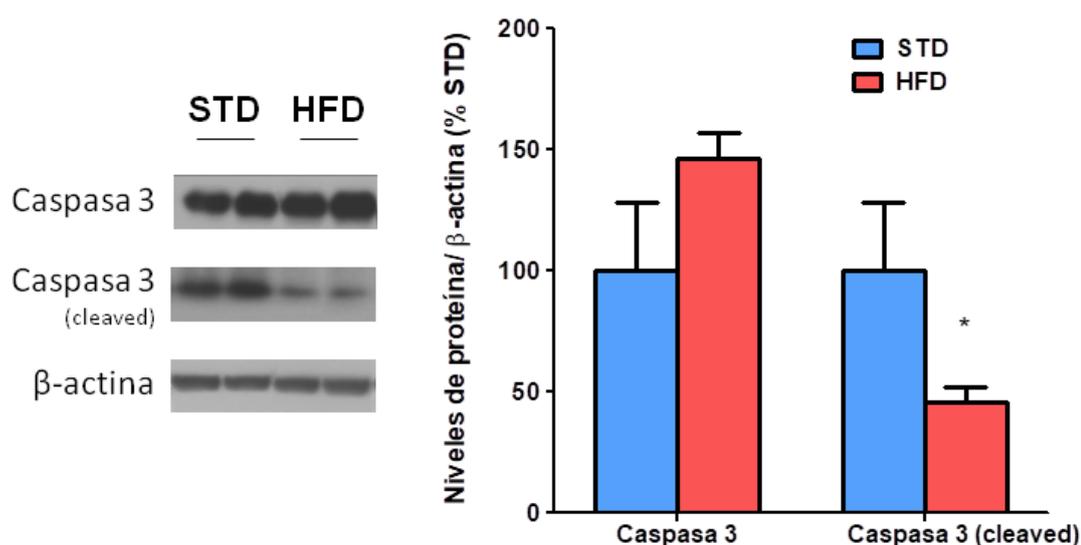


Figura 28. La Caspasa 3 en STD y HFD a los 28 días tras la isquemia cerebral. Niveles de proteína (panel derecho) e imágenes autorradiográficas representativas (panel izquierdo) de la Caspasa 3 en los grupos STD vehículo y HFD vehículo (hemisferio ipsilateral). Los niveles de proteína se han calculado como % respecto al grupo STD vehículo, y han sido previamente normalizados por los niveles de β-actina. Los datos se muestran como la media±SEM. * $p < 0.05$ en comparación con el grupo STD vehículo; empleando el test estadístico t-Student (N=6 para cada grupo).

10. Efecto neuroprotector de la nicotina en el modelo animal de isquemia cerebral

10.1. Disminución del peso corporal, ingesta y peso de la grasa

Tras la isquemia cerebral generada mediante el modelo de tMCAO, los animales tienden a disminuir su ingesta con una consecuente pérdida de peso. En los animales tratados durante 28 días, tanto en el grupo de dieta STD como HFD, se observa que el tratamiento con nicotina tiene un claro efecto reductor de la ingesta, peso corporal y peso de las grasas blancas, en concordancia a lo descrito anteriormente por el grupo [320].

Estudio preclínico de la paradoja de la obesidad en la isquemia cerebral:
efecto terapéutico del tratamiento con nicotina

El peso corporal va disminuyendo a lo largo de los 28 días de seguimiento y tratamiento, siendo más pronunciado en los grupos tratados con nicotina frente a los tratados con vehículo, tanto en la dieta STD como HFD. Así, a los 28 días tras la isquemia, la reducción de peso de los grupos tratados con nicotina es significativamente mayor que la reducción de peso en los respectivos grupos vehículo (**Figura 29A**); $44,5 \pm 7,76$ g frente a $18,8 \pm 11,73$ g en el grupo STD y de $72,5 \pm 7,32$ g frente a $13,14 \pm 7,29$ g en el grupo HFD.

Estos resultados concuerdan con una reducción significativamente mayor de la ingesta en los grupos tratados con nicotina de ambas dietas frente a los tratados con vehículo, ya desde las 72 horas de la isquemia cerebral (**Figura 29B, 29C**). A los 28 días tras la isquemia, ambos grupos de dieta presentan diferencias estadísticamente significativas entre los grupos tratados o no con nicotina; los STD nicotina tienen una ingesta de 22 ± 3 g/día frente a de $33 \pm 3,5$ g/día en el grupo STD vehículo, y los HFD nicotina tienen una ingesta de $16 \pm 1,6$ g/día frente a $22 \pm 2,8$ g/día en el grupo HFD vehículo.

Además, en consonancia, se observa una disminución estadísticamente significativa en el peso de las grasas blancas (subcutánea y epididimal) de los grupos tratados con nicotina frente a los tratados con vehículo de la misma dieta. En la **Figura 29D** se puede ver en la grasa subcutánea que el grupo STD nicotina tiene un $0,57 \pm 0,03\%$ g grasa/ peso corporal frente al $0,96 \pm 0,08\%$ g grasa/ peso corporal del STD vehículo, y el HFD nicotina tiene un $1,32 \pm 0,08\%$ g grasa/ peso corporal frente al $1,48 \pm 0,04\%$ g grasa/ peso corporal del HFD vehículo. Por otro lado, en la **Figura 29E** se puede ver que en la grasa epididimal el grupo STD nicotina tiene un $1,24 \pm 0,1\%$ g grasa/ peso corporal frente al $1,49 \pm 0,039\%$ g grasa/ peso corporal del STD vehículo, y el HFD nicotina tiene un $0,68 \pm 0,04\%$ g grasa/ peso corporal frente al $0,54 \pm 0,03\%$ g grasa/ peso corporal del HFD vehículo.

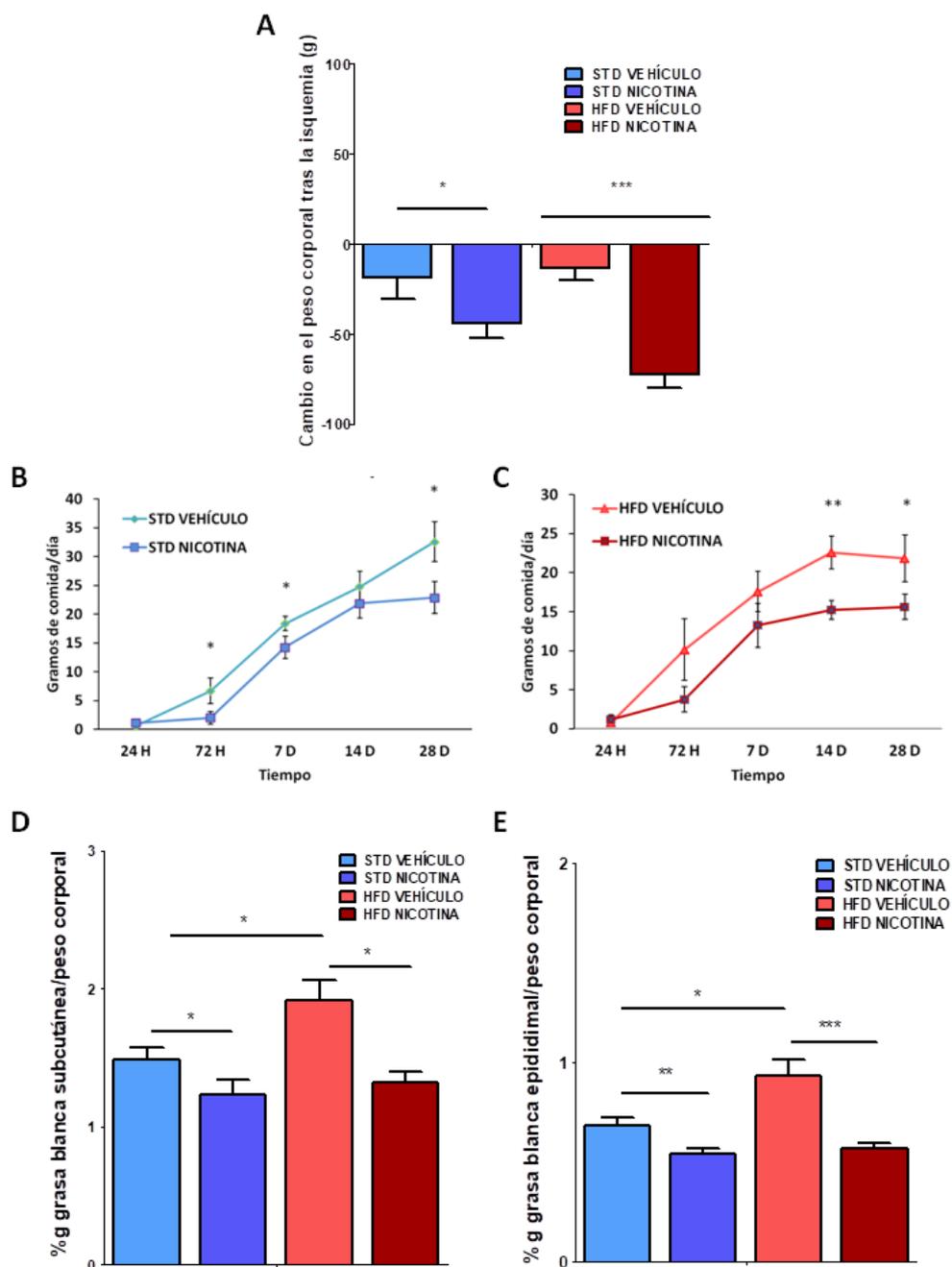


Figura 29. Efecto del tratamiento de nicotina en el peso corporal, la ingesta y la grasa blanca. **A** – Descenso del peso corporal bajo el tratamiento con nicotina en los grupos HFD y STD a los 28 días tras la isquemia (expresado como los gramos perdidos). **B** – Disminución de la ingesta bajo el tratamiento con nicotina en el grupo STD a lo largo de los 28 días tras la isquemia (en g/día). **C** – Disminución de la ingesta bajo el tratamiento con nicotina en el grupo HFD a los 28 días tras la isquemia (en g/día). **D** – Reducción del peso de la grasa blanca subcutánea bajo el tratamiento con nicotina en los grupos HFD y STD a los 28 días tras la isquemia (en % de g de grasa respecto al peso corporal). **E** - Reducción del peso de la grasa blanca epididimal bajo el tratamiento con nicotina en los grupos HFD y STD a los 28 días tras la isquemia (en % de g de grasa respecto al peso corporal). Los datos se muestran como la media \pm SEM. * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$; empleando el test estadístico t-Student (N=10 para los grupos STD vehículo y STD nicotina, N=8 para los grupos HFD vehículo y HFD nicotina).

10.2. Reducción del volumen de lesión isquémica

El efecto del tratamiento con nicotina en el volumen de lesión isquémica se ha estudiado en ambos grupos de dieta, STD y HFD. El seguimiento mediante imágenes de resonancia magnética para la evaluación de los volúmenes de lesión isquémica se ha realizado de forma basal, a las 24 y 72 horas, y a los 7,14 y 28 días tras la isquemia (**Figura 30**). De acuerdo con nuestros criterios de inclusión, el volumen de lesión basal de cada animal, determinado mediante mapas ADC, está entre el 30-45% del hemisferio ipsilateral: $38,07 \pm 1,20\%$ en el grupo STD vehículo, $37,07 \pm 1,12\%$ en el grupo STD nicotina $37,33 \pm 1,20\%$ en el grupo HFD vehículo y $37,31 \pm 1,22\%$ en el grupo HFD nicotina.

Partiendo de estos volúmenes basales homogéneos, en ambos grupos de dieta (STD y HFD) se observa que el tratamiento con nicotina reduce la lesión isquémica desde las 24 horas tras la isquemia, persistiendo su efecto protector hasta los 28 días (**Figura 30**). El análisis estadístico de los volúmenes de infarto en ambos grupos de dieta muestra una reducción estadísticamente significativa en los diferentes puntos de seguimiento cuando se comparan los grupos tratados con nicotina frente a los tratados con vehículo de su respectivo grupo de dieta, por la prueba t de Student. Además, como se puede ver en la **Figura 30** la reducción de la lesión isquémica por parte de la nicotina es más acusada en el caso del grupo HFD, siendo el volumen de lesión del grupo HFD nicotina significativamente menor también respecto al STD vehículo a lo largo de los 28 días, tanto por la prueba t de Student entre estos grupos (**Figura 30**) como con el ANOVA entre los 4 grupos ($P < 0,05$ en los seguimientos a 24 horas y 28 días, y $P < 0,01$ en los seguimientos a 72 horas, 7 y 14 días), un dato que concuerda con los resultados sobre la tendencia a menores volúmenes de lesión en el grupo HFD frente al STD. Los datos sobre los volúmenes de lesión se pueden ver más detallados en la **Tabla 6**.

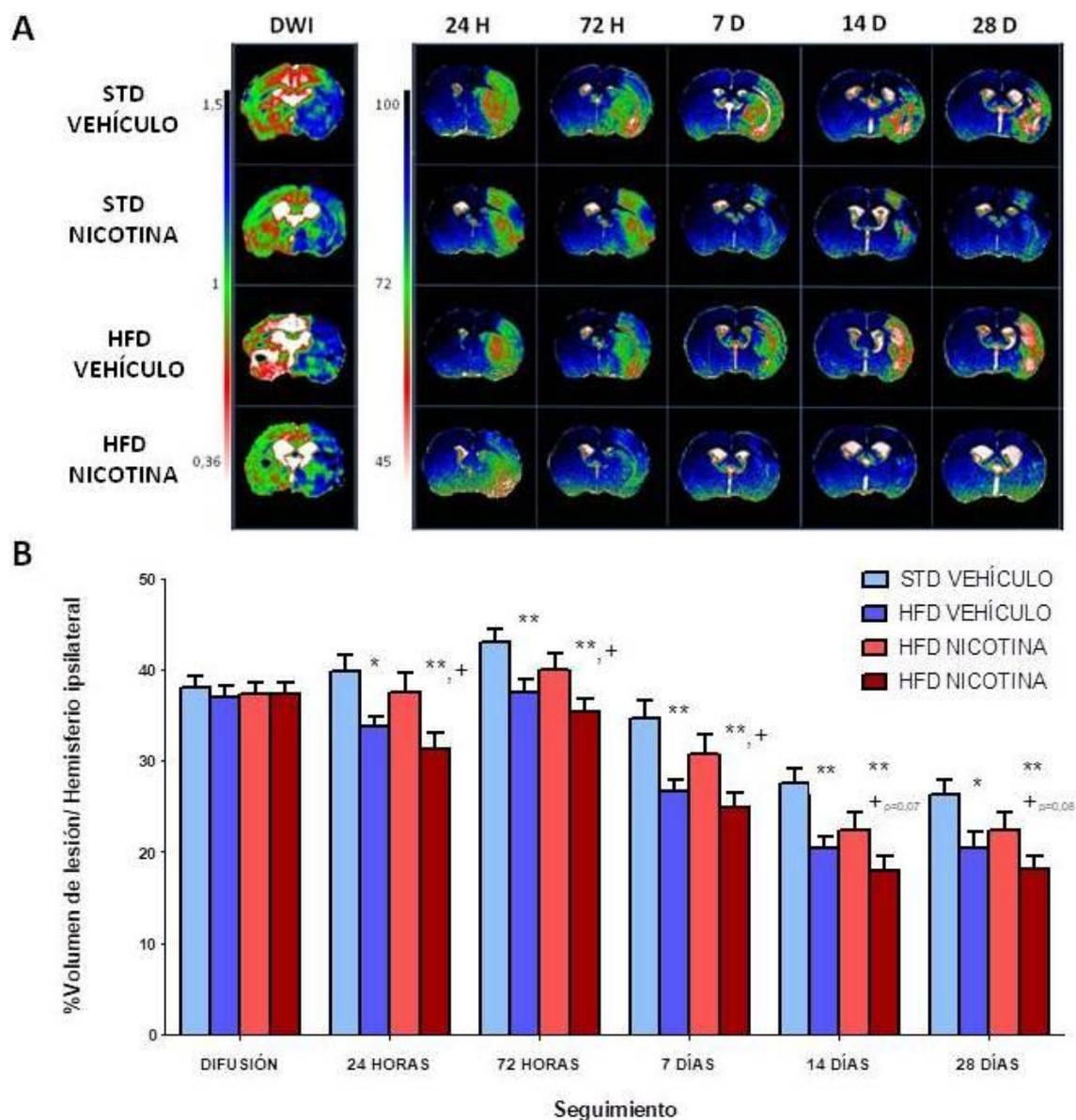


Figura 30. Evolución de la lesión isquémica bajo el tratamiento con nicotina mediante el seguimiento por resonancia magnética. Los mapas ADC (DWI o difusión) se adquieren antes del tratamiento para asegurar que todos los animales incluidos en el estudio tengan daños isquémicos basales homogéneos. La evaluación de la lesión isquémica se lleva a cabo mediante una secuencia de peso T2 registrada a las 24 y 72 horas, y a los 7, 14 y 28 días tras la isquemia. **A** – Imágenes por resonancia magnética de la evolución de la lesión en los animales STD vehículo, STD nicotina, HFD vehículo y HFD nicotina. **B** – Análisis cuantitativo de los volúmenes de lesión a partir de las imágenes por RM en % del hemisferio ipsilateral. Los datos se muestran como la media±SEM. * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ en comparación con el grupo STD vehículo y + $p < 0.05$ en comparación con el grupo HFD vehículo; empleando el test estadístico t-Student (N=18 para el grupo STD vehículo, N=19 para el grupo STD nicotina, N=17 para los grupos HFD vehículo y HFD nicotina en los seguimientos a 24 horas, 72 horas y 7 días, y N=10, N=10, N=8, respectivamente, en los seguimientos a 14 y 28 días).

Estudio preclínico de la paradoja de la obesidad en la isquemia cerebral:
efecto terapéutico del tratamiento con nicotina

Volumen de infarto (mm ³)		STD VEHÍCULO	STD NICOTINA	HFD VEHÍCULO	HFD NICOTINA
	Basal		272,75±11,65	265,35±9,59	262,60±10,88
24 horas		370,61±26,54	304,35±14,49	351,44±26,09	275,99±21,95
72 horas		408,76±21,87	346,86±14,12	373,62±20,35	314,94±12,79
7 días		268,05±17,93	210,08±12,10	244,64±19,74	201,60±16,51
14 días		178,86±9,81	136,57±7,65	152,74±12,37	121,60±9,9
28 días		164,78±9,22	132,80±16,78	144,94±12,42	116,20±9,32
Volumen de infarto (% Hemisferio ipsilateral)					
	Basal	38,07±1,20	37,15±1,12	37,33±1,2	37,31±1,22
	24 horas	39,78±1,89	33,70±1,12	37,47±2,09	31,21±1,79
	72 horas	43,06±1,42	37,55±1,27	39,99±1,81	35,35±1,42
	7 días	34,59±1,98	26,64±1,27	30,68±2,11	24,89±1,60
	14 días	27,48±1,6	20,48±1,28	22,34±1,96	17,93±1,56
	28 días	26,34±1,55	20,43±1,69	22,37±1,97	18,06±1,53

Tabla 6. Volúmenes de lesión bajo el tratamiento con nicotina a lo largo de 28 días tras la isquemia cerebral. Los datos se muestran como la media±SEM (N=18 para el grupo STD vehículo, N=19 para el grupo STD nicotina, N=17 para los grupos HFD vehículo y HFD nicotina en los seguimientos a 24 horas, 72 horas y 7 días, y N=10, N=10 y N=8, respectivamente, en los seguimientos a 14 y 28 días).

10.3. Disminución del edema cerebral

Se evaluó la formación de edema isquémico midiendo la desviación de la línea media del cerebro y, en concordancia con los resultados obtenidos en los volúmenes de lesión isquémica, se ha observado que el tratamiento con nicotina reduce la formación de edema (**Figura 31**). A las 24 horas ya se aprecia una disminución del edema isquémico en los grupos tratados con nicotina frente a los tratados con vehículo, en ambos grupos de dieta, siendo estadísticamente significativa en el grupo HFD. El valor máximo de formación del edema se observa a las 72 horas tras el daño isquémico, y es en este punto donde se observa una mayor reducción del edema en los grupos tratados con nicotina frente a los tratados con vehículo de forma estadísticamente significativa (**Figura 31** y **Tabla 7**).

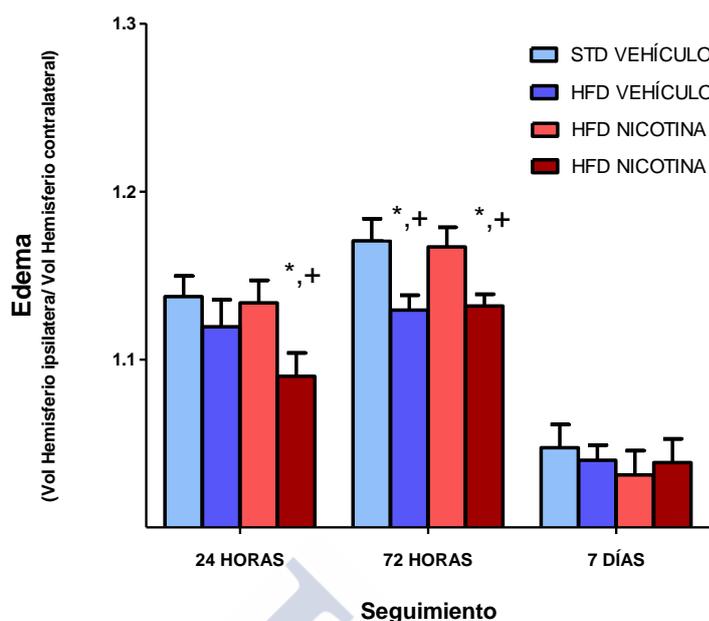


Figura 31. Análisis cuantitativo del edema isquémico bajo el tratamiento con nicotina, en base a los datos de imagen por resonancia magnética. El edema se mide por la desviación de la línea media del cerebro calculada como el volumen del hemisferio ipsilateral entre el volumen del hemisferio contralateral. Los datos se muestran como la media±SEM. *p<0.05 en comparación con el grupo STD vehículo y +p<0.05 en comparación con el grupo HFD vehículo; empleando el test estadístico t-Student (N=18 para el grupo STD vehículo, N=19 para el grupo STD nicotina, N=17 para los grupos HFD vehículo y HFD nicotina en los seguimientos a 24 horas, 72 horas y 7 días).

Edema		STD VEHÍCULO	STD NICOTINA	HFD VEHÍCULO	HFD NICOTINA
	24 horas	1,14±0,012	1,12±0,016	1,13±0,014	1,09±0,014
	72 horas	1,17±0,013	1,13±0,009	1,17±0,011	1,13±0,007
	7 días	1,05±0,013	1,04±0,009	1,03±0,015	1,04±0,014

Tabla 7. Evolución del edema isquémico. Los datos se muestran como la media±SEM (N=18 para el grupo STD vehículo, N=19 para el grupo STD nicotina, N=17 para los grupos HFD vehículo y HFD nicotina en los seguimientos a 24 horas, 72 horas y 7 días).

10.4. Mejora funcional y del déficit motor y sensorial

El estudio del efecto terapéutico del tratamiento con nicotina tras la isquemia cerebral, en ambos grupos de dieta, se completa con la evaluación de la función sensoriomotora y en el déficit motor y sensorial. El estudio funcional mediante el test del Cilindro analiza la lateralidad de los animales, la cual, por la hemiparesia izquierda causada por la tMCA, tiende a 0 en animales isquémicos (mientras en un animal sano es aproximadamente de 0,5). Por otro lado, la escala de Bederson estudia diferentes ítems de déficit motor y sensorial, también característico tras la tMCAO, y da una puntuación que va desde 0; asintomático, hasta 8; déficit grave.

Paralelamente a los resultados obtenidos para el volumen de lesión y formación de edema isquémico, se ha observado que los grupos tratados con nicotina tienden, de forma general, a una mejoría funcional y del déficit motor y sensorial frente a los grupos vehículo (**Figura 32A, 32B**). Esta tendencia no llega a ser estadísticamente significativa en el test del Cilindro, pero en la escala de Bederson se observa que ya a las 72 horas el grupo HFD nicotina muestra mejores resultados, con una reducción estadísticamente significativa de la puntuación de déficit motor y sensorial respecto al grupo HFD vehículo (**Figura 32D**) y también al STD vehículo ($P < 0,05$), en concordancia a los resultados para los volúmenes de lesión. A los 7 días, el grupo STD vehículo presenta un incremento estadísticamente significativo del déficit motor y sensorial frente a los otros 3 grupos de estudio (**Figura 32C** respecto STD nicotina, y $P < 0,05$ respecto HFD vehículo y HFD nicotina). El déficit motor y sensorial a los 14 días sigue tendiendo a ser mejor para los grupos nicotina frente a sus respectivos vehículo, pero sólo el grupo STD nicotina tiene una disminución estadísticamente significativa frente al STD vehículo (**Figura 32C**).

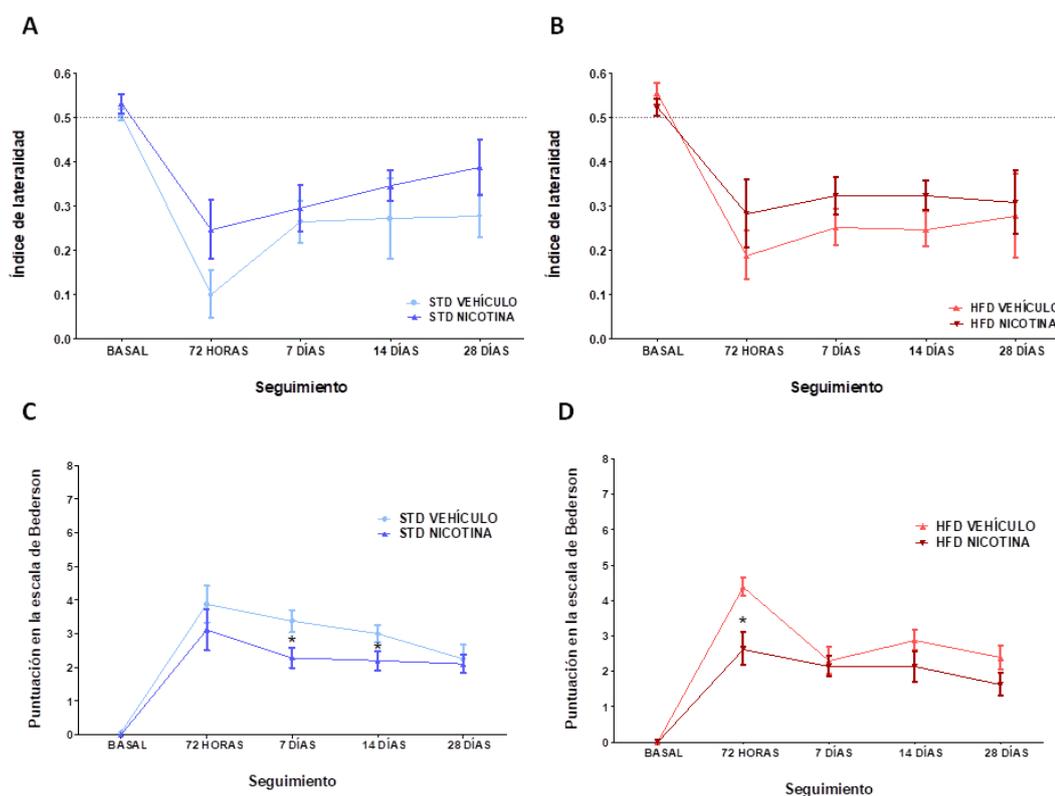


Figura 32. Evaluación de la función sensoriomotora y del déficit motor y sensorial bajo el tratamiento con nicotina mediante el test del Cilindro y la escala de Bederson, respectivamente. El índice de lateralidad se calcula como; el número de contactos con la extremidad izquierda/ número total de contactos. La puntuación en la escala de déficit motor y sensorial de Bederson va desde 0; asintomático, hasta 8; déficit grave. El análisis funcional y del déficit motor y sensorial se realiza antes del daño isquémico (basal), a las 72 horas, y a los 7, 14 y 28 días tras la isquemia. **A** – Índice de lateralidad para en el grupo STD. **B** – Índice de lateralidad en el grupo HFD. **C** – Puntuación en la escala de déficit motor y sensorial de Bederson en el grupo STD. **D** – Puntuación en la escala de déficit motor y sensorial de Bederson en el grupo HFD. Los datos se muestran como la media±SEM. * $p < 0.05$ en comparación con el grupo de la misma dieta; empleando el test estadístico t-Student (N=18 para el grupo STD vehículo, N=19 para el grupo STD nicotina, N=17 para los grupos HFD vehículo y HFD nicotina en la evaluación basal y a los 7 días, N=8, N=9 y N=9, respectivamente, en la evaluación a las 72 horas, N=10, N=10 y N=8, respectivamente, en la evaluación a 14 y 28 días).

10.5. Influencia de la nicotina en las rutas moleculares implicadas en el control de la homeostasis energética

10.5.1. Inhibición de la ruta de la AMPK

Teniendo en cuenta los múltiples estudios que observan un incremento de la ruta de la AMPK tras la isquemia cerebral relacionándola con la mala prognosis en dicha enfermedad [264-266, 270-272, 275], así como otros estudios que relacionan la nicotina con la inhibición de esta ruta molecular en el ámbito de la obesidad [319, 320], se ha realizado un estudio

Estudio preclínico de la paradoja de la obesidad en la isquemia cerebral:
efecto terapéutico del tratamiento con nicotina

cuantitativo, mediante western blot, de la cantidad de las diferentes proteínas que engloban la ruta de la AMPK, a los 28 días tras la isquemia cerebral y en ambos grupos de dieta.

Tanto en el modelo de obesidad inducida por dieta HFD, como en el grupo STD, se ha visto la inhibición de la ruta de AMPK en los grupos tratados con nicotina frente a los grupos vehículo de la misma dieta. Como se puede ver en la **Figura 33** los niveles de pAMPK (activa) y consecuentemente los de pACC (activa) están significativamente disminuidos en los grupos tratados con nicotina respecto a los grupos vehículo.

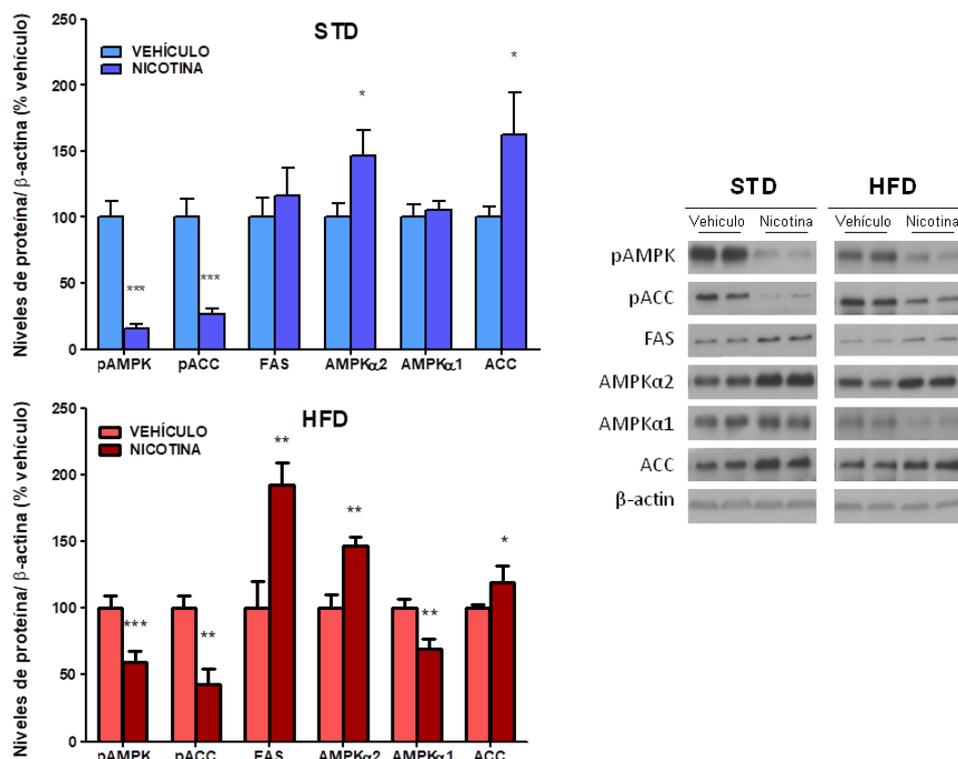


Figura 33. Efecto de la nicotina sobre la ruta de AMPK en STD y HFD a los 28 días tras la isquemia cerebral. Niveles de proteínas (panel izquierdo) e imágenes autorradiográficas representativas (panel derecho) de la ruta de AMPK en los cuatro grupos; STD vehículo, STD nicotina, HFD vehículo y HFD nicotina (hemisferio ipsilateral). Los niveles de proteína se han calculado como % respecto al grupo vehículo de su misma dieta, y han sido previamente normalizados por los niveles de β -actina. Los datos se muestran como la media \pm SEM. * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$ en comparación con el grupo vehículo de la misma dieta; empleando el test estadístico t-Student (N=7 para cada grupo).

Además, en concordancia, los niveles de FAS están incrementados en estos grupos, siendo el incremento significativo únicamente en el grupo HFD. Por otro lado, parece que la expresión de la subunidad α 2 de la AMPK y la expresión de ACC están incrementadas bajo la administración de nicotina en ambas dietas, hecho que podría deberse a una compensación molecular contra la gran inhibición del estado activo de la AMPK causada por la nicotina.

10.5.2. Inhibición de la autofagia

Se ha descrito que la pAMPK activa la autofagia, tanto de forma directa fosforilando a Ulk, una de las kinasas que activan este proceso, como a través de la inhibición de la ruta de mTOR, inhibidora de la autofagia [300]. Por eso, se ha estudiado cualitativamente la cantidad de las proteínas que engloban a la ruta de mTOR (incluyendo pTSC2 [303] y pRAPTOR [302] con las fosforilaciones sobre las que actúa la AMPK) y de Ulk fosforilado en la Ser 555 por la AMPK. El estudio, de nuevo, se realiza a los 28 días tras la isquemia cerebral.

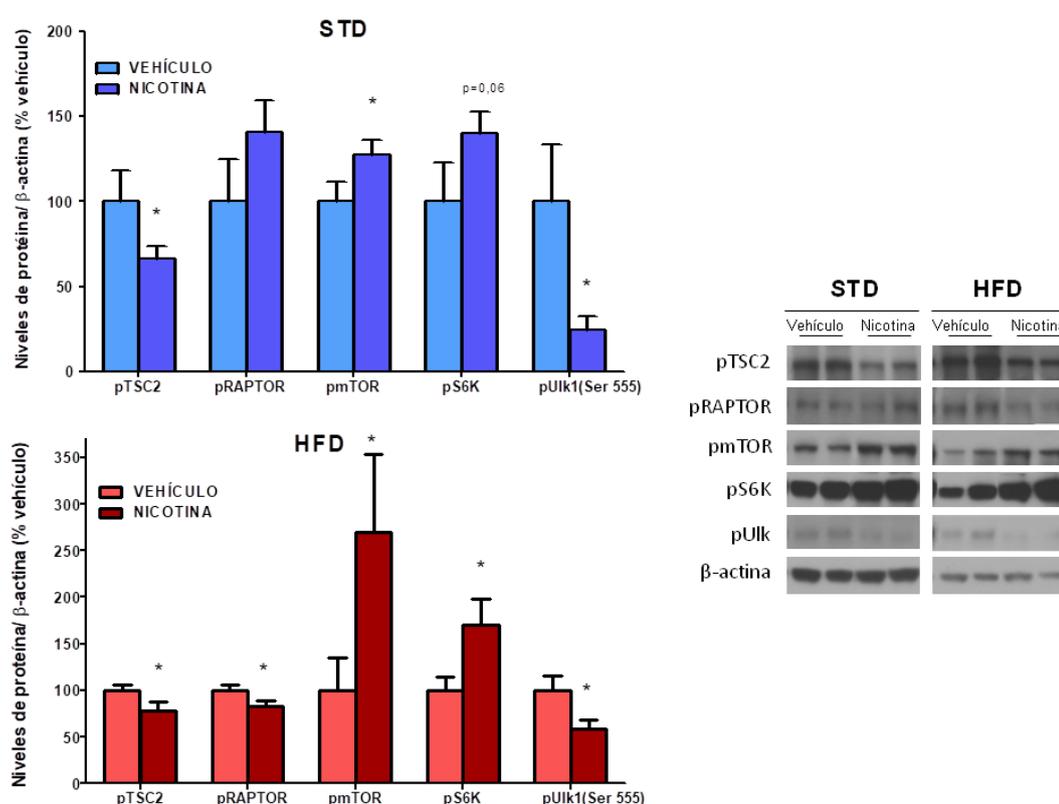


Figura 34. Efecto de la nicotina sobre la ruta de mTOR y la autofagia en STD y HFD a los 28 días tras la isquemia cerebral. Niveles de proteínas (panel izquierdo) e imágenes autorradiográficas representativas (panel derecho) de la ruta de mTOR y de pUlk1 (Ser 555) en los cuatro grupos; STD vehículo, STD nicotina, HFD vehículo y HFD nicotina (hemisferio ipsilateral). Los niveles de proteína se han calculado como % respecto al grupo vehículo de su misma dieta, y han sido previamente normalizados por los niveles de β-actina. Los datos se muestran como la media±SEM. *p<0.05 **p<0.01 y ***p<0.001 en comparación con el grupo vehículo de la misma dieta; empleando el test estadístico t-Student (N=7 para cada grupo).

En ambas dietas, los grupos tratados con nicotina, de acuerdo a los resultados vistos para la ruta de AMPK, presentan la ruta de mTOR incrementada, así como la presencia de pUlk1 (Ser 555) disminuida, suponiendo una disminución de la autofagia. Se puede ver en la **Figura 34** que

Estudio preclínico de la paradoja de la obesidad en la isquemia cerebral: efecto terapéutico del tratamiento con nicotina

los niveles de pTSC2 fosforilada por AMPK, que actúa inhibiendo la ruta de mTOR, están significativamente reducidos en los grupos tratados con nicotina frente a los grupos tratados con vehículo. Consecuentemente, en los grupos nicotina hay un incremento significativo de pmTOR y su efector *downstream* pS6K (en el STD la diferencia para la pS6K es prácticamente significativa con una $p=0,06$). También es estadísticamente significativa la disminución de pUlk1 (Ser 555) en los grupos tratados con nicotina frente a sus respectivos grupos vehículo.

10.5.3. Inhibición del ER stress

Ante los estudios que demuestran la importancia del estrés del retículo endoplasmático (ER stress) en la patología de la isquemia cerebral [305, 307], y el hecho de que la nicotina tenga efecto en este proceso molecular [320], ha llevado al estudio cualitativos de la cantidad de proteínas que forman parte del llamado ER stress, a los 28 días tras la isquemia cerebral.

Se ha visto que los grupos tratados con nicotina; presentan una disminución de la mayor parte de las proteínas que engloban al ER stress (**Figura 35**). En la dieta STD, el grupo tratado con nicotina presenta una disminución estadísticamente significativa de los niveles de BiP, pIRE1 α , ATF6 α y peIF2 α respecto al grupo vehículo, mientras que, sorprendentemente, los niveles de pPERK están incluso incrementados. En el caso del modelo de obesidad inducida por dieta HFD, en el grupo nicotina se observa una reducción estadísticamente significativa de pIRE1 α , peIF2 α y pPERK respecto al grupo vehículo, mientras que BiP tiene un incremento significativo (hecho que se podría explicar por la compensación) y en ATF6 α no hay diferencias estadísticamente significativas. En el último efector del ER stress, que abre las puertas a la apoptosis, CHOP, no parece haber diferencias estadísticamente significativas entre los grupos nicotina y vehículo. Sin embargo, en pJNK, activado por el ER stress y activador de la apoptosis, si se observa una tendencia clara a su disminución bajo el tratamiento con nicotina, siendo esta diferencia estadísticamente significativa en la dieta HFD.

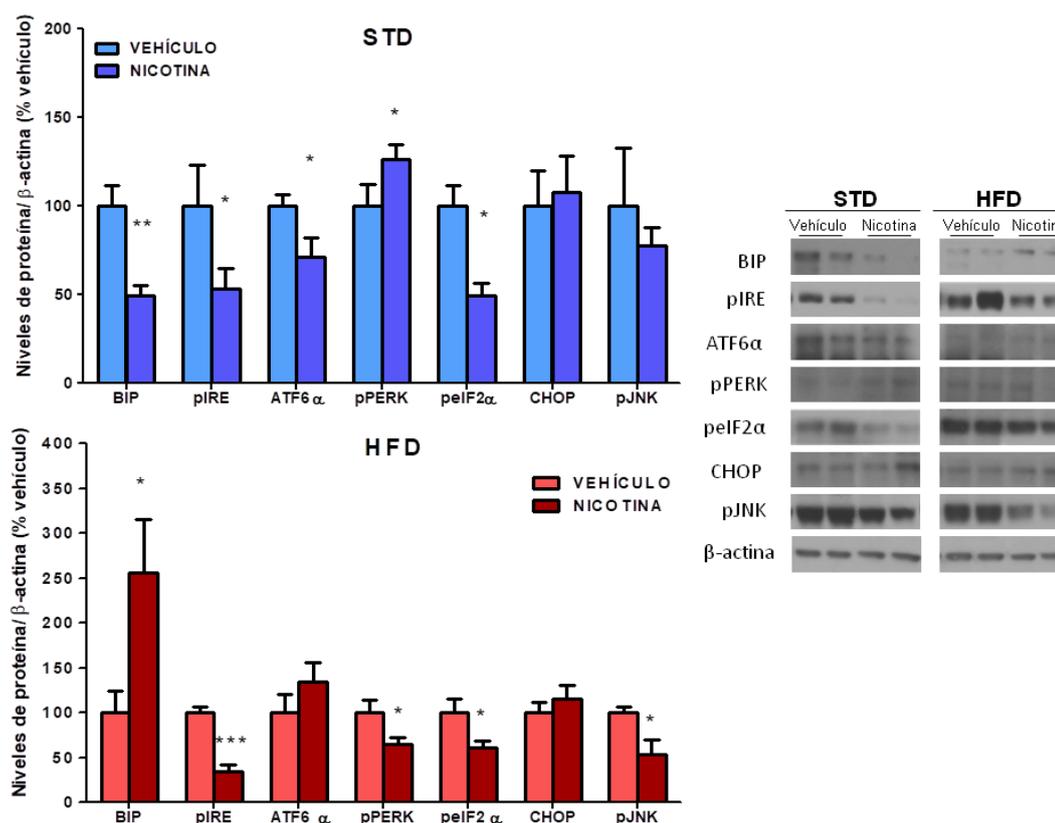


Figura 35. Efecto de la nicotina sobre la ruta de ER stress en STD y HFD a los 28 días tras la isquemia cerebral. Niveles de proteínas (panel izquierdo) e imágenes autorradiográficas representativas (panel derecho) de la ruta de ER stress en los cuatro grupos; STD vehículo, STD nicotina, HFD vehículo y HFD nicotina (hemisferio ipsilateral). Los niveles de proteína se han calculado como % respecto al grupo vehículo de su misma dieta, y han sido previamente normalizados por los niveles de β -actina. Los datos se muestran como la media \pm SEM. * p <0.05 ** p <0.01 y *** p <0.001 en comparación con el grupo vehículo de la misma dieta; empleando el test estadístico t-Student (N=7 para cada grupo).

10.5.4. Inhibición de la apoptosis

Queriendo profundizar más en el estudio de la influencia del tratamiento con nicotina en la apoptosis, proceso clave en la prognosis tras una isquemia cerebral [41, 45, 46, 50], se han estudiado los niveles de uno de los efectores finales de dicho proceso, la caspasa 3 (completa y *cleaved*, en estado activo), en los grupos tratados o no con nicotina de ambos tipos de dietas, a los 28 días tras la isquemia cerebral.

Se ha observado una clara disminución de los niveles de caspasa 3 bajo el tratamiento con nicotina. Tanto en el grupo STD, como HFD se observa una disminución estadísticamente significativa de la caspasa 3 *cleaved* (**Figura 36**) en los grupos tratados con nicotina en comparación con los tratados con vehículo. En el caso de la expresión de caspasa 3, la tendencia

Estudio preclínico de la paradoja de la obesidad en la isquemia cerebral: efecto terapéutico del tratamiento con nicotina

en ambas dietas es a su disminución en los grupos tratados con nicotina, pero esta diferencia sólo tiene significancia estadística en el grupo HFD.

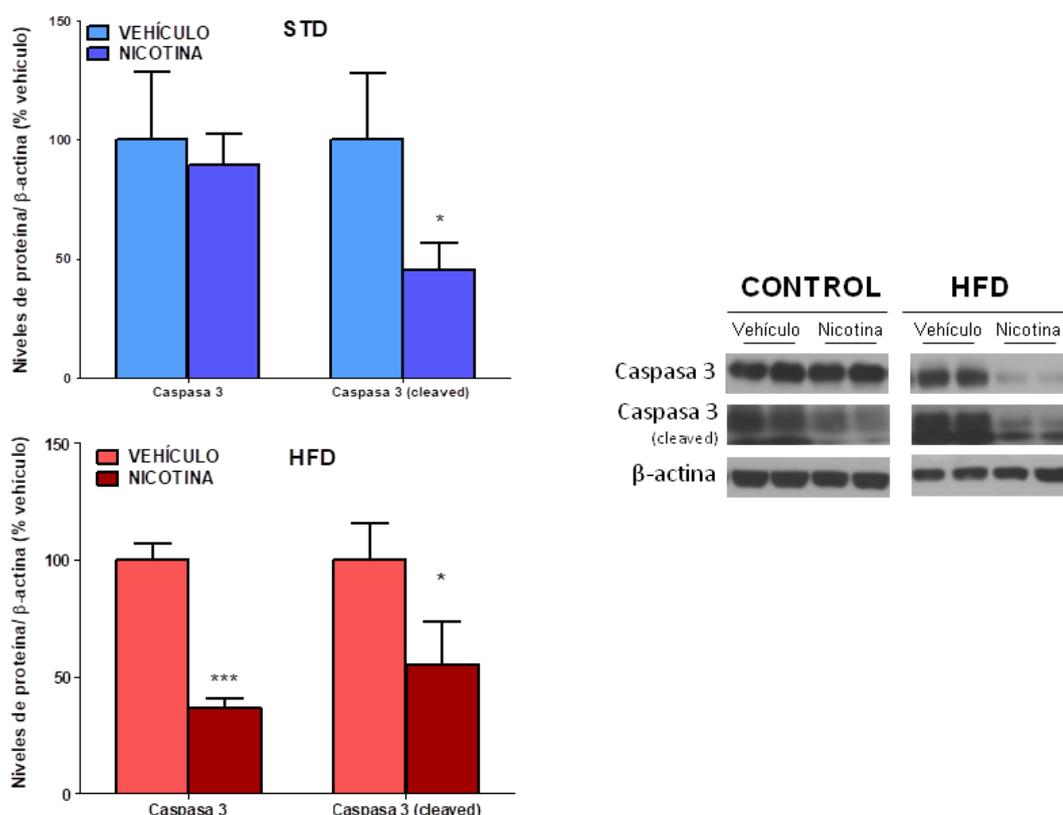


Figura 36. Efecto de la nicotina sobre los niveles de Caspasa 3 en STD y HFD a los 28 días tras la isquemia cerebral. Niveles de proteínas (panel izquierdo) e imágenes autorradiográficas representativas (panel derecho) de la Caspasa 3 en los cuatro grupos; STD vehículo, STD nicotina, HFD vehículo y HFD nicotina (hemisferio ipsilateral). Los niveles de proteína se han calculado como % respecto al grupo vehículo de su misma dieta, y han sido previamente normalizados por los niveles de β -actina. Los datos se muestran como la media \pm SEM. * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$ en comparación con el grupo vehículo de la misma dieta; empleando el test estadístico t-Student (N=7 para cada grupo).

10.6. Reversión del efecto neuroprotector de la nicotina con un activador de la ruta de AMPK

10.6.1. Incremento del volumen de lesión y edema isquémico

Teniendo en cuenta los resultados de activación de la ruta de la AMPK bajo el tratamiento con nicotina durante 28 días ligados a una mejora de los volúmenes de lesión, edema isquémico y déficit funcional, ha sido de interés el estudio del tratamiento con nicotina junto a un activador de la ruta de AMPK, AICAR [264]. Son muchos los estudios que observan un incremento de la

ruta de la AMPK tras la isquemia cerebral relacionándola con la mala prognosis en dicha enfermedad [264-266, 270-272, 275], por lo que se podría esperar una reversión de los efectos de la nicotina bajo el tratamiento simultáneo con AICAR.

El estudio de la influencia del activador de AMPK, AICAR, sobre el efecto protector de la nicotina en los volúmenes de lesión isquémica, se ha estudiado tanto en el grupo STD como HFD. El seguimiento mediante neuroimagen de resonancia magnética para la evaluación de los volúmenes de lesión isquémica se ha realizado de forma basal, a las 24 y 72 horas, y a los 7 días tras la isquemia.

De acuerdo con nuestros criterios de inclusión, el volumen de lesión basal de cada animal, determinado mediante mapas ADC, está entre el 30-45% del hemisferio ipsilateral: $40,54 \pm 1,48\%$ en el grupo STD vehículo, $40,40 \pm 1,52\%$ en el grupo STD nicotina, $40,57 \pm 1,72\%$ en el grupo STD AICAR, $40,42 \pm 1,51\%$ en el grupo HFD vehículo $40,09 \pm 1,51\%$ en el grupo HFD nicotina y $39,42 \pm 1,49\%$ en el grupo HFD AICAR (**Figura 37A, 37B**).

Tanto en el grupo STD como HFD se ha observado que el efecto protector de la nicotina se revierte bajo la administración de AICAR (**Figura 37**, ver grupos tratados con nicotina y AICAR). A las 24 y 72 horas tras la isquemia cerebral parece que se mantiene el efecto protector de la nicotina, observándose incluso una diferencia estadísticamente significativa entre el grupo vehículo y el tratado con AICAR a las 24 horas en la dieta STD. Es a los 7 días cuando se observan un incremento del volumen estadísticamente significativo del grupo con AICAR respecto al grupo nicotina, tanto en dieta STD como HFD; un $37,97 \pm 2,63\%$ en el grupo STD con AICAR frente un $29,32 \pm 1,45\%$ en el grupo STD nicotina y un $35,91 \pm 1,95\%$ en el grupo HFD con AICAR frente al $26,72 \pm 35,91\%$ en el grupo HFD nicotina.

Estudio preclínico de la paradoja de la obesidad en la isquemia cerebral:
efecto terapéutico del tratamiento con nicotina

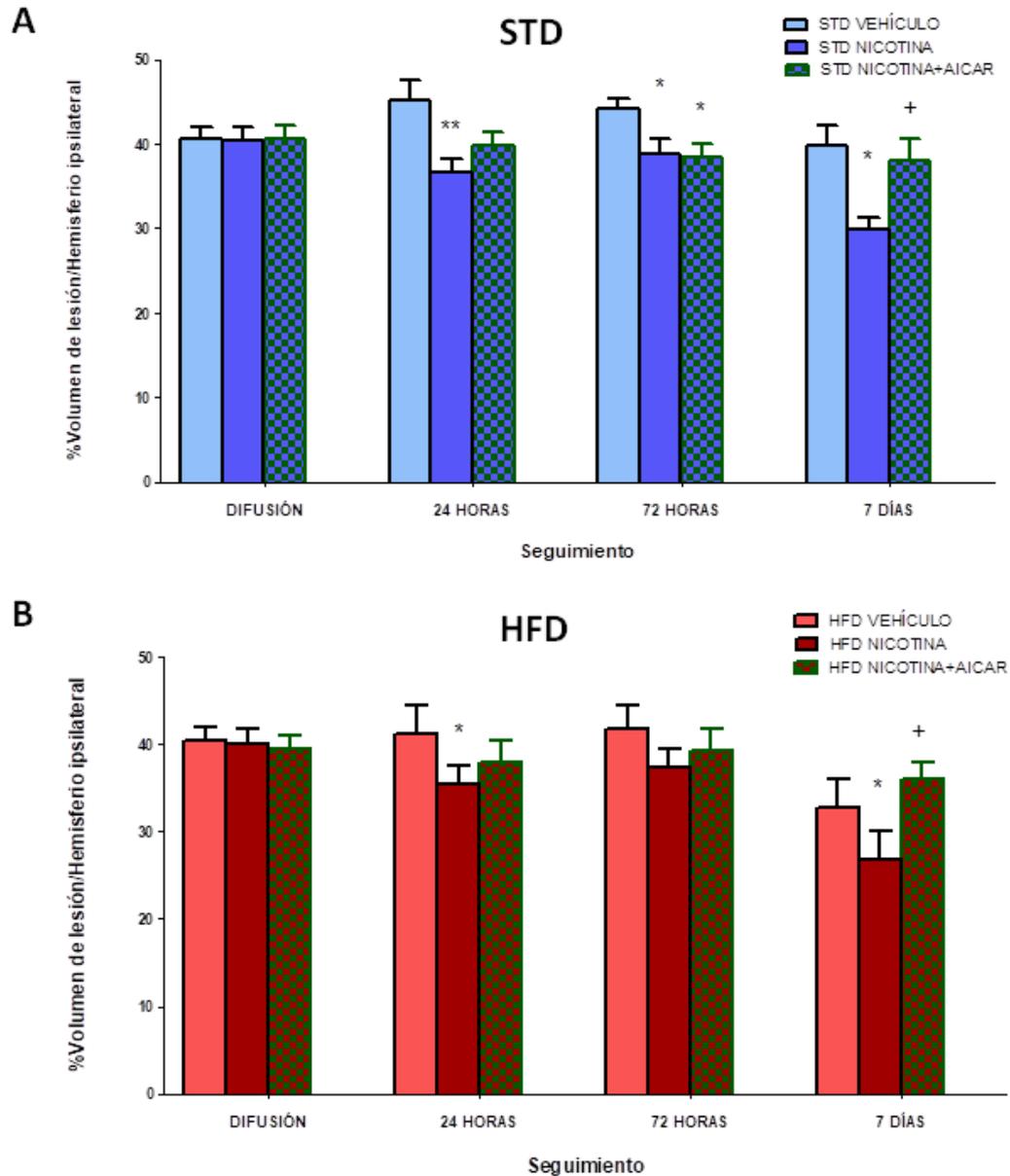


Figura 37. Evolución de la lesión isquémica bajo el tratamiento con AICAR mediante el seguimiento por resonancia magnética. Los mapas ADC (difusión) se adquieren antes del tratamiento para asegurar que todos los animales incluidos en el estudio tengan daños isquémicos basales homogéneos. La evaluación de la lesión isquémica se lleva a cabo mediante una secuencia de peso T2 registrada a las 24 y 72 horas, y 7 tras la isquemia. **A** – Análisis cuantitativo de los volúmenes de lesión del grupo STD a partir de las imágenes por RM (en % del hemisferio ipsilateral) **B** – Análisis cuantitativo de los volúmenes de lesión del grupo HFD a partir de las imágenes por RM (en % del hemisferio ipsilateral). Los datos se muestran como la media±SEM. * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ en comparación con el grupo vehículo de la misma dieta y + $p < 0.05$ en comparación con el grupo nicotina de la misma dieta; empleando el ANOVA seguido del test estadístico Bonferroni (N=8 para los grupos STD vehículo, STD nicotina + AICAR y HFD nicotina + AICAR y N=9 para los grupos STD nicotina, HFD vehículo y HFD nicotina).

Se evaluó la formación de edema isquémico bajo el tratamiento con nicotina y AICAR y se ha observado que este tratamiento no parece tener efecto en dicha formación, manteniéndose el efecto reductor de la nicotina sobre el edema isquémico. Se ha descrito previamente el efecto de la nicotina en la disminución del edema isquémico respecto a los grupos tratados con vehículo, tanto en STD como HFD (véase de nuevo en la **Figura 38A, 38B**). En el caso de los grupos AICAR (tratados con nicotina y AICAR) se observa la misma tendencia a menores valores de edema isquémico frente a los grupos vehículo, con resultados estadísticamente significativos a las 72 horas tras la isquemia (el punto de mayores valores de edema isquémico) en ambas dietas, y a las 24 horas en el grupo HFD (**Figura 38A, 38B**).

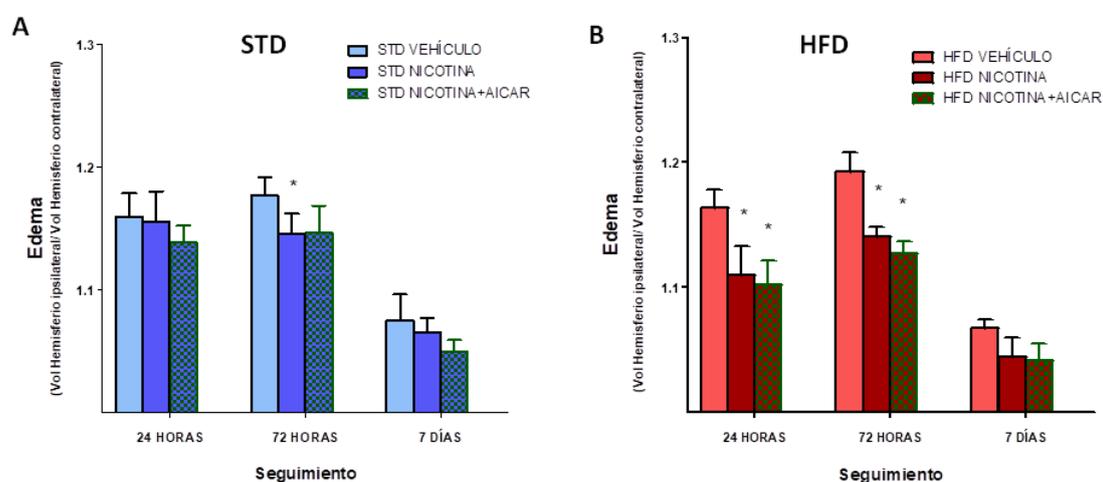


Figura 38. Análisis cuantitativo del edema isquémico bajo el tratamiento con AICAR en base a los datos de imagen por resonancia magnética. El edema se mide por la desviación de la línea media del cerebro calculada como el volumen del hemisferio ipsilateral entre el volumen del hemisferio contralateral. **A** – Grupo STD. **B** – Grupo HFD. Los datos se muestran como la media \pm SEM. * $p < 0.05$ en comparación con el grupo STD vehículo; empleando el ANOVA seguido del test estadístico Bonferroni (N=8 para los grupos STD vehículo, STD nicotina + AICAR y HFD nicotina + AICAR, y N=9 para los grupos STD nicotina, HFD vehículo y HFD nicotina).

Los resultados más detallados sobre la medición del edema isquémico a lo largo de 7 días se pueden ver en la **Tabla 8**.

Estudio preclínico de la paradoja de la obesidad en la isquemia cerebral:
efecto terapéutico del tratamiento con nicotina

Edema			VEHÍCULO	NICOTINA	AICAR	
	STD	24 horas		1,16±0,019	1,15±0,025	1,14±0,014
		72 horas		1,18±0,015	1,15±0,016	1,15±0,021
		7 días		1,07±0,012	1,08±0,02	1,05±0,009
	HFD	24 horas		1,16±0,014	1,11±0,024	1,10±0,018
		72 horas		1,19±0,015	1,14±0,006	1,13±0,01
		7 días		1,07±0,07	1,05±0,016	1,04±0,014

Tabla 8. Evolución del edema isquémico bajo el tratamiento con AICAR en STD y HFD. Los datos se muestran como la media±SEM (N=8 para los grupos STD vehículo, STD nicotina + AICAR y HFD nicotina + AICAR y N=9 para los grupos STD nicotina, HFD vehículo y HFD nicotina).

10.6.2. Empeoramiento funcional y del déficit motor y sensorial

Se ha evaluado la recuperación funcional y el déficit motor y sensorial tras la isquemia cerebral, durante 7 días, para evaluar el efecto del tratamiento con el activador de AMPK, AICAR, sobre la neuroprotección inducida por el tratamiento con nicotina en ambos grupos de dieta.

En los animales con dieta estándar, como se puede observar en la **Figura 39**, no se han observado diferencias estadísticamente significativas entre el grupo nicotina + AICAR y los grupos vehículo o nicotina (ni mejoría sobre el primero, ni empeoramiento sobre el segundo, como se podría esperar). Únicamente se ha observado la diferencia previamente comentada, entre el grupo STD nicotina (menor déficit motor y sensorial) y el STD vehículo, a los 7 días, en la escala de Bederson.

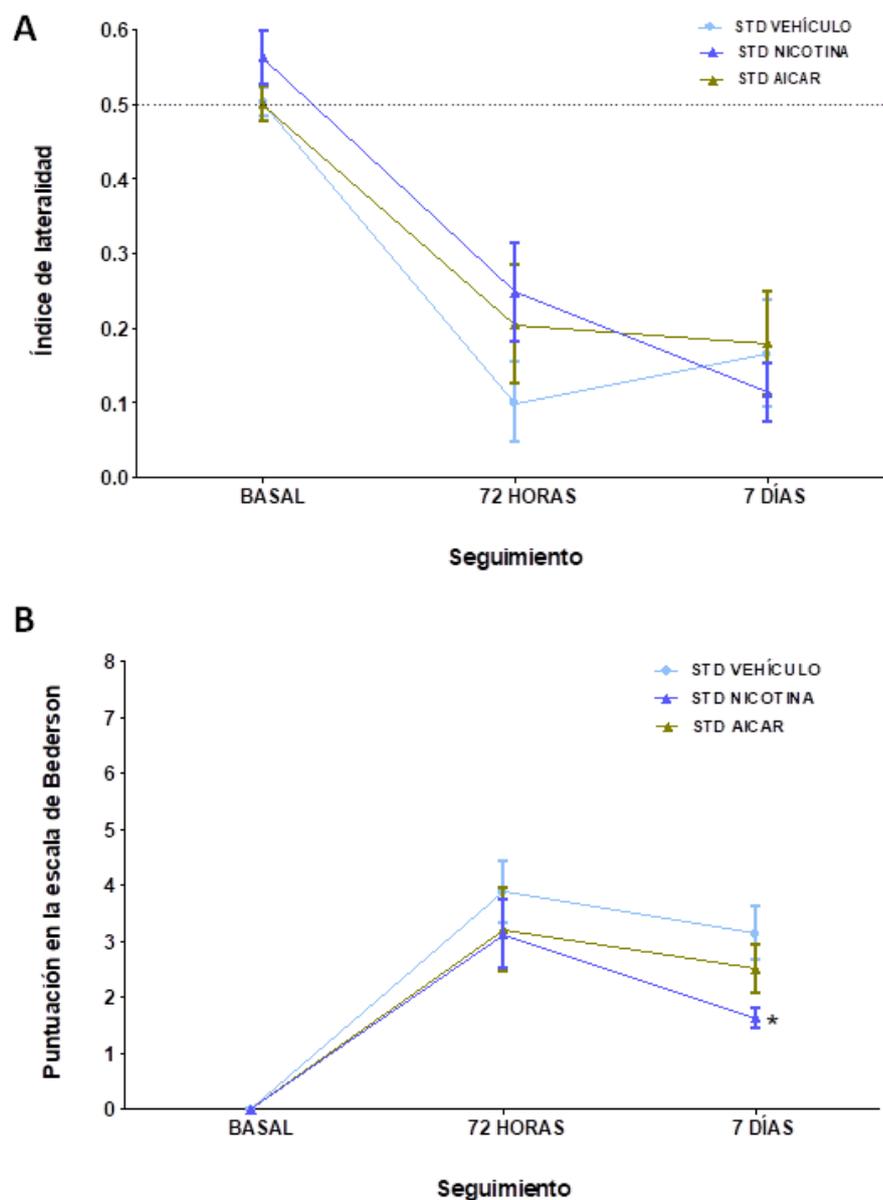


Figura 39. Evaluación de la función sensoriomotora y del déficit motor y sensorial bajo el tratamiento con AICAR mediante el test del Cilindro y la escala de Bederson, respectivamente, en el grupo STD. El análisis funcional y del déficit motor y sensorial en los tres grupos (STD vehículo, STD nicotina y STD nicotina + AICAR) se realizan antes del daño isquémico (basal) y a las 72 horas y 7 días tras la isquemia. **A** – Índice de lateralidad para evaluar la función sensoriomotora calculado como; el número de contactos con la extremidad izquierda/ número total de contactos. **B** – Puntuación en la escala de déficit motor y sensorial de Bederson que va desde 0; asintomático, hasta 8; déficit grave. Los datos se muestran como la media±SEM. * $p < 0.05$ en comparación con el STD vehículo; empleando el ANOVA seguido del test estadístico Bonferroni (N=8 para los grupos STD vehículo y STD nicotina + AICAR y N=9 para el grupo STD nicotina).

En cuanto al modelo de obesidad inducida por dieta, como se puede ver en la **Figura 40**, no se han observado diferencias estadísticamente significativas entre el grupo nicotina + AICAR y los grupos vehículo o nicotina en el test del Cilindro, pero si se observa una diferencia

Estudio preclínico de la paradoja de la obesidad en la isquemia cerebral:
efecto terapéutico del tratamiento con nicotina

estadísticamente significativa entre el grupo HFD nicotina + AICAR y el HFD nicotina, a los 7 días, en la escala de Bederson (mayor déficit bajo el tratamiento con AICAR, de forma pareja a los peores resultados de los volúmenes de lesión), además de la diferencia entre el HFD nicotina y HFD vehículo a las 72 horas ya comentada anteriormente.

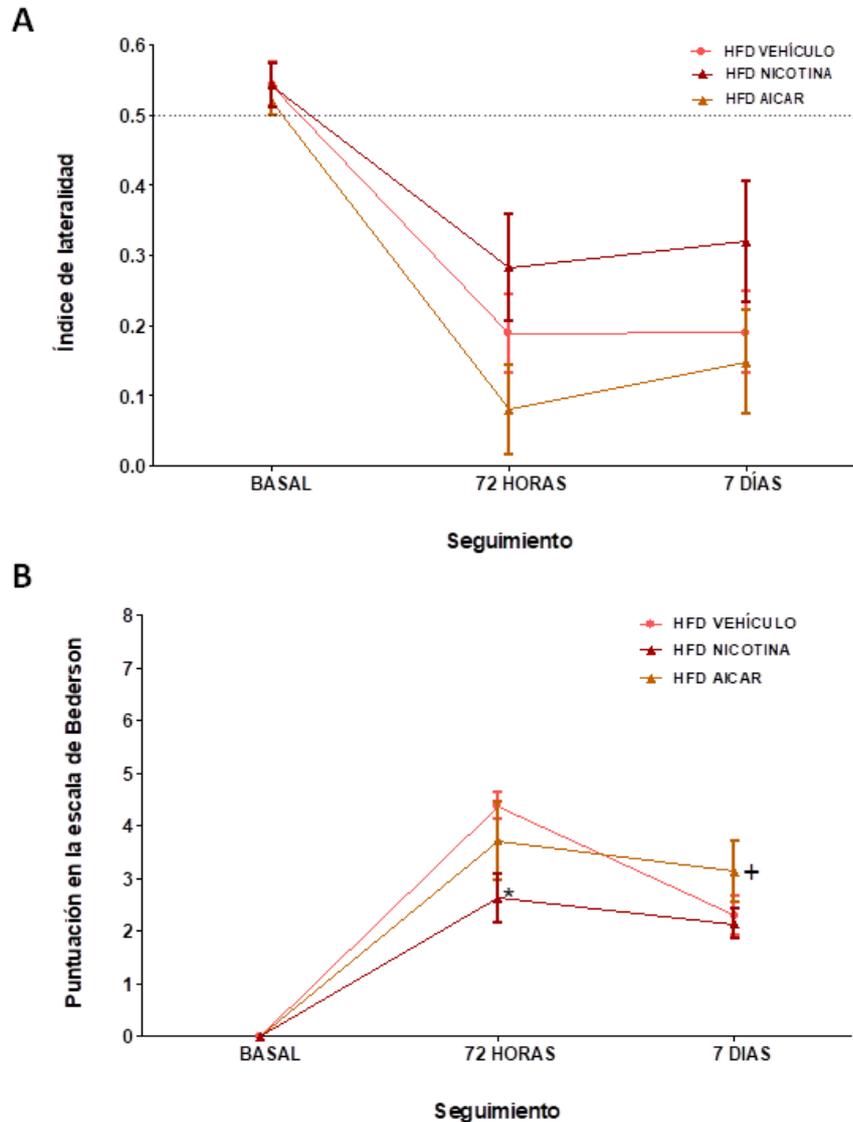


Figura 40. Evaluación de la función sensoriomotora y del déficit motor y sensorial bajo el tratamiento con AICAR mediante el test del Cilindro y la escala de Bederson, respectivamente, en el grupo HFD. El análisis funcional y del déficit motor y sensorial en los tres grupos (HFD vehículo, HFD nicotina y HFD nicotina) se realizan antes del daño isquémico (basal) y a las 72 horas y 7 días tras la isquemia. **A** - Índice de lateralidad para evaluar la función sensoriomotora calculado como; el número de contactos con la extremidad izquierda/ número total de contactos. **B** - Puntuación en la escala de déficit motor y sensorial de Bederson que va desde 0; asintomático, hasta 8; déficit grave. Los datos se muestran como la media±SEM. * $p < 0.05$ en comparación con el HFD vehículo y + $p < 0.05$ en comparación con el HFD nicotina; empleando el ANOVA seguido del test estadístico Bonferroni (N=8 para el grupo HFD nicotina + AICAR y N=9 para los grupos HFD vehículo y HFD nicotina).

10.6.3. Reversión del efecto de la nicotina sobre las rutas moleculares implicadas en la homeostasis energética

10.6.3.1. Activación de la ruta de AMPK

Ante la reversión del efecto protector de la nicotina bajo el tratamiento con AICAR (activador de AMPK) de forma simultánea al de nicotina (inhibidor de AMPK), reflejado en mayores volúmenes de infarto y peores resultados para el déficit funcional, se ha comprobado el efecto de dicho tratamiento simultáneo en los niveles de los componentes de la ruta de AMPK, a los 7 días tras la isquemia.

En el grupo STD, se ha visto la inhibición de la ruta de AMPK en el grupo tratado con nicotina frente al grupo vehículo a los siete días tras la isquemia, igual que se había visto a los 28. Como se puede ver en la **Figura 41** los niveles de pAMPK (activa) y consecuentemente los de pACC (activa) están significativamente disminuidos en el grupo tratado con nicotina respecto al grupo vehículo.

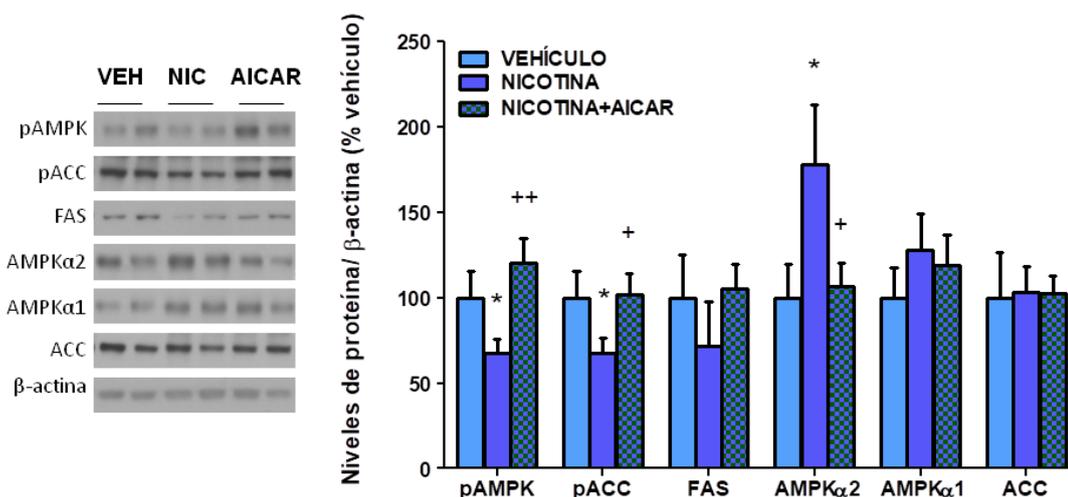


Figura 41. Efecto de AICAR sobre la ruta de AMPK en STD a los 7 días tras la isquemia cerebral. Niveles de proteínas (panel izquierdo) e imágenes autorradiográficas representativas (panel derecho) de la ruta de AMPK en STD (STD vehículo, STD nicotina y STD nicotina + AICAR, en el hemisferio ipsilateral). Los niveles de proteína se han calculado como % respecto al grupo vehículo de su misma dieta, y han sido previamente normalizados por los niveles de β -actina. Los datos se muestran como la media \pm SEM. * $p < 0.05$ en comparación con el grupo STD vehículo y + $p < 0.05$ ++ $p < 0.01$ en comparación con el grupo STD nicotina; empleando el test estadístico t-Student (N=7 para cada grupo).

Por otro lado, parece que la expresión de la subunidad $\alpha 2$ de la AMPK está incrementada bajo la administración de nicotina, hecho que podría deberse a una compensación molecular contra la gran inhibición del estado activo de la AMPK causada por la nicotina. En cuanto al tratamiento simultáneo de nicotina con AICAR, se ha visto que tiene un efecto potenciador de la

Estudio preclínico de la paradoja de la obesidad en la isquemia cerebral:
efecto terapéutico del tratamiento con nicotina

ruta de la AMPK, como era de esperar. Véase de nuevo en la **Figura 40**, como en el grupo AICAR los niveles de pAMPK y pACC son significativamente mayores que los niveles en el grupo nicotina, de la misma forma que los niveles de AMPK α 2 están significativamente disminuidos.

10.6.3.2. Activación de la autofagia

Se continúa el estudio molecular con el análisis cualitativo de las proteínas que componen la ruta de mTOR y de pUlk1 Ser 555 (efector de la autofagia fosforilado por la AMPK), a los siete días tras la isquemia.

En el grupo STD, de nuevo, se ha visto revertido el efecto de la nicotina sobre estas rutas ante el tratamiento simultáneo de nicotina y AICAR. Se puede ver en la **Figura 42** que, además del aumento estadísticamente significativo de la pmTOR y pS6K en el grupo nicotina frente al grupo vehículo a los 7 días tras la isquemia, los niveles de estas proteínas son significativamente menores en el grupo nicotina + AICAR respecto al grupo nicotina.

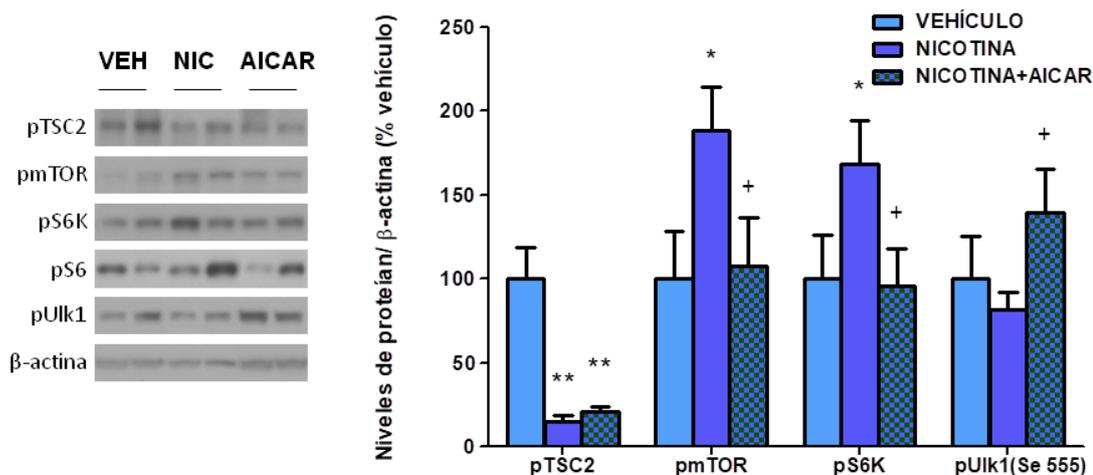


Figura 42. Efecto de AICAR sobre la ruta de mTOR y autofagia en STD a los 7 días tras la isquemia cerebral. Niveles de proteínas (panel izquierdo) e imágenes autorradiográficas representativas (panel derecho) de la ruta de mTOR y autofagia en STD (STD vehículo, STD nicotina y STD nicotina + AICAR, en el hemisferio ipsilateral). Los niveles de proteína se han calculado como % respecto al grupo vehículo de su misma dieta, y han sido previamente normalizados por los niveles de β -actina. Los datos se muestran como la media \pm SEM. * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ en comparación con el grupo STD vehículo y + $p < 0.05$ en comparación con el grupo STD nicotina; empleando el test estadístico t-Student (N=7 para cada grupo).

Además, los niveles de pUlk1 tienen un incremento estadísticamente significativo en el grupo tratado con AICAR frente al grupo nicotina, en concordancia al incremento de la ruta de

AMPK observado en dicho grupo. Se ha visto una diferencia significativa para los niveles de pTSC2 (fosforilado por AMPK) entre los grupos nicotina y nicotina + AICAR y el grupo vehículo, siendo menores en los dos primeros (**Figura 42**). Hay una mínima tendencia al incremento de los valores de esta proteína en el grupo nicotina + AICAR frente al grupo nicotina, que sería de esperar ante el incremento de pAMPK y disminución de la ruta de mTOR observados en este grupo.

10.6.3.3. Activación del ER stress

Otro estudio cualitativo que se ha realizado para ver el efecto del tratamiento con AICAR junto a la nicotina, es el de la ruta de ER stress a los 7 días tras la isquemia.

En el grupo STD, se ha visto que, en primer lugar, la nicotina reduce los niveles de la mayoría de los componentes de ER stress, respecto al grupo vehículo, a los 7 días de la isquemia (al igual que lo que se veía en el estudio a los 28 días); siendo una diferencia estadísticamente significativa en el caso de BiP, pIRE1 α , peIF2 α y pJNK. Además hay una tendencia clara a la reducción de CHOP ($p=0,08$) y, contradictoriamente, los niveles de pPERK están incrementados respecto al grupo vehículo (**Figura 43**).

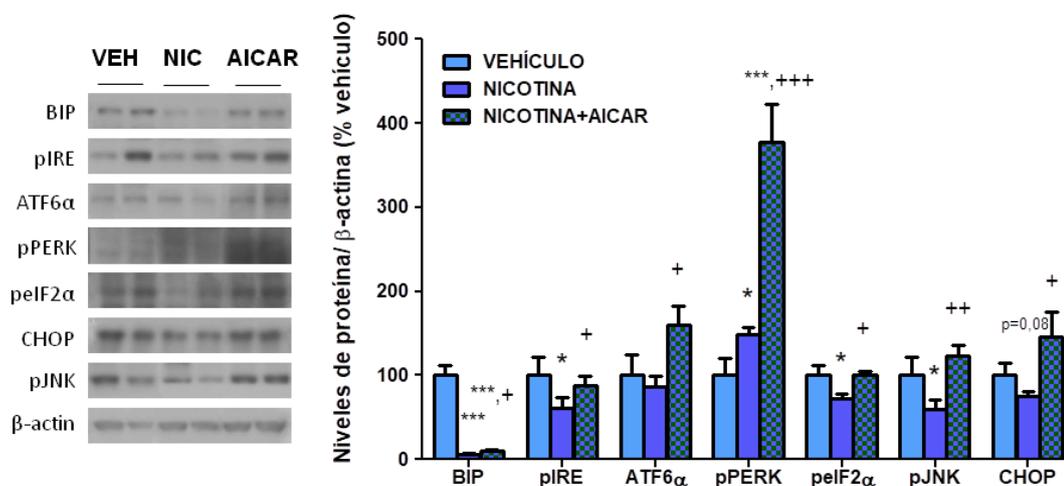


Figura 43. Efecto de AICAR sobre La ruta de ER stress en STD a los 7 días tras la isquemia cerebral. Niveles de proteínas (panel izquierdo) e imágenes autorradiográficas representativas (panel derecho) de la ruta de ER stress en STD (STD vehículo, STD nicotina + AICAR y STD nicotina + AICAR, en el hemisferio ipsilateral). Los niveles de proteína se han calculado como % respecto al grupo vehículo de su misma dieta, y han sido previamente normalizados por los niveles de β -actina. Los datos se muestran como la media \pm SEM. * $p<0.05$ ** $p<0.01$ *** $p<0.001$ en comparación con el grupo STD vehículo y + $p<0.05$ ++ $p<0.01$ +++ $p<0.001$ en comparación con el grupo STD nicotina; empleando el test estadístico t-Student (N=7 para cada grupo).

Estudio preclínico de la paradoja de la obesidad en la isquemia cerebral: efecto terapéutico del tratamiento con nicotina

En cuanto al tratamiento simultáneo de nicotina y AICAR, se observa una reversión del efecto de la nicotina sobre la ruta de ER stress, y vemos así cómo el grupo nicotina + AICAR tiene un incremento estadísticamente significativo de los valores de todos los componentes del ER stress estudiados; BiP, pIRE1 α , ATF6 α , p α IF2, pJNK y CHOP, respecto al grupo nicotina (**Figura 43**). Como el efecto de la nicotina sobre el ER stress se ve revertido bajo un activador de AMPK se podría pensar que dicho efecto de la nicotina sobre esta ruta es a través de la ruta de AMPK.

10.6.3.4. Influencia en la apoptosis

Ante el incremento de la ruta de AMPK e ER stress (incluyendo CHOP y pJNK que llevan a la apoptosis) bajo el tratamiento simultáneo de nicotina y AICAR, también se han estudiado los niveles de caspasa 3 a los 7 días tras la isquemia.

En el grupo STD, como se puede apreciar en **la Figura 44**, ya a los 7 días hay una reducción estadísticamente significativa de los niveles de caspasa 3 *cleaved* en el grupo nicotina respecto al grupo vehículo, al igual que una tendencia a la reducción de la caspasa 3 ($p=0,09$). En el caso del grupo nicotina + AICAR, se observa un incremento estadísticamente significativo de la expresión de la caspasa 3 frente al grupo nicotina, mientras que en el caso de la caspasa 3 *cleaved* se mantiene la reducción significativa respecto al grupo vehículo, al igual que el grupo nicotina.

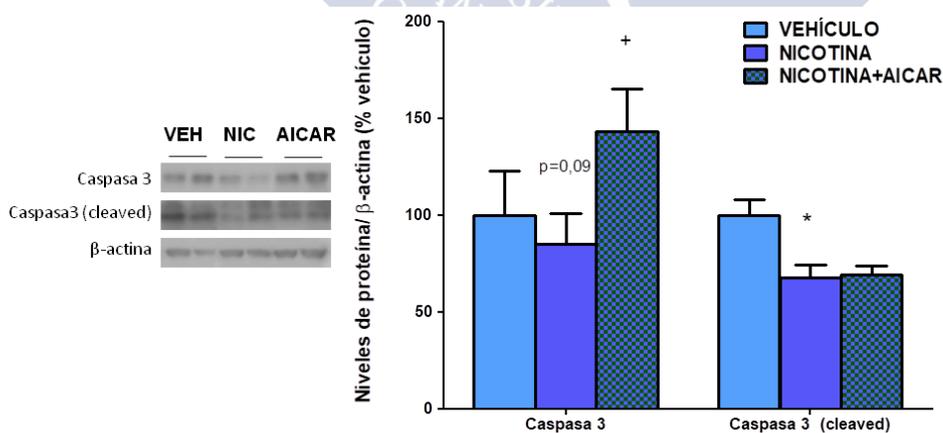


Figura 44. Efecto de AICAR sobre los niveles de caspasa 3 en STD a los 7 días tras la isquemia cerebral. Niveles de proteínas (panel izquierdo) e imágenes autorradiográficas representativas (panel derecho) de la caspasa 3 en STD (STD vehículo, STD nicotina y STD nicotina + AICAR, en el hemisferio ipsilateral). Los niveles de proteína se han calculado como % respecto al grupo vehículo de su misma dieta, y han sido previamente normalizados por los niveles de β -actina. Los datos se muestran como la media \pm SEM. * $p<0.05$ en comparación con el grupo STD vehículo y + $p<0.05$ en comparación con el grupo STD nicotina; empleando el test estadístico t-Student (N=7 para cada grupo).





INTRODUCCIÓN
HIPÓTESIS
OBJETIVOS
MATERIALES Y MÉTODOS
RESULTADOS
DISCUSIÓN
CONCLUSIONES





DISCUSIÓN

En este trabajo se ha evaluado la influencia de la obesidad inducida por dieta en un modelo de isquemia cerebral focal transitoria y se ha investigado el papel neuroprotector de la nicotina en este mismo modelo de isquemia cerebral.

➤ **Influencia de la obesidad inducida por dieta en la isquemia cerebral**

Desde hace años, el estudio del efecto nocivo de la obesidad en la salud ha sido el objetivo de numerosos estudios, viéndose que la obesidad se asocia con muchas enfermedades crónicas como la diabetes mellitus, las enfermedades cardiovasculares, accidentes cerebrovasculares, hipertensión y ciertos tipos de cáncer [121, 122, 123, 124, 125]; conduciendo al incremento de su tasa de mortalidad y morbilidad [149, 150]. Concretamente, en el caso del accidente cerebrovascular o ictus, se ha visto que la obesidad se asocia con un riesgo de padecer dicha enfermedad; por cada unidad que se incrementa el IMC desde los 20 kg/m², se incrementa un 5% el riesgo de padecer un ictus [155]. Este riesgo se puede explicar, en gran medida, por la hipercolesterolemia, hipertensión y diabetes mellitus desencadenados por la obesidad [152, 154, 155]. Ante esto, es evidente que los supervivientes de ictus obesos llevan consigo estos factores de riesgo vascular, y de ahí la peor respuesta de los mismos al tratamiento recanalizador con tPA tras un ictus [165]. De forma contradictoria, en los últimos años, hay numerosos trabajos que relacionan la obesidad con una mejor prognosis en los pacientes de diferentes enfermedades vasculares como la insuficiencia cardíaca [169], infarto agudo de miocardio [170], cirugía de bypass [171], cirugía valvular [172], enfermedad coronaria [173] y como no, el ictus o accidente cerebrovascular [161, 162, 174-177]. Esta relación inesperada entre la obesidad y una mejor prognosis se ha llamado *la paradoja de la obesidad*, aunque en el caso del ictus no todos los estudios están de acuerdo [179, 180, 181] y se ha generado un gran debate.

Teniendo en cuenta que estos estudios clínicos son meramente observacionales sin aportar ningún mecanismo causal, así como la posible existencia de sesgo de selección, en el presente estudio se ha tratado de estudiar *la paradoja de la obesidad* de forma preclínica, en el modelo de isquemia cerebral transitoria por la oclusión de la ACM mediante un filamento [110]. El objetivo final es poder entender la fisiopatología y el mecanismo molecular que está por debajo de la paradoja de la obesidad, con la finalidad de identificar nuevas dianas moleculares que puedan ser empleadas para mejorar la prognosis general del ictus isquémico, más allá de la población obesa.

Son ya muchos los estudios preclínicos que han tratado de evaluar la influencia de la obesidad en la prognosis del ictus o accidente cerebro vascular, tanto hemorrágico como

Estudio preclínico de la paradoja de la obesidad en la isquemia cerebral: efecto terapéutico del tratamiento con nicotina

isquémico, y parece haber un consenso de que la obesidad empeora el resultado tras dicha enfermedad. De forma generalizada, se ha visto el efecto nocivo de la obesidad a través del incremento de la inflamación y del empeoramiento vascular. Además de un incremento del daño isquémico, los roedores obesos suelen mostrar una mayor permeabilidad de la barrera hematoencefálica y mayor incidencia de transformación hemorrágica [186, 189, 191, 193, 194, 196, 203, 207, 208, 209], aunque esta última no se observa siempre en los modelos inducidos por dieta [208]. Quizás teniendo en cuenta el papel de la BBB en la homeostasis cerebral de iones y agua, se ha visto un incremento del edema cerebral en roedores obesos [191, 195, 196, 198, 203, 209, 210]. Mientras tanto, el daño de la sustancia blanca también está incrementado en los roedores obesos post-ictus [196]. De forma importante, el edema cerebral, la ruptura de la BBB y la transformación hemorrágica son indicadores de peor pronóstico en los pacientes.

Debido a que las mutaciones monogénicas (por ejemplo, deficientes de leptina o su receptor) que conducen a la obesidad son en realidad muy poco comunes en la población [247, 248], se ha elegido un modelo de obesidad inducida por dieta, en rata, para estudiar las diferencias de la prognosis tras un ictus respecto a un grupo control alimentado con dieta estándar. Se ha empleado una dieta con un 40% de grasa durante 12 semanas desde que los animales son destetados, de la misma forma que se ha llevado a cabo en otros estudios del grupo [320]. La mayoría de los estudios emplean dietas con un 60% de grasa, y hay que tener en cuenta la posibilidad de que el efecto nocivo encontrado sea por la composición de la dieta más que por la obesidad causada. Además, muchas veces no se observan estos resultados negativos hasta un nivel umbral de obesidad [205, 208], ignorando quizás los efectos potencialmente protectores de la obesidad. En este estudio, de la misma forma que se ha visto en los estudios previos del grupo [320], el grupo alimentado con dieta alta en grasa desencadena una serie de características propias de la obesidad. Se ha visto que, respecto al grupo con dieta estándar, el incremento de peso del grupo HFD es significativamente mayor, al igual que el peso de su grasa blanca subcutánea y epididimal. En la investigación clínica *de la paradoja de la obesidad* se ha descrito que la medida de obesidad que refleja con mayor precisión la adiposidad nociva es la medida de grasa visceral/abdominal [184, 185].

Hay que tener en cuenta que la obesidad en los modelos animales también está ligada al incremento de otros factores de riesgo de ictus como son la hipertensión, diabetes y dislipemias [195, 242, 243], dificultando el hecho de establecer una relación causal entre la prognosis tras un ictus y la obesidad por sí sola. Por otro lado, todos los estudios preclínicos que hay en la bibliografía están centrados en la evolución de la lesión isquémica dentro de las 48 h de reperfusión, un aspecto que podría explicar el por qué no se encuentra

paradoja de la obesidad en los estudios preclínicos. Además, en estos trabajos emplean técnicas histológicas o medición de volúmenes de lesión por técnicas de tinción para la evaluación del daño, sin una homogeneidad en el volumen de la lesión basal previa al tratamiento, un hecho que hace cuestionar la fiabilidad de las diferencias encontradas.

Ante esto, en este trabajo se ha estudiado la influencia de la obesidad en la prognosis hasta los 28 días tras la isquemia cerebral por tMCAO, evaluando la evolución de la lesión isquémica, del edema, de la función motora y del déficit motor y sensorial mediante el seguimiento en diferentes tiempos. Se han homogeneizado los volúmenes de lesión basales mediante imagen por resonancia magnética (mapas del coeficiente de difusión) durante la oclusión de la ACM, y se ha seguido la evolución de la lesión también por RM (secuencia T2), aportando así unos resultados más concluyentes. Lo que se ha visto es que la lesión isquémica a corto plazo no parece estar afectada por la influencia de la obesidad, ni de forma positiva ni negativa, pero, a largo plazo se ven mejores resultados (menores lesiones) en el grupo HFD respecto al STD, siendo significativos a los 14 días, un hecho que concuerda con la *paradoja de la obesidad* vista en los estudios clínicos [161, 162, 174-177] y se contrapone a los estudios preclínicos que observan peores resultados a las 24 h [202-213]. En el edema isquémico no se han observado diferencias entre el grupo HFD y STD, aunque se podría esperar que fuese el grupo HFD el de peores resultados viendo toda la bibliografía que habla de la influencia negativa de la obesidad en el mismo [191, 195, 196, 198, 203, 209, 210]. Mientras que en el test funcional no se han visto diferencias, si se observa que el déficit motor y sensorial evaluado con la escala de Bederson está significativamente mejorado, a los 7 días, en el grupo HFD, de forma paralela a los resultados vistos para la lesión isquémica.

Las consecuencias metabólicas del ictus han sido poco estudiadas preclínicamente en general, y menos aún en el contexto de la obesidad. Por ejemplo, una razón hipotética de que la obesidad es protectora en pacientes con ictus es que las reservas metabólicas presentes en la obesidad protegen contra la pérdida de peso después del accidente cerebrovascular y la pérdida de masa muscular asociada [244]. Debido a esto, y con el objetivo de poder ver el mecanismo que subyace a la leve mejoría tras la isquemia cerebral en el modelo de obesidad inducida por dieta respecto al grupo con dieta estándar, se han estudiado las rutas moleculares implicadas en el control del metabolismo energético.

La principal ruta de control de la homeostasis energética es la ruta de la AMPK [249, 250], una kinasa que responde a los bajos niveles energéticos (se activa, fosforila, por AMP y por la acción de otras kinasas) activando rutas de producción de ATP e inhibiendo rutas de consumo de ATP como la oxidación de ácidos grasos. Es coherente, por tanto, el hecho de que la pAMPK este disminuida (ruta inactivada) en un modelo de obesidad inducida por dieta debido a una ingesta calórica elevada, un hecho visto en hipotálamo y

Estudio preclínico de la paradoja de la obesidad en la isquemia cerebral:
efecto terapéutico del tratamiento con nicotina

músculo [252] o en médula espinal [253], en este último caso además asociándose a una mejor recuperación en un modelo de esclerosis múltiple. Teniendo en cuenta los múltiples estudios que apoyan la idea de que la activación de la AMPK tras un ictus isquémico (por el fallo energético e incremento de Ca^{+2}) está relacionada con la patogenia de esta enfermedad [264-266, 270-272, 275], se ha estudiado dicha kinasa y sus efectores *downstream* en el hemisferio ipsilateral, para evaluar el efecto de la obesidad en la misma dentro de la isquemia cerebral. Se ha visto que, en contraposición a lo esperado, no se observa una disminución en los niveles de pAMPK (incluso hay un ligero incremento) a los 28 días tras la isquemia, mientras que los niveles de AMPK α 2 están incrementados en el grupo HFD. Contradictoriamente, los niveles de pACC (*dowstream* AMPK) si se encuentran disminuidos en el grupo HFD. En la isquemia cerebral se activa la ruta de la AMPK como un intento de restaurar el fallo energético [254], por lo que, se podría pensar en la existencia de una sobre-expresión de la subunidad α 2 de la AMPK (implicada en el daño tras la isquemia cerebral [270]) ante la disminución de los niveles de pAMPK por la dieta HFD en el momento de la isquemia. De esta forma, una inhibición de la ruta reflejada con bajos niveles de pACC se podría ver camuflada. Por eso, se han estudiado las diferencias entre HFD y STD en los niveles de las proteínas de esta ruta a los 7 días también (datos no mostrados), viéndose que las diferencias para los niveles de las proteínas son las mismas que a los 28 días. De esta forma no se corrobora nuestra hipótesis inicial de que bajos niveles de pAMPK en el modelo de obesidad, dentro de la zona cerebral de lesión, favorezca a una mejor pronosis tras la isquemia.

La autofagia, un tipo de muerte celular que consiste en la absorción citoplasmática, está relacionada con la AMPK, que activa dicho proceso, tanto por fosforilación directa en la Ser 555 de una de las kinasas iniciadoras de dicho proceso, Ulk1, como por la inhibición del complejo TORC1, el cual en estado activo inhibe la autofagia [300] y activa la síntesis proteica a través de la pS6K [301]. En este trabajo se ha observado que la kinasa pUlk1, activada por fosforilación de la pAMPK en la Ser 555 y desencadenante de autofagia, tiende a menores valores en el grupo HFD respecto al STD, a pesar de que no se han observado diferencias para la pAMPK. Sin embargo, las proteínas pTSC2 y pRAPTOR, que también son fosforiladas por la AMPK, desencadenando la activación del complejo TORC1, no presentan diferencias entre los dos grupos de dieta, mostrando incluso una tendencia al incremento en el grupo HFD, al igual que la pAMPK. La proteína mTOR (principal componente del complejo TORC1) tiende al incremento en el grupo HFD, hecho que podría explicar en cierta medida la disminución de pUlk1 Ser 555 ya que la fosforilación inactivadora de mTOR sobre pUlk1 disminuiría los niveles de esta otra [300].

Así se corrobora de nuevo que no parece haber un efecto beneficioso de la obesidad en la isquemia cerebral a través de la actuación de la AMPK.

Diferentes estudios han demostrado la importancia del estrés del retículo endoplasmático (ER stress) en la patología de la isquemia cerebral [305, 307], al igual que en la de la obesidad [306]. En el presente trabajo no se han visto diferencias entre el grupo HFD y STD para la mayoría de proteínas que forman parte de esta ruta molecular que lleva a la apoptosis celular, e incluso hay cierta tendencia al incremento de la mayor parte de las mismas, hecho consecuente con el efecto de una dieta alta en grasa [306]. Sin embargo, se ve una disminución significativa en el grupo HFD para la p $\text{eIF}2\alpha$, a pesar de que su proteína activadora pPERK no presenta la misma tendencia. Hay que tener en cuenta que la p $\text{eIF}2\alpha$, factor de iniciación de la traducción eucariótico 2α , no solo está activado por dicha ruta [354]. Este resultado es coherente con una mejor evolución de la lesión isquémica y déficit motor y sensorial del grupo HFD, aunque la posible disminución del ER stress en el grupo HFD no parece ser la causa de dichos resultados.

Tras una isquemia cerebral, las células que no mueren por necrosis, pero están sometidas al estrés isquémico, mueren eventualmente por un proceso más organizado conocido como muerte celular programada o apoptosis. Este proceso es característico de la penumbra, y ha sido la diana terapéutica de muchos de los fármacos probados en la isquemia cerebral [41, 45]. La vía intrínseca y extrínseca de activación de la apoptosis convergen en la activación de la caspasa 3 [46, 50]. En el estudio, se ha visto que los niveles de caspasa 3, no presentan diferencias significativas entre el grupo HFD y STD, mientras que la caspasa 3 *cleaved* (activa) sí está significativamente disminuida en el grupo HFD respecto al STD a los 28 días de la isquemia, un hecho que concuerda con los resultados favorables de este grupo para los volúmenes de infarto y escala de déficit motor y sensorial a largo plazo, tras la isquemia cerebral. Tanto la ruta de la AMPK [289-296] como la de ER stress [305-307], estudiadas en este trabajo, desencadenan en la apoptosis llevada a cabo por las caspasas [43, 45-50]. Sin embargo, como no se han observado diferencias en estas rutas entre el modelo de obesidad y el grupo estándar, se podría completar este trabajo averiguando la causa de la inactivación de la apoptosis en el modelo de obesidad tras la isquemia cerebral.

El hecho de estudiar la evolución de la lesión isquémica, edema, función motora y déficit motor y sensorial, a largo plazo (durante 28 días) tras la isquemia cerebral, mientras los estudios hasta la actualidad sólo se centran en las primeras 48 horas tras la isquemia, supone una novedad en el estudio preclínico de *la paradoja de la obesidad*. De la misma forma, se ha estudiado un posible mecanismo causal, a nivel molecular, de los resultados, de forma contraria a lo que se ha visto en otros estudios que se han centrado en el daño

Estudio preclínico de la paradoja de la obesidad en la isquemia cerebral: efecto terapéutico del tratamiento con nicotina

vascular e inducción de la neuroinflamación, consecuencias previsibles de una dieta alta en grasa.

A grandes rasgos, se ha visto que la obesidad desencadena una mejor evolución en la disminución de la lesión isquémica y del déficit motor y sensorial a largo plazo, tras la isquemia cerebral, explicada por una reducción de la apoptosis reflejada con los menores niveles de la caspasa 3 *cleaved*. De esta forma, este trabajo apoya los diferentes estudios en investigación clínica que conforman *la paradoja de la obesidad* [161, 162, 174-177], y corrobora la hipótesis inicial de que, aunque la obesidad es un factor de riesgo para padecer un ictus, una vez que se sufre esta enfermedad, actúa como un indicador de buena prognosis.

➤ **Efecto neuroprotector de la nicotina en la isquemia cerebral**

El hábito de fumar, o tabaquismo, tiene consecuencias negativas sobre la salud científicamente comprobadas desde hace muchos años, sin embargo, el uso del mismo sigue creciendo globalmente [308]. Y esto se debe, en gran medida, a la nicotina, uno de los principales componentes del mismo, que tras la unión a los receptores nAChRs cerebrales activa el sistema de recompensa dopaminérgico produciendo un refuerzo rápido, es decir, la adicción [312]. Pero la activación de los receptores nAChRs no sólo activa el sistema de recompensa, sino que se ha visto que, paradójicamente, tiene efectos farmacológicos mediante la activación de los mismos en diferentes patologías, entre las que destacan las enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer o el Parkinson [311, 313, 340, 341, 343].

De la misma forma, se ha visto que la nicotina ejerce un efecto sobre la homeostasis energética. Concretamente, en anteriores estudios del grupo se ha descrito que, el tratamiento crónico periférico con nicotina reduce el peso corporal al disminuir la ingesta de alimentos y aumentar la termogénesis del tejido adiposo marrón tanto en ratas con dieta baja en grasa, como en ratas con dieta alta en grasa. Este balance energético positivo se asoció con la disminución de la activación de la AMPK hipotalámica [320]. En el presente estudio, se han observado resultados coherentes con dichos estudios previos; en los dos grupos de dieta, HFD y STD, los grupos tratados con nicotina presentan una mayor reducción del peso corporal (tras la isquemia siempre hay reducción de peso) asociada a una menor ingesta, al igual que menor cantidad de grasa blanca subcutánea y epididimal a los 28 días tras la isquemia, frente a los grupos tratados con vehículo.

Por otro lado, aunque el tabaquismo está descrito como uno de los principales factores de riesgo para padecer un ictus [323], se han visto estudios clínicos con resultados contradictorios en cuanto a la prognosis tras un ictus en pacientes fumadores [326-328] e

incluso con mejores resultados ante el tratamiento recanalizador [336-338]. De la misma forma, en la investigación preclínica, el tratamiento con nicotina *in vitro* reduce la neurotoxicidad del glutamato a través de los nAChRs $\alpha 4$ y $\alpha 7$ y de la vía PI3K-Akt inhibiendo la apoptosis [339] y el tratamiento con nicotina o con activadores del receptor $\alpha 7$ *in vivo*, tiene un efecto beneficioso sobre la recuperación tras un ictus [344, 345, 347-351]. Pocos de estos trabajos analizan la evolución de la lesión isquémica, pero cuando lo hacen, se basan en la observación histológica o de volumen de lesión mediante técnicas de tinción, a las 24 horas, y sin una homogeneidad de lesiones basales previas al tratamiento, cuestiones técnicas que ponen en interrogación la veracidad del efecto neuroprotector de la nicotina.

En esta tesis se ha llevado a cabo el tratamiento con nicotina de forma periférica en el modelo de oclusión transitoria de la ACM, mientras que en la mayoría de los estudios previos se ha visto el efecto neuroprotector de la activación del receptor nicotínico $\alpha 7$ [347-350]. Con el objetivo de testar si existe o no un verdadero efecto neuroprotector con el tratamiento de nicotina tras un ictus, se ha estudiado la evolución de la lesión isquémica, del edema, de la función motora y del déficit motor y sensorial durante 28 días. Con los mapas del coeficiente de difusión mediante RM, se han homogeneizado los volúmenes de lesión basales durante la oclusión de la ACM de forma previa al tratamiento, de los cuales se ha seguido su evolución mediante una secuencia de peso T2 en RM, aportando así unos resultados con alta fiabilidad. Lo que se ha encontrado es que la lesión isquémica está significativamente disminuida en los grupos tratados con nicotina respecto al grupo vehículo de su misma dieta desde las 24 horas tras la isquemia cerebral, al igual que lo que se ha visto por otros grupos de investigación [345], manteniéndose esta neuroprotección de la nicotina en la lesión isquémica hasta los 28 días. Además, de forma llamativa, se ha encontrado que el grupo HFD nicotina es el grupo con mejores resultados, presentando una disminución de la lesión estadísticamente significativa ante el grupo STD vehículo cuando se realiza una comparación entre los 4 grupos, mientras que este hecho no ocurre entre el HFD vehículo y el STD nicotina. Este resultado concuerda con la mejor evolución de la lesión en el modelo HFD respecto al STD. El análisis del edema isquémico ha apoyado estos resultados y se ha visto que la nicotina reduce el edema a las 24 y 72 horas. De la misma forma, los grupos tratados con nicotina tienen una tendencia a una mejor recuperación funcional y presentan un menor déficit motor y sensorial ante sus respectivos vehículos a lo largo de los 28 días, y de nuevo, también hay una tendencia en el grupo HFD nicotina a tener los mejores resultados en la comparación a 4.

En general, las consecuencias metabólicas del ictus isquémico han sido poco estudiadas preclínicamente, pero aún menos en el estudio del efecto neuroprotector de la nicotina. En la mayoría de los trabajos previos se han estudiado grandes rasgos de las

Estudio preclínico de la paradoja de la obesidad en la isquemia cerebral:
efecto terapéutico del tratamiento con nicotina

consecuencias desencadenadas por la nicotina en la isquemia cerebral; viéndose que disminuye la inflamación y apoptosis [351] o se promueve la sinapsis [344], pero sin explicar el mecanismo molecular, a través de vías de señalización molecular, por debajo de estos efectos. Además ningún trabajo relaciona estos buenos resultados moleculares con una mejoría en la evolución de la lesión isquémica. Sólo se profundiza un poco más en un estudio que relaciona la activación del sistema endocanabinoide con el efecto beneficioso de la nicotina en el volumen de lesión a las 24 horas de la tMCAO, pero en este caso se realizan un pretratamiento con nicotina [345], mientras que en este estudio se trata de evaluar el efector neuroprotector de la nicotina con el tratamiento desde 1 hora tras la reperusión.

Debido a esto, y a la implicación de la nicotina en la homeostasis energética a través del control de rutas moleculares que controlan el metabolismo energético [319, 320], se ha estudiado el mecanismo causal que subyace al efecto neuroprotector de la nicotina tras la isquemia cerebral. Ya se ha comentado que la ruta de la AMPK es una de las principales en el control de la homeostasis energética [249, 250] y, además, la activación de la AMPK (incremento de pAMPK) tras un ictus isquémico (por el fallo energético e incremento de Ca^{+2}), está relacionada con el daño cerebral de esta enfermedad [264-266, 270-272, 275]. Como ya se comentó, en trabajos previos del grupo se ha visto que la inhibición de esta ruta en el hipotálamo es el mecanismo causal de la activación de la termogénesis e inhibición de la ingesta en animales con dieta estándar y dieta alta en grasa, suponiendo la pérdida de peso de los mismos [320]. En el presente trabajo se ha visto que la nicotina inhibe la ruta de AMPK en el hemisferio ipsilateral a los 28 días tras la isquemia, de forma coherente a lo visto en hipotálamo [320]. Hay una disminución de pAMPK y pACC a pesar del incremento en la expresión de AMPK α 2 (involucrada en la patogénesis de la AMPK [270]) y ACC, que seguramente sea fruto de un intento de compensación de la inhibición de la ruta por la nicotina, puesto que en la isquemia cerebral se induce la ruta para una posible compensación energética [254].

Como se ha comentado previamente, la autofagia está relacionada con la neurodegeneración bajo el agotamiento de energía que ocurre en los mutantes de AMPK de *Drosophila* [304] y además, está bien establecido que la AMPK activa la autofagia, tanto por fosforilación directa en la Ser 555 de Ulk1, como por la inhibición del complejo TORC1 [302, 303], el cual en estado activo inhibe la autofagia [300] y activa la síntesis proteica a través de la pS6K [301]. En este estudio se ha visto la inhibición de los valores de Ulk1 fosforilada por AMPK en la Ser 555, así como el incremento de la señalización de mTOR (a través de una disminución de TSC2, fosforilado por AMPK e inhibidor de TORC1) en los grupos tratados con nicotina respecto a sus grupos vehículo, lo que sugiere

una inhibición de la autofagia por parte de la nicotina a través de la inhibición de la ruta de AMPK a los 28 días tras la isquemia.

Por otro lado, tanto en el grupo HFD como STD, se ha observado una reducción del ER stress, implicado en la fisiopatología de la isquemia cerebral [305,307], bajo el tratamiento con nicotina, un efecto de la nicotina que también se ha visto previamente en hígado [320]. El ER stress activa las proteínas CHOP y JNK y abre las puertas a la apoptosis o muerte celular programada [305, 307]. En este estudio no se observan diferencias para CHOP bajo el tratamiento con nicotina, sin embargo, los niveles de pJNK (activo) están disminuidos bajo este tratamiento.

Profundizando un poco más en el estudio de la apoptosis, uno de los principales mecanismos fisiopatológicos de la isquemia celular [41, 45, 46, 50], se ha observado que la caspasa 3 y la caspasa 3 *cleaved* (activa), efector final de la apoptosis [46, 50], están reducidas bajo el tratamiento con nicotina en ambos grupos de dieta. Tanto la ruta de la AMPK [289-296] como la de ER stress [305-307], estudiadas en este trabajo, activan la apoptosis llevada a cabo por las caspasas [43, 45-50], por lo que los resultados en la apoptosis son coherentes con los observados para estas rutas. Así, posiblemente, la inhibición por la nicotina de la AMPK e ER stress desencadene una consecuente reducción de la apoptosis.

Con el objetivo de ver si el efecto neuroprotector de la nicotina, se desencadena, o no, por la inhibición de la ruta de AMPK, se ha empleado el tratamiento con AICAR, activador de esta kinasa [264], de forma paralela al tratamiento con nicotina. Lo que se ha visto es que, efectivamente, el efecto neuroprotector se rompe ante el uso de un activador de la ruta de AMPK. Se ha visto anulada la reducción del volumen de lesión isquémica y edema por parte de la nicotina, bajo el tratamiento con AICAR, a los 7 días tras la isquemia y en ambos grupos de dietas. Además, en el grupo HFD, el tratamiento con AICAR también rompe los mejores resultados de déficit motor y sensorial bajo el tratamiento con nicotina. Por otro lado, en el grupo STD se vio que la ruta de AMPK, autofagia, ER stress y apoptosis estaban ya disminuidas bajo el tratamiento con nicotina a los 7 días tras la isquemia cerebral, de la misma forma que se ha comentado para los 28 días. Además, de forma coherente, bajo el activador de AMPK; AICAR, se ha visto cómo se restaura la inhibición de los niveles de pAMPK por la nicotina. De la misma forma, se observa una ruptura de la inhibición de la autofagia, ER stress y apoptosis en el grupo tratado con nicotina + AICAR respecto al grupo sólo tratado con nicotina. Por tanto, parece que la nicotina ejerce su papel neuroprotector a través de la inhibición de la ruta de AMPK, lo cual desencadena la inhibición de la autofagia (vía disminución de pUlk1 e incremento de la ruta de mTOR), del ER stress (se rompe su inhibición bajo un activador de AMPK por lo que su inhibición podría estar *downstream* de la inhibición de la AMPK) y de la apoptosis

Estudio preclínico de la paradoja de la obesidad en la isquemia cerebral: efecto terapéutico del tratamiento con nicotina

(vía caspasa 3). Se podría profundizar en el estudio intentando averiguar si la inhibición de la apoptosis se desencadena por el efecto directo de la inhibición de la AMPK, o si es una consecuencia de la inhibición, por parte de esta, de la ruta de mTOR o ER stress.

En este trabajo se ha averiguado, de forma innovadora, el mecanismo molecular que desencadena el efecto neuroprotector de la nicotina en la isquemia, ya descrito anteriormente en estudios *in vitro* e *in vivo* [339, 344, 345, 347-351]. Por primera vez, se ha visto que el tratamiento con nicotina tras la isquemia cerebral ejerce un papel neuroprotector en el volumen de lesión, edema y déficit motor y sensorial desde las 24 horas, y manteniéndose durante 28 días. Además, este efecto se ha relacionado con unos mejores resultados moleculares reflejados en la disminución de la apoptosis y autofagia. Y de forma más notoria todavía, se ha visto que la inhibición de la ruta de AMPK y probablemente, la inhibición del ER stress, son los responsables moleculares de los resultados comentados. De esta forma se ha corroborado la hipótesis inicial de que el papel neuroprotector de la nicotina se produce por la inhibición de la ruta de la AMPK.

Por neuroprotección se entienden diferentes estrategias que reducen el área muerta tras un evento isquémico sin afectar a la reperusión del tejido. Son muchos los compuestos que se han estudiado con el objetivo de bloquear la vía de señalización que lleva a la muerte celular inducida tras la isquemia en diferentes etapas de la cascada isquémica, pero la mayoría de estos compuestos no han mostrado efectos positivos más allá de la investigación experimental [80]. A pesar de eso, el gran potencial terapéutico de la neuroprotección hace que sea un campo activo en la investigación [81]. En este estudio se ha testado el papel neuroprotector de la nicotina en un modelo de oclusión transitoria de la ACM en rata. Pero, teniendo en cuenta los efectos nocivos de la nicotina descritos en la bibliografía [308-312, 321], lo más importante es haber averiguado el posible mecanismo molecular que subyace a dicho efecto neuroprotector; la inhibición de la ruta de la AMPK, consiguiendo así una diana molecular terapéutica para el uso de fármacos sobre la misma.

Tanto el ictus [2-6], como la obesidad [118-125], son enfermedades de gran importancia socioeconómica en la actualidad. No se debe olvidar que en este trabajo se ha corroborado, además, el efecto positivo de la nicotina anteriormente descrito sobre la homeostasis energética [320], mediante la reducción de la ingesta y su consecuente pérdida de peso en animales con dieta estándar y dieta alta en grasa. De esta forma, parece que la nicotina podría tener un papel dual como tratamiento de la isquemia cerebral y la obesidad, promoviendo la inactivación de la ruta de la AMPK en la corteza/estriado o el hipotálamo, respectivamente.





INTRODUCCIÓN
HIPÓTESIS
OBJETIVOS
MATERIALES Y MÉTODOS
RESULTADOS
DISCUSIÓN
CONCLUSIONES





CONCLUSIONES

- El grupo de obesidad inducida por dieta presenta un menor volumen de lesión a largo plazo.
- El grupo de obesidad inducida por dieta presenta un menor déficit motor y sensorial a los 7 días tras la isquemia cerebral.
- El grupo de obesidad inducida por dieta muestra una disminución de la apoptosis, mediada por la caspasa 3, en el hemisferio ipsilateral a los 28 días tras la isquemia cerebral.
- El efecto protector de la obesidad inducida por dieta tras la isquemia cerebral es independiente de la ruta de la AMPK.
- El efecto protector de la obesidad inducida por dieta no está mediado por autofagia en la isquemia cerebral.
- El ER stress no influye en el efecto protector de la obesidad inducida por dieta en la isquemia cerebral.
- El tratamiento con nicotina induce una reducción de los volúmenes de lesión isquémica a las 24 horas, manteniendo el efecto neuroprotector a lo largo de 28 días tras la isquemia cerebral.
- El tratamiento con nicotina induce una reducción del edema cerebral a las 24 y 72 horas tras la isquemia cerebral.
- El tratamiento con nicotina desencadena una tendencia a una mejor recuperación funcional y genera menor déficit motor y sensorial a lo largo de 28 días tras la isquemia cerebral.
- El tratamiento con nicotina inhibe la ruta de la AMPK en el hemisferio ipsilateral tras la isquemia cerebral.
- El uso de un activador de AMPK, AICAR, revierte el efecto neuroprotector de la nicotina incrementando el volumen de lesión y empeorando el déficit funcional y motor y sensorial.
- El tratamiento con nicotina inhibe la autofagia, a través de la inhibición de la ruta de AMPK, en el hemisferio ipsilateral del cerebro tras la isquemia cerebral.
- El tratamiento con nicotina inhibe el ER stress, a través de la inhibición de la ruta de AMPK, tras la isquemia cerebral.
- El tratamiento con nicotina reduce la apoptosis mediada por la caspasa 3, a través de la inhibición de la ruta de AMPK, en la isquemia cerebral.



BIBLIOGRAFÍA

1. 1988. The World Health Organization MONICA Project (monitoring trends and determinants in cardiovascular disease): a major international collaboration. WHO MONICA Project Principal Investigators. *J Clin Epidemiol* 41:105-114.
2. Truelsen T, Begg S and Mathers C. 2016. Global Burden of Cerebrovascular Disease. World Health Organization
www.who.int/healthinfo/statistics/bod_cerebrovasculardiseasestroke.pdf.
3. Mensar, GA, Sacco RL, Vickrey BG, Sampson UKA, Waddy S, Ovbiagele B, Feigin VL. 2015. From Data to Action: Neuroepidemiology Informs Implementation Research for Global Stroke Prevention and Treatment. *Neuroepidemiology* 45: 221-229.
4. Feigin VL, Lawes CM, Bennett DA, Anderson CS. 2003. Stroke epidemiology: a review of population-based studies of incidence, prevalence, and case-fatality in the late 20th century. *Lancet Neurol* 2:43-53.
5. INE. 2016. Defunciones Según La Causa De Muerte. Instituto Nacional de Estadística <http://www.ine.es/dynt3/inebase/index.htm?padre=1171>.
6. Diaz-Guzman J, Egado-Herrero JA, Fuentes B, Fernandez-Perez C, Gabriel-Sanchez R, Barbera G, Abilleira S. 2009. [Incidence of strokes in Spain: the Iberictus study. Data from the pilot study]. *Rev Neurol* 48:61-65.
7. Sobrino García P, García Pastor A, García Arratibel A, Vicente Peracho G, Rodriguez Cruz PM, Pérez Sánchez JR, Díaz Otero F, Vázquez Alén P, Villanueva Osorio JA, Gil Núñez A. 2013. Clasificación etiológica del ictus isquémico: comparación entre la nueva clasificación A-S-C-O y la clasificación del Grupo de Estudio de Enfermedades Cerebrovasculares de la Sociedad Española de Neurología. *Neurología* 28:417-424.
8. Rodríguez-Yáñez M, Fernández Maiztegui C, Pérez-Concha T, Castillo J, Zarranz J. 2008. Enfermedades vasculares cerebrales. *Neurología*. Elsevier España 337-411.
9. Feinberg WM, et al. 1994. Guidelines for the management of transient ischemic attacks. From the Ad Hoc Committee on Guidelines for the Management of Transient Ischemic Attacks of the Stroke Council of the American Heart Association. *Circulation* 89:2950-2965.
10. Adams HP, Jr., Bendixen BH, Kappelle LJ, Biller J, Love BB, Gordon DL, Marsh EE, 3rd. 1993. Classification of subtype of acute ischemic stroke. Definitions for use in a multicenter clinical trial. TOAST. Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment. *Stroke* 24:35-41.
11. Calandre L, Arnal C, Ortega JF, Bermejo F, Felgeroso B, del Ser T, Vallejo A. 1986. Risk factors for spontaneous cerebral hematomas. Case-control study. *Stroke* 17:1126-1128.

Estudio preclínico de la paradoja de la obesidad en la isquemia cerebral:
efecto terapéutico del tratamiento con nicotina

12. Arboix A, Garcia-Eroles L, Oliveres M, Massons JB, Targa C. 1998. Clinical predictors of early embolic recurrence in presumed cardioembolic stroke. *Cerebrovasc Dis* 8:345-353.
13. Siesjo BK. 1984. Cerebral circulation and metabolism. *J Neurosurg* 60:883-908.
14. Castillo J. 2000. Physiopathology of cerebral ischemia. *Rev Neurol* 30:459-464.
15. Pulsinelli W. 1992. Pathophysiology of acute ischaemic stroke. *Lancet* 339:533-536.
16. Heiss WD, Graf R. 1994. The ischemic penumbra. *Curr Opin Neurol* 7:11-19.
17. Astrup J, Siesjo BK, Symon L. 1981. Thresholds in cerebral ischemia - the ischemic penumbra. *Stroke* 12:723-725.
18. Hossmann KA. 1994. Viability thresholds and the penumbra of focal ischemia. *Ann Neurol* 36:557-565.
19. Ginsberg MD, Pulsinelli WA. 1994. The ischemic penumbra, injury thresholds, and the therapeutic window for acute stroke. *Ann Neurol* 36:553-554.
20. Castillo J. 1995. Intervenciones diagnósticas y terapéuticas en las primeras seis horas de la isquemia cerebral. Tiempos de latencia. Intervención prehospitalaria. *Neurología* 10 (suppl 2):1-7.
21. Astrup J, Symon L, Branston NM, Lassen NA. 1977. Cortical evoked potential and extracellular K⁺ and H⁺ at critical levels of brain ischemia. *Stroke* 8:51-57.
22. Falkowska A, Gutowska I, Goschorska M, Nowacki P, Chlubek D, Baranowska-Bosiacka I. 2015. Energy Metabolism of the Brain, Including the Cooperation between Astrocytes and Neurons, Especially in the Context of Glycogen Metabolism. *Int J Mol Sci* 16:25959-25981.
23. Bouzat P, Oddo M. 2014. Lactate and the injured brain: friend or foe? *Curr Opin Crit Care* 20:133-140.
24. Liang D, Bhatta S, Gerzanich V, Simard JM. 2007. Cytotoxic edema: mechanisms of pathological cell swelling. *Neurosurg Focus* 22:2.
25. Blank WF, Jr., Kirshner HS. 1977. The kinetics of extracellular potassium changes during hypoxia and anoxia in the cat cerebral cortex. *Brain Res* 123:113-124.
26. Bruno V, Battaglia G, Copani A, D'Onofrio M, Di Iorio P, De Blasi A, Melchiorri D, Flor PJ, Nicoletti F. 2001. Metabotropic glutamate receptor subtypes as targets for neuroprotective drugs. *J Cereb Blood Flow Metab* 21:1013-1033.
27. Ginsberg MD. 1997. Injury Mechanisms in the Ischaemic Penumbra –Approaches to Neuroprotection in Acute Ischaemic Stroke. *Cerebrovascular Diseases* 7(suppl 2):7-12.
28. Hayashi T, Abe K. 2004. Ischemic neuronal cell death and organelle damage. *Neurol Res* 26:827-834.

29. Rossi DJ, Oshima T, Attwell D. 2000. Glutamate release in severe brain ischaemia is mainly by reversed uptake. *Nature* 403:316-321.
30. Castillo J. 1999. Bioquímica de la isquemia cerebral. *Neurología* 14 (suppl 4):17-23.
31. Hardingham GE, Bading H. 2010. Synaptic versus extrasynaptic NMDA receptor signalling: implications for neurodegenerative disorders. *Nat Rev Neurosci* 11:682-696.
32. Hardingham GE, Fukunaga Y, Bading H. 2002. Extrasynaptic NMDARs oppose synaptic NMDARs by triggering CREB shut-off and cell death pathways. *Nat Neurosci* 5:405-414.
33. Lai TW, Zhang S, Wang YT. 2014. Excitotoxicity and stroke: identifying novel targets for neuroprotection. *Prog Neurobiol* 115:157-188.
34. Dawson VL, Dawson TM. 1996. Free radicals and neuronal cell death. *Cell Death Differ* 3:71-78.
35. Zhao H, Han Z, Ji X, Luo Y. 2016. Epigenetic Regulation of Oxidative Stress in Ischemic Stroke. *Aging Dis* 7:295-306.
36. Manzanero S, Santro T, Arumugam TV. 2013. Neuronal oxidative stress in acute ischemic stroke: sources and contribution to cell injury. *Neurochem Int* 62:712-718.
37. Prentice H, Modi JP, Wu JY. 2015. Mechanisms of Neuronal Protection against Excitotoxicity, Endoplasmic Reticulum Stress, and Mitochondrial Dysfunction in Stroke and Neurodegenerative Diseases. *Oxid Med Cell Longev* 2015:964518.
38. Moncada S, Higgs A. 1993. The L-arginine-nitric oxide pathway. *N Engl J Med* 329:2002-2012.
39. Samdani AF, Dawson TM, Dawson VL. 1997. Nitric oxide synthase in models of focal ischemia. *Stroke* 28:1283-1288.
40. Zhang J, Dawson VL, Dawson TM, Snyder SH. 1994. Nitric oxide activation of poly (ADP-ribose) synthetase in neurotoxicity. *Science* 263:687-689.
41. Grandati M, Verrecchia C, Revaud ML, Allix M, Boulu RG, Plotkine M. 1997. Calcium-independent NO-synthase activity and nitrites/nitrates production in transient focal cerebral ischaemia in mice. *Br J Pharmacol* 122:625-630.
42. Nogawa S, Zhang F, Ross ME, Iadecola C. 1997. Cyclo-oxygenase-2 gene expression in neurons contributes to ischemic brain damage. *J Neurosci* 17:2746-2755.
43. McDonald ES, Windebank AJ. 2000. Mechanisms of neurotoxic injury and cell death. *Neurol Clin* 18:525-540.
44. Jander S, Kraemer M, Schroeter M, Witte OW, Stoll G. 1995. Lymphocytic infiltration and expression of intercellular adhesion molecule-1 in photochemically induced ischemia of the rat cortex. *J Cereb Blood Flow Metab* 15:42-51.

Estudio preclínico de la paradoja de la obesidad en la isquemia cerebral:
efecto terapéutico del tratamiento con nicotina

45. Rami A, Agarwal R, Botez G, Winckler J. 2000. μ -Calpain activation, DNA fragmentation, and synergistic effects of caspase and calpain inhibitors in protecting hippocampal neurons from ischemic damage. *Brain Res* 866:299-312.
46. Dalkara T, Moskowitz MA. 2011. Apoptosis and Related Mechanisms in Cerebral Ischemia. *Stroke*. Elsevier Inc. Philadelphia, USA 107-121.
47. Green DR, Reed JC. 1998. Mitochondria and apoptosis. *Science* 281:1309-1312.
48. MacManus JP, Linnik MD. 1997. Gene expression induced by cerebral ischemia: an apoptotic perspective. *J Cereb Blood Flow Metab* 17:815-832.
49. Mattson MP, Culmsee C, Yu ZF. 2000. Apoptotic and antiapoptotic mechanisms in stroke. *Cell Tissue Res* 301:173-187.
50. Broughton BR, Reutens DC, Sobey CG. 2009. Apoptotic mechanisms after cerebral ischemia. *Stroke* 40:331-339.
51. Jin R, Liu L, Zhang S, Nanda A, Li G. 2013. Role of inflammation and its mediators in acute ischemic stroke. *J Cardiovasc Transl Res* 6:834-851.
52. Rawji KS, Mishra MK, Michaels NJ, Rivest S, Stys PK, Yong VW. 2016. Immunosenescence of microglia and macrophages: impact on the ageing central nervous system. *Brain* 139:653-661.
53. Xiong XY, Liu L, Yang QW. 2016. Functions and mechanisms of microglia/macrophages in neuroinflammation and neurogenesis after stroke. *Prog Neurobiol* 142:23-44.
54. Ceulemans AG, Zgavc T, Kooijman R, Hachimi-Idrissi S, Sarre S, Michotte Y. 2010. The dual role of the neuroinflammatory response after ischemic stroke: modulatory effects of hypothermia. *J Neuroinflammation* 7:74.
55. Cuartero MI, Ballesteros I, Lizasoain I, Moro MA. 2015. Complexity of the cell-cell interactions in the innate immune response after cerebral ischemia. *Brain Res* 1623:53-62
56. Marín J, Abella J, Leira R, Aneiros A, Serena J, Dávalos A, Castillo J. 2001. Marcadores bioquímicos de los signos tomográficos precoces de isquemia cerebral. *Neurología* 16:448.
57. Gu L, Jian Z, Stary C, Xiong X. 2015. T Cells and Cerebral Ischemic Stroke. *Neurochem Res* 40:1786-1791.
58. Kawano H, Kimura-Kuroda J, Komuta Y, Yoshioka N, Li HP, Kawamura K, Li Y, Raisman G. 2012. Role of the lesion scar in the response to damage and repair of the central nervous system. *Cell Tissue Res* 349:169-180.
59. Fernandez-Klett F, Priller J. 2014. The fibrotic scar in neurological disorders. *Brain Pathol* 24:404-413.

60. Hayashi T, Deguchi K, Nagotani S, Zhang H, Sehara Y, Tsuchiya A, Abe K. 2006. Cerebral ischemia and angiogenesis. *Curr Neurovasc Res* 3:119-129.
61. Machalinski B. 2014. Tissue regeneration in stroke: cellular and trophic mechanisms. *Expert Rev Neurother* 14:959-969.
62. McManus M, Liebeskind DS. 2016. Blood Pressure in Acute Ischemic Stroke. *J Clin Neurol* 12:137-146.
63. Dorado L, Millan M, Davalos A. 2014. Reperfusion therapies for acute ischemic stroke: an update. *Curr Cardiol Rev* 10:327-335.
64. Castillo J, Davalos A, Noya M. 1997. Progression of ischaemic stroke and excitotoxic aminoacids. *Lancet* 349:79-83.
65. Serena J, Leira R, Castillo J, Pumar JM, Castellanos M, Davalos A. 2001. Neurological deterioration in acute lacunar infarctions: the role of excitatory and inhibitory neurotransmitters. *Stroke* 32:1154-1161.
66. Davalos A, Castillo J, Marrugat J, Fernandez-Real JM, Armengou A, Cacabelos P, Rama R. 2000. Body iron stores and early neurologic deterioration in acute cerebral infarction. *Neurology* 54:1568-1574.
67. Castillo J, Rama R, Davalos A. 2000. Nitric oxide-related brain damage in acute ischemic stroke. *Stroke* 31:852-857.
68. Vila N, Castillo J, Davalos A, Chamorro A. 2000. Proinflammatory cytokines and early neurological worsening in ischemic stroke. *Stroke* 31:2325-2329.
69. Castillo J, Davalos A, Noya M. 1999. Aggravation of acute ischemic stroke by hyperthermia is related to an excitotoxic mechanism. *Cerebrovasc Dis* 9:22-27.
70. Leira R, Davalos A, Aneiros A, Serena J, Pumar JM, Castillo J. 2002. Headache as a surrogate marker of the molecular mechanisms implicated in progressing stroke. *Cephalalgia* 22:303-308.
71. Tanaka K, Watase K, Manabe T, Yamada K, Watanabe M, Takahashi K, Iwama H, Nishikawa T, Ichihara N, Kikuchi T, Okuyama S, Kawashima N, Hori S, Takimoto M, Wada K. 1997. Epilepsy and exacerbation of brain injury in mice lacking the glutamate transporter GLT-1. *Science* 276:1699-1702.
72. Schneider GH, Baethmann A, Kempfski O. 1992. Mechanisms of glial swelling induced by glutamate. *Can J Physiol Pharmacol* 70:334-343.
73. Castillo J, Davalos A, Noya M. 1999. Aggravation of acute ischemic stroke by hyperthermia is related to an excitotoxic mechanism. *Cerebrovasc Dis* 9:22-27.
74. DeGraba TJ. 1998. The role of inflammation after acute stroke: utility of pursuing anti-adhesion molecule therapy. *Neurology* 51:S62-68.
75. Hebert M, Lesept F, Vivien D, Macrez R. 2016. The story of an exceptional serine protease, tissue-type plasminogen activator (tPA). *Rev Neurol* 172:186-197.

Estudio preclínico de la paradoja de la obesidad en la isquemia cerebral:
efecto terapéutico del tratamiento con nicotina

76. Lees KR, Bluhmki E, von Kummer R, Brott TG, Toni D, Grotta JC, Albers GW, Kaste M, Marler JR, Hamilton SA, Tilley BC, Davis SM, Donnan GA, Hacke W, Ecass AN, Group Er-PS, Allen K, Mau J, Meier D, del Zoppo G, De Silva DA, Butcher KS, Parsons MW, Barber PA, Levi C, Bladin C, Byrnes G. 2010. Time to treatment with intravenous alteplase and outcome in stroke: an updated pooled analysis of ECASS, ATLANTIS, NINDS, and EPITHET trials. *Lancet* 375:1695-1703.
77. Wahlgren N, Ahmed N, Dávalos A, Ford GA, Grond M, Hacke W, Hennerici MG, Kaste M, Kuelkens S, Larrue V, Lees KR, Roine RO, Soenne L, Toni D, Vanhooren G; SITS-MOST investigators. 2007. Thrombolysis with alteplase for acute ischaemic stroke in the Safe Implementation of Thrombolysis in Stroke-Monitoring Study (SITS-MOST): an observational study. *Lancet* 369:275-282.
78. Lin MP, Sanossian N. 2015. Reperfusion therapy in the acute management of ischemic stroke. *Cardiol Clin* 33:99-109.
79. Rodríguez-Yáñez M, Sobrino T, Arias S, Vazquez-Herrero F, Brea D, Blanco M, Leira R, Castellanos M, Serena J, Vivancos J, Dávalos A, Castillo J. 2011. Early biomarkers of clinical-diffusion mismatch in acute ischemic stroke. *Stroke* 42:2813-2818.
80. Kaur H, Prakash A, Medhi B. 2013. Drug therapy in stroke: from preclinical to clinical studies. *Pharmacology* 92:324-334.
81. Ginsberg MD. 2008. Neuroprotection for ischemic stroke: past, present and future. *Neuropharmacology* 55:363-389.
82. Saver JL, et al. 2015. Prehospital use of magnesium sulfate as neuroprotection in acute stroke. *N Engl J Med* 372:528-536.
83. Jia M, Njapo SA, Rastogi V, Hedna VS. 2015. Taming glutamate excitotoxicity: strategic pathway modulation for neuroprotection. *CNS Drugs* 29:153-162.
84. Castillo J, Blanco M, Rodríguez-Yáñez M, Sobrino T, Leira R, Montaner J. Estrategias neuroprotectoras en tratamiento del ictus isquémico. ICG Marge, SL. Barcelona 109-124.
85. Castillo J, Loza MI, Mirelman D, Brea J, Blanco M, Sobrino T, Campos F. 2016. A novel mechanism of neuroprotection: Blood glutamate grabber. *J Cereb Blood Flow Metab* 36:292-301.
86. Weinberger JM. 2006. Evolving therapeutic approaches to treating acute ischemic stroke. *J Neurol Sci* 249:101-109.
87. Shuaib A, Lees KR, Lyden P, Grotta J, Dávalos A, Davis SM, Diener HC, Ashwood T, Wasiewski WW, Emeribe U. 2007. NXY-059 for the treatment of acute ischemic stroke. *N Engl J Med* 357:562-571.

88. Chamorro A, Amaro S, Castellanos M, Segura T, Arenillas J, Martí-Fábreas J, Gállego J7, Krupinski J, Gomis M, Cánovas D, Carné X, Deulofeu R, Román LS, Oleaga L, Torres F, Planas AM; URICO-ICTUS Investigators. 2014. Safety and efficacy of uric acid in patients with acute stroke (URICO-ICTUS): a randomised, double-blind phase 2b/3 trial. *Lancet Neurol* 13:453-460.
89. Secades JJ, Frontera G. 1995. CDP-choline: pharmacological and clinical review. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 17 Suppl B:1-54.
90. Hurtado O, Lizasoain I, Moro MA. 2011. Neuroprotection and recovery. Recent data at the bench on citicoline. *Stroke* 42:33-5.
91. Hurtado O, Cardenas A, Pradillo JM, Morales JR, Ortego F, Sobrino T, Castillo J, Moro MA, Lizasoain I. 2007. A chronic treatment with CDP-choline improves functional recovery and increases neuronal plasticity after experimental stroke. *Neurobiol Dis* 26:105-111.
92. Davalos A, Castillo J, Alvarez-Sabín J, Secades JJ, Mercadal J, López S, Cobo E, Warach S, Sherman D, Clark WM, Lozano R. 2002. Oral citicoline in acute ischemic stroke: an individual patient data pooling analysis of clinical trials. *Stroke* 33:2850-2857.
93. Davalos A, Alvarez-Sabín J, Castillo J, Díez-Tejedor E, Ferro J, Martínez-Vila E, Serena J, Segura T, Cruz VT, Masjuan J, Cobo E, Secades JJ; International Citicoline Trial on acUte Stroke (ICTUS) trial investigators. 2012. Citicoline in the treatment of acute ischaemic stroke: an international, randomised, multicentre, placebo-controlled study (ICTUS trial). *Lancet* 380:349-357.
94. Alvarez-Buylla A, Garcia-Verdugo JM. 2002. Neurogenesis in adult subventricular zone. *J Neurosci* 22:629-634.
95. Zhang ZG, Chopp M. 2009. Neurorestorative therapies for stroke: underlying mechanisms and translation to the clinic. *Lancet Neurol* 8:491-500.
96. Martí-Fábreas J, Romaguera-Ros M, Gomez-Pinedo U, Martínez-Ramírez S, Jiménez-Xarrie E, Marin R, Martí-Vilalta JL, Garcia-Verdugo JM. 2010. Proliferation in the human ipsilateral subventricular zone after ischemic stroke. *Neurology* 74:357-365.
97. Le Belle JE, Orozco NM, Paucar AA, Saxe JP, Mottahedeh J, Pyle AD, Wu H, Kornblum HI. 2011. Proliferative neural stem cells have high endogenous ROS levels that regulate self-renewal and neurogenesis in a PI3K/Akt-dependant manner. *Cell Stem Cell* 8:59-71.
98. Arenillas JF, Sobrino T, Castillo J, Davalos A. 2007. The role of angiogenesis in damage and recovery from ischemic stroke. *Curr Treat Options Cardiovasc Med* 9:205-212.

Estudio preclínico de la paradoja de la obesidad en la isquemia cerebral:
efecto terapéutico del tratamiento con nicotina

99. Brea D, Sobrino T, Ramos-Cabrer P, Castillo J. 2009. [Reorganisation of the cerebral vasculature following ischaemia]. *Rev Neurol* 49:645-654.
100. Seevinck PR, Deddens LH, Dijkhuizen RM. 2010. Magnetic resonance imaging of brain angiogenesis after stroke. *Angiogenesis* 13:101-111.
101. Sobrino T, Hurtado O, Moro MA, Rodríguez-Yáñez M, Castellanos M, Brea D, Moldes O, Blanco M, Arenillas JF, Leira R, Dávalos A, Lizasoain I, Castillo J. 2007. The increase of circulating endothelial progenitor cells after acute ischemic stroke is associated with good outcome. *Stroke* 38:2759-2764.
102. Zacharek A, Chen J, Cui X, Li A, Li Y, Roberts C, Feng Y, Gao Q, Chopp M. 2007. Angiopoietin1/Tie2 and VEGF/Flk1 induced by MSC treatment amplifies angiogenesis and vascular stabilization after stroke. *J Cereb Blood Flow Metab* 27:1684-1691.
103. Font MA, Arboix A, Krupinski J. 2010. Angiogenesis, neurogenesis and neuroplasticity in ischemic stroke. *Curr Cardiol Rev* 6:238-244.
104. Liu XS, Chopp M, Zhang RL, Hozeska-Solgot A, Gregg SC, Buller B, Lu M, Zhang ZG. 2009. Angiopoietin 2 mediates the differentiation and migration of neural progenitor cells in the subventricular zone after stroke. *J Biol Chem* 284:22680-22689.
105. Teng H, Zhang ZG, Wang L, Zhang RL, Zhang L, Morris D, Gregg SR, Wu Z, Jiang A, Lu M, Zlokovic BV, Chopp M. 2008. Coupling of angiogenesis and neurogenesis in cultured endothelial cells and neural progenitor cells after stroke. *J Cereb Blood Flow Metab* 28:764-771.
106. Chopp M, Zhang ZG, Jiang Q. 2007. Neurogenesis, angiogenesis, and MRI indices of functional recovery from stroke. *Stroke* 38:827-831.
107. Jiang Q, Zhang ZG, Ding GL, Zhang L, Ewing JR, Wang L, Zhang R, Li L, Lu M, Meng H, Arbab AS, Hu J, Li QJ, Pourabdollah Nejad D S, Athiraman H, Chopp M. 2005. Investigation of neural progenitor cell induced angiogenesis after embolic stroke in rat using MRI. *Neuroimage* 28:698-707.
108. Schmidt A, Minnerup J. 2016. Promoting recovery from ischemic stroke. *Expert Rev Neurother* 16:173-186.
109. Parr AM, Tator CH, Keating A. 2007. Bone marrow-derived mesenchymal stromal cells for the repair of central nervous system injury. *Bone Marrow Transplant* 40:609-619.
110. Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, Cummins R. 1989. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *Stroke* 20:84-91.
111. Kudo M, Aoyama A, Ichimori S, Fukunaga N. 1982. An animal model of cerebral infarction. Homologous blood clot emboli in rats. *Stroke* 13:505-508.

112. Tamura A, Graham DI, McCulloch J, Teasdale GM. 1981. Focal cerebral ischaemia in the rat: 1. Description of technique and early neuropathological consequences following middle cerebral artery occlusion. *J Cereb Blood Flow Metab* 1:53-60.
113. Chen ST, Hsu CY, Hogan EL, Maricq H, Balentine JD. 1986. A model of focal ischemic stroke in the rat: reproducible extensive cortical infarction. *Stroke* 17:738-743.
114. Orset C, Macrez R, Young AR, Panthou D, Angles-Cano E, Maubert E, Agin V, Vivien D. 2007. Mouse model of in situ thromboembolic stroke and reperfusion. *Stroke* 38:2771-2778.
115. Sharkey J, Ritchie IM, Kelly PA. 1993. Perivascular microapplication of endothelin-1: a new model of focal cerebral ischaemia in the rat. *J Cereb Blood Flow Metab* 13:865-871.
116. Zivin JA, DeGirolami U, Kochhar A, Lyden PD, Mazzarella V, Hemenway CC, Henry ME. 1987. A model for quantitative evaluation of embolic stroke therapy. *Brain Res* 435:305-309.
117. Macrae IM. 2011. Preclinical stroke research--advantages and disadvantages of the most common rodent models of focal ischaemia. *Br J Pharmacol* 164:1062-1078.
118. Rolls ET. 2007. Understanding the mechanisms of food intake and obesity. *Obes Rev* 8 Suppl 1:67-72.
119. Rossner S. 2002. Obesity: the disease of the twenty-first century. *Int J Obes Relat Metab Disord* 26 Suppl 4:S2-4.
120. Wang Y, Beydoun MA, Liang L, Caballero B, Kumanyika SK. 2008. Will all Americans become overweight or obese? estimating the progression and cost of the US obesity epidemic. *Obesity (Silver Spring)* 16:2323-2330.
121. Novelle MG, Contreras C, Romero-Pico A, Lopez M, Dieguez C. 2013. Irisin, two years later. *Int J Endocrinol* 2013:746281.
122. Medina-Gomez G, Vidal-Puig A. 2005. Gateway to the metabolic syndrome. *Nat Med* 11:602-603.
123. Fruhbeck G. 2008. Overview of adipose tissue and its role in obesity and metabolic disorders. *Methods Mol Biol* 456:1-22.
124. Calle EE, Kaaks R. 2004. Overweight, obesity and cancer: epidemiological evidence and proposed mechanisms. *Nat Rev Cancer* 4:579-591.
125. Farooqi IS. 2005. Genetic and hereditary aspects of childhood obesity. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 19:359-374.
126. Himms-Hagen J. 1976. Cellular thermogenesis. *Annu Rev Physiol* 38:315-351.
127. Rothwell NJ, Stock MJ. 1979. A role for brown adipose tissue in diet-induced thermogenesis. *Nature* 281:31-35.

Estudio preclínico de la paradoja de la obesidad en la isquemia cerebral:
efecto terapéutico del tratamiento con nicotina

128. Spiegelman BM, Flier JS. 2001. Obesity and the regulation of energy balance. *Cell* 104:531-543.
129. Barsh GS, Farooqi IS, O'Rahilly S. 2000. Genetics of body-weight regulation. *Nature* 404:644-651.
130. Schwartz MW, Woods SC, Porte D, Jr., Seeley RJ, Baskin DG. 2000. Central nervous system control of food intake. *Nature* 404:661-671.
131. Schwartz MW, Porte D, Jr. 2005. Diabetes, obesity, and the brain. *Science* 307:375-379.
132. Redinger RN. 2009. Fat storage and the biology of energy expenditure. *Transl Res* 154:52-60.
133. Friedman JM. 2009. Obesity: Causes and control of excess body fat. *Nature* 459:340-342.
134. Lopez M, Tovar S, Vazquez MJ, Williams LM, Dieguez C. 2007. Peripheral tissue-brain interactions in the regulation of food intake. *Proc Nutr Soc* 66:131-155.
135. Halford JC, Blundell JE. 2000. Pharmacology of appetite suppression. *Prog Drug Res* 54:25-58.
136. Woods SC, D'Alessio DA. 2008. Central control of body weight and appetite. *J Clin Endocrinol Metab* 93:S37-50.
137. Lopez M, Alvarez CV, Nogueiras R, Dieguez C. 2013. Energy balance regulation by thyroid hormones at central level. *Trends Mol Med* 19:418-427.
138. Woods SC. 2005. Signals that influence food intake and body weight. *Physiol Behav* 86:709-716.
139. Gibbs J, Young RC, Smith GP. 1973. Cholecystokinin elicits satiety in rats with open gastric fistulas. *Nature* 245:323-325.
140. Badman MK, Flier JS. 2005. The gut and energy balance: visceral allies in the obesity wars. *Science* 307:1909-1914.
141. Williams LM. 2012. Hypothalamic dysfunction in obesity. *Proc Nutr Soc* 71:521-533.
142. Everitt BJ, Hokfelt T. 1990. Neuroendocrine anatomy of the hypothalamus. *Acta Neurochir Suppl (Wien)* 47:1-15.
143. Kalsbeek A, Bruinstroop E, Yi CX, Klieverik LP, La Fleur SE, Fliers E. 2010. Hypothalamic control of energy metabolism via the autonomic nervous system. *Ann N Y Acad Sci* 1212:114-129.
144. Dietrich MO, Horvath TL. 2013. Hypothalamic control of energy balance: insights into the role of synaptic plasticity. *Trends Neurosci* 36:65-73.
145. Murphy M, Ebling FJ. 2011. The role of hypothalamic tri-iodothyronine availability in seasonal regulation of energy balance and body weight. *J Thyroid Res* 2011:387562.

146. Martinez de Morentin PB, Martinez-Sanchez N, Roa J, Ferno J, Nogueiras R, Tena-Sempere M, Dieguez C, Lopez M. 2014. Hypothalamic mTOR: the rookie energy sensor. *Curr Mol Med* 14:3-21.
147. Lopez M, Lelliott CJ, Vidal-Puig A. 2007. Hypothalamic fatty acid metabolism: a housekeeping pathway that regulates food intake. *Bioessays* 29:248-261.
148. Cone RD, Cowley MA, Butler AA, Fan W, Marks DL, Low MJ. 2001. The arcuate nucleus as a conduit for diverse signals relevant to energy homeostasis. *Int J Obes Relat Metab Disord* 25 Suppl 5:S63-67.
149. Berrington de Gonzalez A, et al. 2010. Body-mass index and mortality among 1.46 million white adults. *N Engl J Med* 363:2211-2219.
150. Global BMIMC, et al. 2016. Body-mass index and all-cause mortality: individual-participant-data meta-analysis of 239 prospective studies in four continents. *Lancet* 388:776-786.
151. Kopelman PG. 2000. Obesity as a medical problem. *Nature* 404:635-643.
152. Kernan WN, Inzucchi SE, Sawan C, Macko RF, Furie KL. 2013. Obesity: a stubbornly obvious target for stroke prevention. *Stroke* 44:278-286.
153. Strazzullo P, D'Elia L, Cairella G, Garbagnati F, Cappuccio FP, Scalfi L. 2010. Excess body weight and incidence of stroke: meta-analysis of prospective studies with 2 million participants. *Stroke* 41:e418-426.
154. Kurth T, Gaziano JM, Rexrode KM, Kase CS, Cook NR, Manson JE, Buring JE. 2005. Prospective study of body mass index and risk of stroke in apparently healthy women. *Circulation* 111:1992-1998.
155. Kurth T, Gaziano JM, Berger K, Kase CS, Rexrode KM, Cook NR, Buring JE, Manson JE. 2002. Body mass index and the risk of stroke in men. *Arch Intern Med* 162:2557-2562.
156. Winter Y, Rohrmann S, Linseisen J, Lanczik O, Ringleb PA, Hebebrand J, Back T. 2008. Contribution of obesity and abdominal fat mass to risk of stroke and transient ischemic attacks. *Stroke* 39:3145-3151.
157. Wormser D, Kaptoge S, Di Angelantonio E, Wood AM, Pennells L, Thompson A, Sarwar N, Kizer JR, Lawlor DA, Nordestgaard BG, Ridker P, Salomaa V, Stevens J, Woodward M, Sattar N, Collins R, Thompson SG, Whitlock G, Danesh J. 2011. Separate and combined associations of body-mass index and abdominal adiposity with cardiovascular disease: collaborative analysis of 58 prospective studies. *Lancet* 377:1085-1095.
158. Prospective Studies C, Whitlock G, Lewington S, Sherliker P, Clarke R, Emberson J, Halsey J, Qizilbash N, Collins R, Peto R. 2009. Body-mass index and cause-specific

Estudio preclínico de la paradoja de la obesidad en la isquemia cerebral:
efecto terapéutico del tratamiento con nicotina

- mortality in 900.000 adults: collaborative analyses of 57 prospective studies. *The Lancet* 373:1083-1096.
159. Ruland S, Hung E, Richardson D, Misra S, Gorelick PB. 2005. Impact of obesity and the metabolic syndrome on risk factors in African American stroke survivors: a report from the AAASPS. *Arch Neurol* 62:386-390.
 160. Razinia T, Saver JL, Liebeskind DS, Ali LK, Buck B, Ovbiagele B. 2007. Body mass index and hospital discharge outcomes after ischemic stroke. *Arch Neurol* 64:388-391.
 161. Vemmos K, Ntaios G, Spengos K, Savvari P, Vemmou A, Pappa T, Manios E, Georgiopoulos G, Alevizaki M. 2011. Association between obesity and mortality after acute first-ever stroke: the obesity-stroke paradox. *Stroke* 42:30-36.
 162. Ovbiagele B, Bath PM, Cotton D, Vinisko R, Diener HC. 2011. Obesity and recurrent vascular risk after a recent ischemic stroke. *Stroke* 42:3397-3402.
 163. Towfighi A, Ovbiagele B. 2009. The impact of body mass index on mortality after stroke. *Stroke* 40:2704-2708.
 164. Sahlin C, Sandberg O, Gustafson Y, Bucht G, Carlberg B, Stenlund H, Franklin KA. 2008. Obstructive sleep apnea is a risk factor for death in patients with stroke: a 10-year follow-up. *Arch Intern Med* 168:297-301.
 165. Sarikaya H, Elmas F, Arnold M, Georgiadis D, Baumgartner RW. 2011. Impact of obesity on stroke outcome after intravenous thrombolysis. *Stroke* 42:2330-2332.
 166. Kalichman L, Alperovitch-Najenson D, Treger I. 2016. The impact of patient's weight on post-stroke rehabilitation. *Disabil Rehabil* 38:1684-1690.
 167. Czernichow S, Ninomiya T, Huxley R, Kengne AP, Batty GD, Grobbee DE, Woodward M, Neal B, Chalmers J. 2010. Impact of blood pressure lowering on cardiovascular outcomes in normal weight, overweight, and obese individuals: the Perindopril Protection Against Recurrent Stroke Study trial. *Hypertension* 55:1193-1198.
 168. Caterson ID, Finer N, Coutinho W, Van Gaal LF, Maggioni AP, Torp-Pedersen C, Sharma AM, Legler UF, Shepherd GM, Rode RA, Perdok RJ, Renz CL, James WP; SCOUT Investigators. 2012. Maintained intentional weight loss reduces cardiovascular outcomes: results from the Sibutramine Cardiovascular OUTcomes (SCOUT) trial. *Diabetes Obes Metab* 14:523-530.
 169. Kenchaiah S, Pocock SJ, Wang D, Finn PV, Zornoff LA, Skali H, Pfeffer MA, Yusuf S, Swedberg K, Michelson EL, Granger CB, McMurray JJ, Solomon SD; CHARM Investigators. 2007. Body mass index and prognosis in patients with chronic heart failure: insights from the Candesartan in Heart failure: Assessment of Reduction in Mortality and morbidity (CHARM) program. *Circulation* 116:627-636.

170. Nikolsky E, Kimura K, Kojima S, Sakamoto T, Ishihara M, Asada Y, Tei C, Miyazaki S, Sonoda M, Tsuchihashi K, Yamagishi M, Shirai M, Hiraoka H, Honda T, Ogata Y, Ogawa H; Japanese Acute Coronary Syndrome Study (JACSS) Investigators. 2006. Impact of body mass index on outcomes after primary angioplasty in acute myocardial infarction. *Am Heart J* 151:168-175.
171. Rahmanian PB, Adams DH, Castillo JG, Chikwe J, Bodian CA, Filsoufi F. 2007. Impact of body mass index on early outcome and late survival in patients undergoing coronary artery bypass grafting or valve surgery or both. *Am J Cardiol* 100:1702-1708.
172. Florath I, Albert AA, Rosendahl UP, Hassanein WM, Bauer S, Ennker IC, Ennker JC. 2006. Body mass index: a risk factor for 30-day or six-month mortality in patients undergoing aortic valve replacement? *J Heart Valve Dis* 15:336-344.
173. Romero-Corral A, Montori VM, Somers VK, Korinek J, Thomas RJ, Allison TG, Mookadam F, Lopez-Jimenez F. 2006. Association of bodyweight with total mortality and with cardiovascular events in coronary artery disease: a systematic review of cohort studies. *Lancet* 368:666-678.
174. 2003. Poor nutritional status on admission predicts poor outcomes after stroke: observational data from the FOOD trial. *Stroke* 34:1450-1456.
175. Olsen TS, Dehlendorff C, Petersen HG, Andersen KK. 2008. Body mass index and poststroke mortality. *Neuroepidemiology* 30:93-100.
176. Doehner W, Schenkel J, Anker SD, Springer J, Audebert HJ. 2013. Overweight and obesity are associated with improved survival, functional outcome, and stroke recurrence after acute stroke or transient ischaemic attack: observations from the TEMPiS trial. *Eur Heart J* 34:268-277.
177. Sun W, Xian Y, Huang Y, Sun W, Liu R1, Li F, Wei JW, Wang JG, Liu M, Wu Y, Wong LKS, Anderson CS; ChinaQUEST Investigators. 2016. Obesity is associated with better survival and functional outcome after acute intracerebral hemorrhage. *J Neurol Sci* 370:140-144.
178. Kernan WN, Ovbiagele B, Black HR, Bravata DM, Chimowitz MI, Ezekowitz MD, Fang MC, Fisher M, Furie KL, Heck DV, Johnston SC, Kasner SE, Kittner SJ, Mitchell PH, Rich MW, Richardson D, Schwamm LH, Wilson JA; American Heart Association Stroke Council, Council on Cardiovascular and Stroke Nursing, Council on Clinical Cardiology, and Council on Peripheral Vascular Disease. 2014. Guidelines for the prevention of stroke in patients with stroke and transient ischemic attack: a guideline for healthcare professionals from the American Heart Association/American Stroke Association. *Stroke* 45:2160-2236.

Estudio preclínico de la paradoja de la obesidad en la isquemia cerebral:
efecto terapéutico del tratamiento con nicotina

179. Ryu WS, Lee SH, Kim CK, Kim BJ, Yoon BW. 2011. Body mass index, initial neurological severity and long-term mortality in ischemic stroke. *Cerebrovasc Dis* 32:170-176.
180. Kim Y, Kim CK, Jung S, Yoon BW, Lee SH. 2015. Obesity-stroke paradox and initial neurological severity. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 86:743-747.
181. Dehlendorff C, Andersen KK, Olsen TS. 2014. Body mass index and death by stroke: no obesity paradox. *JAMA Neurol* 71:978-984.
182. Banack HR, Kaufman JS. 2015. Does selection bias explain the obesity paradox among individuals with cardiovascular disease? *Ann Epidemiol* 25:342-349.
183. Sperrin M, Candlish J, Badrick E, Renehan A, Buchan I. 2016. Collider Bias Is Only a Partial Explanation for the Obesity Paradox. *Epidemiology* 27:525-530.
184. Dallongeville J, Bhatt DL, Steg PH, Ravnaud P, Wilson PW, Eagle KA, Goto S, Mas JL, Montalescot G. 2012. Relation between body mass index, waist circumference, and cardiovascular outcomes in 19,579 diabetic patients with established vascular disease: the REACH Registry. *Eur J Prev Cardiol* 19:241-249.
185. Oreopoulos A, Ezekowitz JA, McAlister FA, Kalantar-Zadeh K, Fonarow GC, Norris CM, Johnson JA, Padwal RS. 2010. Association between direct measures of body composition and prognostic factors in chronic heart failure. *Mayo Clin Proc* 85:609-617.
186. Yan BC, Park JH, Ahn JH, Kim IH, Lee JC, Yoo KY, Choi JH, Hwang IK, Cho JH, Kwon YG, Kim YM, Lee CH, Won MH. 2014. Effects of high-fat diet on neuronal damage, gliosis, inflammatory process and oxidative stress in the hippocampus induced by transient cerebral ischemia. *Neurochem Res* 39:2465-2478.
187. Yan BC, Park JH, Ahn JH, Kim IH, Lee JC, Yoo KY, Choi JH, Hwang IK, Cho JH, Kwon YG, Kim YM, Lee CH, Won MH. 2014. Effects of high-fat diet on neuronal damage, gliosis, inflammatory process and oxidative stress in the hippocampus induced by transient cerebral ischemia. *Neurochem Res* 39:2465-2478.
188. Kumari R, Willing LB, Patel SD, Krady JK, Zavadoski WJ, Gibbs EM, Vannucci SJ, Simpson IA. 2010. The PPAR-gamma agonist, darglitazone, restores acute inflammatory responses to cerebral hypoxia-ischemia in the diabetic ob/ob mouse. *J Cereb Blood Flow Metab* 30:352-360.
189. McColl BW, Rose N, Robson FH, Rothwell NJ, Lawrence CB. 2010. Increased brain microvascular MMP-9 and incidence of haemorrhagic transformation in obese mice after experimental stroke. *J Cereb Blood Flow Metab* 30:267-272.
190. Valerio A, Dossena M, Bertolotti P, Boroni F, Sarnico I, Faraco G, Chiarugi A, Frontini A, Giordano A, Liou HC, De Simoni MG, Spano P, Carruba MO, Pizzi M,

- Nisoli E. 2009. Leptin is induced in the ischemic cerebral cortex and exerts neuroprotection through NF-kappaB/c-Rel-dependent transcription. *Stroke* 40:610-617.
191. Terao S, Yilmaz G, Stokes KY, Ishikawa M, Kawase T, Granger DN. 2008. Inflammatory and injury responses to ischemic stroke in obese mice. *Stroke* 39:943-950.
192. Mayanagi K, Katakam PV, Gaspar T, Domoki F, Busija DW. 2008. Acute treatment with rosuvastatin protects insulin resistant (C57BL/6J ob/ob) mice against transient cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 28:1927-1935.
193. Nagai N, Van Hoef B, Lijnen HR. 2007. Plasminogen activator inhibitor-1 contributes to the deleterious effect of obesity on the outcome of thrombotic ischemic stroke in mice. *J Thromb Haemost* 5:1726-1731.
194. Kumari R, Willing LB, Patel SD, Baskerville KA, Simpson IA. 2011. Increased cerebral matrix metalloproteinase-9 activity is associated with compromised recovery in the diabetic db/db mouse following a stroke. *J Neurochem* 119:1029-1040.
195. Tureyen K, Bowen K, Liang J, Dempsey RJ, Vemuganti R. 2011. Exacerbated brain damage, edema and inflammation in type-2 diabetic mice subjected to focal ischemia. *J Neurochem* 116:499-507.
196. Chen J, Cui X, Zacharek A, Cui Y, Roberts C, Chopp M. 2011. White matter damage and the effect of matrix metalloproteinases in type 2 diabetic mice after stroke. *Stroke* 42:445-452.
197. Zhang L, Nair A, Krady K, Corpe C, Bonneau RH, Simpson IA, Vannucci SJ. 2004. Estrogen stimulates microglia and brain recovery from hypoxia-ischemia in normoglycemic but not diabetic female mice. *J Clin Invest* 113:85-95.
198. Vannucci SJ, Willing LB, Goto S, Alkayed NJ, Brucklacher RM, Wood TL, Towfighi J, Hurn PD, Simpson IA. 2001. Experimental stroke in the female diabetic, db/db, mouse. *J Cereb Blood Flow Metab* 21:52-60.
199. Ritter L, Davidson L, Henry M, Davis-Gorman G, Morrison H, Frye JB, Cohen Z, Chandler S, McDonagh P, Funk JL. 2011. Exaggerated neutrophil-mediated reperfusion injury after ischemic stroke in a rodent model of type 2 diabetes. *Microcirculation* 18:552-561.
200. Osmond JM, Mintz JD, Stepp DW. 2010. Preventing increased blood pressure in the obese Zucker rat improves severity of stroke. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 299:H55-61.
201. Osmond JM, Mintz JD, Dalton B, Stepp DW. 2009. Obesity increases blood pressure, cerebral vascular remodeling, and severity of stroke in the Zucker rat. *Hypertension* 53:381-386.

Estudio preclínico de la paradoja de la obesidad en la isquemia cerebral:
efecto terapéutico del tratamiento con nicotina

202. Cao XL, Du J, Zhang Y, Yan JT, Hu XM. 2015. Hyperlipidemia exacerbates cerebral injury through oxidative stress, inflammation and neuronal apoptosis in MCAO/reperfusion rats. *Exp Brain Res* 233:2753-2765.
203. Wu MH, Chio CC, Tsai KJ, Chang CP, Lin NK, Huang CC, Lin MT. 2016. Obesity Exacerbates Rat Cerebral Ischemic Injury through Enhancing Ischemic Adiponectin-Containing Neuronal Apoptosis. *Mol Neurobiol* 53:3702-3713.
204. Yang Z, Chen Y, Zhang Y, Jiang Y, Fang X, Xu J. 2014. Sevoflurane postconditioning against cerebral ischemic neuronal injury is abolished in diet-induced obesity: role of brain mitochondrial KATP channels. *Mol Med Rep* 9:843-850.
205. Langdon KD, Clarke J, Corbett D. 2011. Long-term exposure to high fat diet is bad for your brain: exacerbation of focal ischemic brain injury. *Neuroscience* 182:82-87.
206. Deutsch C, Portik-Dobos V, Smith AD, Ergul A, Dorrance AM. 2009. Diet-induced obesity causes cerebral vessel remodeling and increases the damage caused by ischemic stroke. *Microvasc Res* 78:100-106.
207. Li W, Prakash R, Chawla D, Du W, Didion SP, Filosa JA, Zhang Q, Brann DW, Lima VV, Tostes RC, Ergul A. 2013. Early effects of high-fat diet on neurovascular function and focal ischemic brain injury. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 304:R1001-1008.
208. Maysami S, Haley MJ, Gorenkova N, Krishnan S, McColl BW, Lawrence CB. 2015. Prolonged diet-induced obesity in mice modifies the inflammatory response and leads to worse outcome after stroke. *J Neuroinflammation* 12:140.
209. Deng J, Zhang J, Feng C, Xiong L, Zuo Z. 2014. Critical role of matrix metalloprotease-9 in chronic high fat diet-induced cerebral vascular remodelling and increase of ischaemic brain injury in micedagger. *Cardiovasc Res* 103:473-484.
210. Kim E, Tolhurst AT, Cho S. 2014. Deregulation of inflammatory response in the diabetic condition is associated with increased ischemic brain injury. *J Neuroinflammation* 11:83.
211. Cheon SH, Yan BC, Chen BH, Park JH, Ahn JH, Kim IH, Lee JC, Park YS, Kim MJ, Lee YL, Cho JH, Won MH. 2014. Accelerated and exacerbated effects of high dietary fat on neuronal damage induced by transient cerebral ischemia in the gerbil septum. *Endocrinol Metab (Seoul)* 29:328-335.
212. Yan BC, Park JH, Ahn JH, Kim IH, Lee JC, Yoo KY, Choi JH, Hwang IK, Cho JH, Kwon YG, Kim YM, Lee CH, Won MH. 2014. Effects of high-fat diet on neuronal damage, gliosis, inflammatory process and oxidative stress in the hippocampus induced by transient cerebral ischemia. *Neurochem Res* 39:2465-2478.

213. Park S, Kim DS, Kang S, Kwon DY. 2011. Ischemic hippocampal cell death induces glucose dysregulation by attenuating glucose-stimulated insulin secretion which is exacerbated by a high fat diet. *Life Sci* 88:766-773.
214. Vachharajani V, Russell JM, Scott KL, Conrad S, Stokes KY, Tallam L, Hall J, Granger DN. 2005. Obesity exacerbates sepsis-induced inflammation and microvascular dysfunction in mouse brain. *Microcirculation* 12:183-194.
215. Pistell PJ, Morrison CD, Gupta S, Knight AG, Keller JN, Ingram DK, Bruce-Keller AJ. 2010. Cognitive impairment following high fat diet consumption is associated with brain inflammation. *J Neuroimmunol* 219:25-32.
216. Pistell PJ, Morrison CD, Gupta S, Knight AG, Keller JN, Ingram DK, Bruce-Keller AJ. 2010. Cognitive impairment following high fat diet consumption is associated with brain inflammation. *J Neuroimmunol* 219:25-32.
217. Kumari R, Willing LB, Krady JK, Vannucci SJ, Simpson IA. 2007. Impaired wound healing after cerebral hypoxia-ischemia in the diabetic mouse. *J Cereb Blood Flow Metab* 27:710-718.
218. Zhang L, Nair A, Krady K, Corpe C, Bonneau RH, Simpson IA, Vannucci SJ. 2004. Estrogen stimulates microglia and brain recovery from hypoxia-ischemia in normoglycemic but not diabetic female mice. *J Clin Invest* 113:85-95.
219. Offner H, Subramanian S, Parker SM, Afentoulis ME, Vandenbark AA, Hurn PD. 2006. Experimental stroke induces massive, rapid activation of the peripheral immune system. *J Cereb Blood Flow Metab* 26:654-665.
220. Denes A, McColl BW, Leow-Dyke SF, Chapman KZ, Humphreys NE, Grecis RK, Allan SM, Rothwell NJ. 2011. Experimental stroke-induced changes in the bone marrow reveal complex regulation of leukocyte responses. *J Cereb Blood Flow Metab* 31:1036-1050.
221. Halberg N, Schraw TD, Wang ZV, Kim JY, Yi J, Hamilton MP, Luby-Phelps K, Scherer PE. 2009. Systemic fate of the adipocyte-derived factor adiponectin. *Diabetes* 58:1961-1970.
222. Maury E, Brichard SM. 2010. Adipokine dysregulation, adipose tissue inflammation and metabolic syndrome. *Mol Cell Endocrinol* 314:1-16.
223. Nishimura M, Izumiya Y, Higuchi A, Shibata R, Qiu J, Kudo C, Shin HK, Moskowitz MA, Ouchi N. 2008. Adiponectin prevents cerebral ischemic injury through endothelial nitric oxide synthase dependent mechanisms. *Circulation* 117:216-223.
224. Chen B, Liao WQ, Xu N, Xu H, Wen JY, Yu CA, Liu XY, Li CL, Zhao SM, Campbell W. 2009. Adiponectin protects against cerebral ischemia-reperfusion injury through anti-inflammatory action. *Brain Res* 1273:129-137.

Estudio preclínico de la paradoja de la obesidad en la isquemia cerebral:
efecto terapéutico del tratamiento con nicotina

225. Efstathiou SP, Tsioulos DI, Tsiakou AG, Gratsias YE, Pefanis AV, Mountokalakis TD. 2005. Plasma adiponectin levels and five-year survival after first-ever ischemic stroke. *Stroke* 36:1915-1919.
226. Yatomi K, Miyamoto N, Komine-Kobayashi M, Liu M, Oishi H, Arai H, Hattori N, Urabe T. 2009. Pathophysiological dual action of adiponectin after transient focal ischemia in mouse brain. *Brain Res* 1297:169-176.
227. Spranger J, Verma S, Gohring I, Bobbert T, Seifert J, Sindler AL, Pfeiffer A, Hileman SM, Tschop M, Banks WA. 2006. Adiponectin does not cross the blood-brain barrier but modifies cytokine expression of brain endothelial cells. *Diabetes* 55:141-147.
228. Lam KS, Xu A. 2005. Adiponectin: protection of the endothelium. *Curr Diab Rep* 5:254-259.
229. Gidday JM, Gasche YG, Copin JC, Shah AR, Perez RS, Shapiro SD, Chan PH, Park TS. 2005. Leukocyte-derived matrix metalloproteinase-9 mediates blood-brain barrier breakdown and is proinflammatory after transient focal cerebral ischemia. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 289:H558-568.
230. Nieman DC, Henson DA, Nehlsen-Cannarella SL, Ekkens M, Utter AC, Butterworth DE, Fagoaga OR. 1999. Influence of obesity on immune function. *J Am Diet Assoc* 99:294-299.
231. Trottier MD, Naaz A, Kacynski K, Yenumula PR, Fraker PJ. 2012. Functional capacity of neutrophils from class III obese patients. *Obesity (Silver Spring)* 20:1057-1065.
232. Trottier MD, Naaz A, Li Y, Fraker PJ. 2012. Enhancement of hematopoiesis and lymphopoiesis in diet-induced obese mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109:7622-7629.
233. Kim CK, Ryu WS, Kim BJ, Lee SH. 2013. Paradoxical effect of obesity on hemorrhagic transformation after acute ischemic stroke. *BMC Neurol* 13:123.
234. Sarikaya H, Elmas F, Arnold M, Georgiadis D, Baumgartner RW. 2011. Impact of obesity on stroke outcome after intravenous thrombolysis. *Stroke* 42:2330-2332.
235. Seet RC, Zhang Y, Wijdicks EF, Rabinstein AA. 2014. Thrombolysis outcomes among obese and overweight stroke patients: an age- and National Institutes of Health Stroke Scale-matched comparison. *J Stroke Cerebrovasc Dis* 23:1-6.
236. Suzuki M, Yamamoto D, Suzuki T, Fujii M, Suzuki N, Fujishiro M, Sakurai T, Yamada K. 2006. High fat and high fructose diet induced intracranial atherosclerosis and enhanced vasoconstrictor responses in non-human primate. *Life Sci* 80:200-204.
237. Tucsek Z, Toth P, Tarantini S, Sosnowska D, Gautam T, Warrington JP, Giles CB, Wren JD, Koller A, Ballabh P, Sonntag WE, Ungvari Z, Csiszar A. 2014. Aging exacerbates obesity-induced cerebrovascular rarefaction, neurovascular

- uncoupling, and cognitive decline in mice. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 69:1339-1352.
238. Czernichow S, Bertrais S, Blacher J, Oppert JM, Galan P, Ducimetiere P, Hercberg S, Safar M, Zureik M. 2005. Metabolic syndrome in relation to structure and function of large arteries: a predominant effect of blood pressure. A report from the SU.VI.MAX. Vascular Study. *Am J Hypertens* 18:1154-1160.
239. Lind L, Siegbahn A, Ingelsson E, Sundstrom J, Arnlov J. 2011. A detailed cardiovascular characterization of obesity without the metabolic syndrome. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 31:e27-34.
240. Selim M, Jones R, Novak P, Zhao P, Novak V. 2008. The effects of body mass index on cerebral blood flow velocity. *Clin Auton Res* 18:331-338.
241. Birdsill AC, Carlsson CM, Willette AA, Okonkwo OC, Johnson SC, Xu G, Oh JM, Gallagher CL, Kosciak RL, Jonaitis EM, Hermann BP, LaRue A, Rowley HA, Asthana S, Sager MA, Bendlin BB. 2013. Low cerebral blood flow is associated with lower memory function in metabolic syndrome. *Obesity (Silver Spring)* 21:1313-1320.
242. Ergul A, Elgebaly MM, Middlemore ML, Li W, Elewa H, Switzer JA, Hall C, Kozak A, Fagan SC. 2007. Increased hemorrhagic transformation and altered infarct size and localization after experimental stroke in a rat model type 2 diabetes. *BMC Neurol* 7:33.
243. Veglio F, Paglieri C, Rabbia F, Bisbocci D, Bergui M, Cerrato P. 2009. Hypertension and cerebrovascular damage. *Atherosclerosis* 205:331-341.
244. Scherbakov N, Dirnagl U, Doehner W. 2011. Body weight after stroke: lessons from the obesity paradox. *Stroke* 42:3646-3650.
245. Sharp FR, Jickling GC. 2014. Modeling immunity and inflammation in stroke: differences between rodents and humans? *Stroke* 45:e179-180.
246. Becker KJ. 2016. Strain-Related Differences in the Immune Response: Relevance to Human Stroke. *Transl Stroke Res* 7:303-312.
247. Matarese G, Moschos S, Mantzoros CS. 2005. Leptin in immunology. *J Immunol* 174:3137-3142.
248. Farooqi IS, O'Rahilly S. 2014. 20 years of leptin: human disorders of leptin action. *J Endocrinol* 223:T63-70.
249. Lage R, Dieguez C, Vidal-Puig A, Lopez M. 2008. AMPK: a metabolic gauge regulating whole-body energy homeostasis. *Trends Mol Med* 14:539-549.
250. Andersson U, Filipsson K, Abbott CR, Woods A, Smith K, Bloom SR, Carling D, Small CJ. 2004. AMP-activated protein kinase plays a role in the control of food intake. *J Biol Chem* 279:12005-12008.

Estudio preclínico de la paradoja de la obesidad en la isquemia cerebral:
efecto terapéutico del tratamiento con nicotina

251. Ju TC, Chen HM, Lin JT, Chang CP, Chang WC, Kang JJ, Sun CP, Tao MH, Tu PH, Chang C, Dickson DW, Chern Y. 2011. Nuclear translocation of AMPK- α potentiates striatal neurodegeneration in Huntington's disease. *J Cell Biol* 194:209-227.
252. Martin TL, Alquier T, Asakura K, Furukawa N, Preitner F, Kahn BB. 2006. Diet-induced obesity alters AMP kinase activity in hypothalamus and skeletal muscle. *J Biol Chem* 281:18933-18941.
253. Zhao Z, Sui Y, Gao W, Cai B, Fan D. 2015. Effects of diet on adenosine monophosphate-activated protein kinase activity and disease progression in an amyotrophic lateral sclerosis model. *J Int Med Res* 43:67-79.
254. Almeida A, Moncada S, Bolanos JP. 2004. Nitric oxide switches on glycolysis through the AMP protein kinase and 6-phosphofructo-2-kinase pathway. *Nat Cell Biol* 6:45-51.
255. Kleman AM, Yuan JY, Aja S, Ronnett GV, Landree LE. 2008. Physiological glucose is critical for optimized neuronal viability and AMPK responsiveness in vitro. *J Neurosci Methods* 167:292-301.
256. Zhu J, Aja S, Kim EK, Park MJ, Ramamurthy S, Jia J, Hu X, Geng P, Ronnett GV. 2012. Physiological oxygen level is critical for modeling neuronal metabolism in vitro. *J Neurosci Res* 90:422-434.
257. Culmsee C, Monnig J, Kemp BE, Mattson MP. 2001. AMP-activated protein kinase is highly expressed in neurons in the developing rat brain and promotes neuronal survival following glucose deprivation. *J Mol Neurosci* 17:45-58.
258. Wang P, Xu TY, Guan YF, Tian WW, Viollet B, Rui YC, Zhai QW, Su DF, Miao CY. 2011. Nicotinamide phosphoribosyltransferase protects against ischemic stroke through SIRT1-dependent adenosine monophosphate-activated kinase pathway. *Ann Neurol* 69:360-374.
259. Garcia-Gil M, Pesi R, Perna S, Allegrini S, Giancchini M, Camici M, Tozzi MG. 2003. 5'-aminoimidazole-4-carboxamide riboside induces apoptosis in human neuroblastoma cells. *Neuroscience* 117:811-820.
260. Nakatsu Y, Kotake Y, Hino A, Ohta S. 2008. Activation of AMP-activated protein kinase by tributyltin induces neuronal cell death. *Toxicol Appl Pharmacol* 230:358-363.
261. Zhang X, Gao R, Li J, Qi Y, Song X, Zhao L, Wang H, Pu Y, Xu K, Li J. 2010. A pharmacological activator of AMP-activated protein kinase protects hypoxic neurons in a concentration-dependent manner. *Neurochem Res* 35:1281-1289.
262. Williams T, Courchet J, Viollet B, Brenman JE, Polleux F. 2011. AMP-activated protein kinase (AMPK) activity is not required for neuronal development but regulates axogenesis during metabolic stress. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108:5849-5854.

263. Amato S, Liu X, Zheng B, Cantley L, Rakic P, Man HY. 2011. AMP-activated protein kinase regulates neuronal polarization by interfering with PI 3-kinase localization. *Science* 332:247-251.
264. McCullough LD, Zeng Z, Li H, Landree LE, McFadden J, Ronnett GV. 2005. Pharmacological inhibition of AMP-activated protein kinase provides neuroprotection in stroke. *J Biol Chem* 280:20493-20502.
265. Weisova P, Davila D, Tuffy LP, Ward MW, Concannon CG, Prehn JH. 2011. Role of 5'-adenosine monophosphate-activated protein kinase in cell survival and death responses in neurons. *Antioxid Redox Signal* 14:1863-1876.
266. Li J, Benashski SE, Venna VR, McCullough LD. 2010. Effects of metformin in experimental stroke. *Stroke* 41:2645-2652.
267. Arad M, Seidman CE, Seidman JG. 2007. AMP-activated protein kinase in the heart: role during health and disease. *Circ Res* 100:474-488.
268. Kuramoto N, Wilkins ME, Fairfax BP, Revilla-Sanchez R, Terunuma M, Tamaki K, Iemata M, Warren N, Couve A, Calver A, Horvath Z, Freeman K, Carling D, Huang L, Gonzales C, Cooper E, Smart TG, Pangalos MN, Moss SJ. 2007. Phospho-dependent functional modulation of GABA(B) receptors by the metabolic sensor AMP-dependent protein kinase. *Neuron* 53:233-247.
269. Viollet B, Athes Y, Mounier R, Guigas B, Zarrinpashneh E, Horman S, Lantier L, Hebrard S, Devin-Leclerc J, Beauloye C, Foretz M, Andreelli F, Ventura-Clapier R, Bertrand L. 2009. AMPK: Lessons from transgenic and knockout animals. *Front Biosci (Landmark Ed)* 14:19-44.
270. Li J, Zeng Z, Viollet B, Ronnett GV, McCullough LD. 2007. Neuroprotective effects of adenosine monophosphate-activated protein kinase inhibition and gene deletion in stroke. *Stroke* 38:2992-2999.
271. Venna VR, Li J, Benashski SE, Tarabishy S, McCullough LD. 2012. Preconditioning induces sustained neuroprotection by downregulation of adenosine 5'-monophosphate-activated protein kinase. *Neuroscience* 201:280-287.
272. White BJ, Tarabishy S, Venna VR, Manwani B, Benashski S, McCullough LD, Li J. 2012. Protection from cerebral ischemia by inhibition of TGFbeta-activated kinase. *Exp Neurol* 237:238-245.
273. Zhao H, Steinberg GK, Sapolsky RM. 2007. General versus specific actions of mild-moderate hypothermia in attenuating cerebral ischemic damage. *J Cereb Blood Flow Metab* 27:1879-1894.
274. Vieites-Prado A, Iglesias-Rey R, Fernandez-Susavila H, da Silva-Candal A, Rodriguez-Castro E, Grohn OH, Wellmann S, Sobrino T, Castillo J, Campos F. 2016.

Estudio preclínico de la paradoja de la obesidad en la isquemia cerebral:
efecto terapéutico del tratamiento con nicotina

- Protective Effects and Magnetic Resonance Imaging Temperature Mapping of Systemic and Focal Hypothermia in Cerebral Ischemia. *Stroke* 47:2386-2396.
275. Li J, Benashski S, McCullough LD. 2011. Post-stroke hypothermia provides neuroprotection through inhibition of AMP-activated protein kinase. *J Neurotrauma* 28:1281-1288.
276. Pellerin L, Magistretti PJ. 2012. Sweet sixteen for ANLS. *J Cereb Blood Flow Metab* 32:1152-1166.
277. Li J, McCullough LD. 2010. Effects of AMP-activated protein kinase in cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 30:480-492.
278. Zou MH, Wu Y. 2008. AMP-activated protein kinase activation as a strategy for protecting vascular endothelial function. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 35:535-545.
279. Nagata D, Mogi M, Walsh K. 2003. AMP-activated protein kinase (AMPK) signaling in endothelial cells is essential for angiogenesis in response to hypoxic stress. *J Biol Chem* 278:31000-31006.
280. Osuka K, Watanabe Y, Usuda N, Atsuzawa K, Yoshida J, Takayasu M. 2009. Modification of endothelial nitric oxide synthase through AMPK after experimental subarachnoid hemorrhage. *J Neurotrauma* 26:1157-1165.
281. Stahmann N, Woods A, Spengler K, Heslegrave A, Bauer R, Krause S, Viollet B, Carling D, Heller R. 2010. Activation of AMP-activated protein kinase by vascular endothelial growth factor mediates endothelial angiogenesis independently of nitric-oxide synthase. *J Biol Chem* 285:10638-10652.
282. Bai A, Ma AG, Yong M, Weiss CR, Ma Y, Guan Q, Bernstein CN, Peng Z. 2010. AMPK agonist downregulates innate and adaptive immune responses in TNBS-induced murine acute and relapsing colitis. *Biochem Pharmacol* 80:1708-1717.
283. Nath N, Giri S, Prasad R, Salem ML, Singh AK, Singh I. 2005. 5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleoside: a novel immunomodulator with therapeutic efficacy in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 175:566-574.
284. Myerburg MM, King JD, Jr., Oyster NM, Fitch AC, Magill A, Baty CJ, Watkins SC, Kolls JK, Pilewski JM, Hallows KR. 2010. AMPK agonists ameliorate sodium and fluid transport and inflammation in cystic fibrosis airway epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 42:676-684.
285. Blagih J, Krawczyk CM, Jones RG. 2012. LKB1 and AMPK: central regulators of lymphocyte metabolism and function. *Immunol Rev* 249:59-71.
286. Dirnagl U, Becker K, Meisel A. 2009. Preconditioning and tolerance against cerebral ischaemia: from experimental strategies to clinical use. *Lancet Neurol* 8:398-412.

287. Weisova P, Concannon CG, Devocelle M, Prehn JH, Ward MW. 2009. Regulation of glucose transporter 3 surface expression by the AMP-activated protein kinase mediates tolerance to glutamate excitation in neurons. *J Neurosci* 29:2997-3008.
288. Ward MW, Huber HJ, Weisova P, Dussmann H, Nicholls DG, Prehn JH. 2007. Mitochondrial and plasma membrane potential of cultured cerebellar neurons during glutamate-induced necrosis, apoptosis, and tolerance. *J Neurosci* 27:8238-8249.
289. Meisse D, Van de Casteele M, Beauloye C, Hainault I, Kefas BA, Rider MH, Fougere F, Hue L. 2002. Sustained activation of AMP-activated protein kinase induces c-Jun N-terminal kinase activation and apoptosis in liver cells. *FEBS Lett* 526:38-42.
290. Okoshi R, Ozaki T, Yamamoto H, Ando K, Koida N, Ono S, Koda T, Kamijo T, Nakagawara A, Kizaki H. 2008. Activation of AMP-activated protein kinase induces p53-dependent apoptotic cell death in response to energetic stress. *J Biol Chem* 283:3979-3987.
291. Faivre S, Kroemer G, Raymond E. 2006. Current development of mTOR inhibitors as anticancer agents. *Nat Rev Drug Discov* 5:671-688.
292. Meynet O, Zunino B, Happo L, Pradelli LA, Chiche J, Jacquin MA, Mondragón L, Tanti JF, Taillan B, Garnier G, Reverso-Meinietti J, Mounier N, Michiels JF, Michalak EM, Carles M, Scott CL, Ricci JE. 2013. Caloric restriction modulates Mcl-1 expression and sensitizes lymphomas to BH3 mimetic in mice. *Blood* 122:2402-2411.
293. Concannon CG, Tuffy LP, Weisova P, Bonner HP, Davila D, Bonner C, Devocelle MC, Strasser A, Ward MW, Prehn JH. 2010. AMP kinase-mediated activation of the BH3-only protein Bim couples energy depletion to stress-induced apoptosis. *J Cell Biol* 189:83-94.
294. Davila D, Connolly NM, Bonner H, Weisova P, Dussmann H, Concannon CG, Huber HJ, Prehn JH. 2012. Two-step activation of FOXO3 by AMPK generates a coherent feed-forward loop determining excitotoxic cell fate. *Cell Death Differ* 19:1677-1688.
295. Greer EL, Oskoui PR, Banko MR, Maniar JM, Gygi MP, Gygi SP, Brunet A. 2007. The energy sensor AMP-activated protein kinase directly regulates the mammalian FOXO3 transcription factor. *J Biol Chem* 282:30107-30119.
296. Leclerc GM, Leclerc GJ, Kuznetsov JN, DeSalvo J, Barredo JC. 2013. Metformin induces apoptosis through AMPK-dependent inhibition of UPR signaling in ALL lymphoblasts. *PLoS ONE* 8:e74420.
297. Hardie DG. 2011. AMP-activated protein kinase: an energy sensor that regulates all aspects of cell function. *Genes Dev* 25:1895-1908.
298. Kim J, Kundu M, Viollet B, Guan KL. 2011. AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. *Nat Cell Biol* 13:132-141.
299. Hardie DG. 2011. AMPK and autophagy get connected. *Embo j* 30:634-635.

Estudio preclínico de la paradoja de la obesidad en la isquemia cerebral:
efecto terapéutico del tratamiento con nicotina

300. Egan DF, Shackelford DB, Mihaylova MM, Gelino S, Kohnz RA, Mair W, Vasquez DS, Joshi A, Gwinn DM, Taylor R, Asara JM, Fitzpatrick J, Dillin A, Viollet B, Kundu M, Hansen M, Shaw RJ. 2011. Phosphorylation of ULK1 (hATG1) by AMP-activated protein kinase connects energy sensing to mitophagy. *Science* 331:456-461.
301. Cota D, Proulx K, Smith KA, Kozma SC, Thomas G, Woods SC, Seeley RJ. 2006. Hypothalamic mTOR signaling regulates food intake. *Science* 312:927-930.
302. Gwinn DM, Shackelford DB, Egan DF, Mihaylova MM, Mery A, Vasquez DS, Turk BE, Shaw RJ. 2008. AMPK phosphorylation of raptor mediates a metabolic checkpoint. *Mol Cell* 30:214-226.
303. Inoki K, Ouyang H, Zhu T, Lindvall C, Wang Y, Zhang X, Yang Q, Bennett C, Harada Y, Stankunas K, Wang CY, He X, MacDougald OA, You M, Williams BO, Guan KL. 2006. TSC2 integrates Wnt and energy signals via a coordinated phosphorylation by AMPK and GSK3 to regulate cell growth. *Cell* 126:955-968.
304. Poels J, Spasic MR, Gistelink M, Mutert J, Schellens A, Callaerts P, Norga KK. 2012. Autophagy and phagocytosis-like cell cannibalism exert opposing effects on cellular survival during metabolic stress. *Cell Death Differ* 19:1590-1601.
305. Xin Q, Ji B, Cheng B, Wang C, Liu H, Chen X, Chen J, Bai B. 2014. Endoplasmic reticulum stress in cerebral ischemia. *Neurochem Int* 68:18-27.
306. Hotamisligil GS. 2010. Endoplasmic reticulum stress and the inflammatory basis of metabolic disease. *Cell* 140:900-917.
307. Kim I, Xu W, Reed JC. 2008. Cell death and endoplasmic reticulum stress: disease relevance and therapeutic opportunities. *Nat Rev Drug Discov* 7:1013-1030.
308. Mackay J, Eriksen MP. 2002. The tobacco atlas. World Health Organization, Geneva.
309. Hecht SS, Hoffmann D. 1989. The relevance of tobacco-specific nitrosamines to human cancer. *Cancer Surv* 8:273-294.
310. USDHHS (U.S. Department of Health and Human Services). 2000. Reducing tobacco use: a report of the surgeon general. Centers for Disease Control and Prevention, National Center for Chronic Disease Prevention and Health Promotion, Office on Smoking and Health, Atlanta, GA.
311. Quik M, Kulak JM. 2002. Nicotine and nicotinic receptors; relevance to Parkinson's disease. *Neurotoxicology* 23:581-594.
312. Benowitz NL. 1990. Clinical pharmacology of inhaled drugs of abuse: implications in understanding nicotine dependence. *NIDA Res Monogr* 99:12-29.
313. Albuquerque EX, Pereira EF, Alkondon M, Rogers SW. 2009. Mammalian nicotinic acetylcholine receptors: from structure to function. *Physiol Rev* 89:73-120.

314. Zoli M, Pistillo F, Gotti C. 2015. Diversity of native nicotinic receptor subtypes in mammalian brain. *Neuropharmacology* 96:302-311.
315. Dietrich MO, Horvath TL. 2012. Limitations in anti-obesity drug development: the critical role of hunger-promoting neurons. *Nat Rev Drug Discov* 11:675-691.
316. Malik VS, Willett WC, Hu FB. 2013. Global obesity: trends, risk factors and policy implications. *Nat Rev Endocrinol* 9:13-27.
317. Filozof C, Fernandez Pinilla MC, Fernandez-Cruz A. 2004. Smoking cessation and weight gain. *Obes Rev* 5:95-103.
318. Mineur YS, Abizaid A, Rao Y, Salas R, DiLeone RJ, Gündisch D, Diano S, De Biasi M, Horvath TL, Gao XB, Picciotto MR. 2011. Nicotine decreases food intake through activation of POMC neurons. *Science* 332:1330-1332.
319. Martínez de Morentin PB, Whittle AJ, Fernø J, Nogueiras R, Diéguez C, Vidal-Puig A, López M. 2012. Nicotine Induces Negative Energy Balance Through Hypothalamic AMP-Activated Protein Kinase. *Diabetes* 61:807-817.
320. Seoane-Collazo P, Martínez de Morentin PB, Ferno J, Dieguez C, Nogueiras R, Lopez M. 2014. Nicotine improves obesity and hepatic steatosis and ER stress in diet-induced obese male rats. *Endocrinology* 155:1679-1689.
321. Howard G, Wagenknecht LE, Burke GL, Diez-Roux A, Evans GW, McGovern P, Nieto FJ, Tell GS. 1998. Cigarette smoking and progression of atherosclerosis: The Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study. *Jama* 279:119-124.
322. Teo KK, et al. 2006. Tobacco use and risk of myocardial infarction in 52 countries in the INTERHEART study: a case-control study. *Lancet* 368:647-658.
323. O'Donnell MJ, Xavier D, Liu L, Zhang H, Chin SL, Rao-Melacini P, Rangarajan S, Islam S, Pais P, McQueen MJ, Mondo C, Damasceno A, Lopez-Jaramillo P, Hankey GJ, Dans AL, Yusuf K, Truelsen T, Diener HC, Sacco RL, Ryglewicz D, Czlonkowska A, Weimar C, Wang X, Yusuf S; INTERSTROKE investigators. 2010. Risk factors for ischaemic and intracerebral haemorrhagic stroke in 22 countries (the INTERSTROKE study): a case-control study. *Lancet* 376:112-123.
324. Kinjo K, et al. 2005. Impact of smoking status on long-term mortality in patients with acute myocardial infarction. *Circ J* 69:7-12.
325. Rea TD, Heckbert SR, Kaplan RC, Smith NL, Lemaitre RN, Psaty BM. 2002. Smoking status and risk for recurrent coronary events after myocardial infarction. *Ann Intern Med* 137:494-500.
326. Hankey GJ, Jamrozik K, Broadhurst RJ, Forbes S, Burvill PW, Anderson CS, Stewart-Wynne EG. 2000. Five-year survival after first-ever stroke and related prognostic factors in the Perth Community Stroke Study. *Stroke* 31:2080-2086.

Estudio preclínico de la paradoja de la obesidad en la isquemia cerebral:
efecto terapéutico del tratamiento con nicotina

327. Dhamoon MS, Tai W, Boden-Albala B, Rundek T, Paik MC, Sacco RL, Elkind MS. 2007. Risk of myocardial infarction or vascular death after first ischemic stroke: the Northern Manhattan Study. *Stroke* 38:1752-1758.
328. Kim J, Gall SL, Dewey HM, Macdonell RA, Sturm JW, Thrift AG. 2012. Baseline smoking status and the long-term risk of death or nonfatal vascular event in people with stroke: a 10-year survival analysis. *Stroke* 43:3173-3178.
329. Grines CL, Topol EJ, O'Neill WW, George BS, Kereiakes D, Phillips HR, Leimberger JD, Woodlief LH, Califf RM. 1995. Effect of cigarette smoking on outcome after thrombolytic therapy for myocardial infarction. *Circulation* 91:298-303.
330. Kirtane AJ, Martinezclark P, Rahman AM, Ray KK, Karpaliotis D, Murphy SA, Giugliano RP, Cannon CP, Antman EM, Roe MT, Harrington RA, Ohman EM, Braunwald E, Gibson CM. 2005. Association of smoking with improved myocardial perfusion and the angiographic characterization of myocardial tissue perfusion after fibrinolytic therapy for ST-segment elevation myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 45:321-323.
331. Aune E, Roislien J, Mathisen M, Thelle DS, Otterstad JE. 2011. The "smoker's paradox" in patients with acute coronary syndrome: a systematic review. *BMC Med* 9:97.
332. Sambola A, Osende J, Hathcock J, Degen M, Nemerson Y, Fuster V, Crandall J, Badimon JJ. 2003. Role of risk factors in the modulation of tissue factor activity and blood thrombogenicity. *Circulation* 107:973-977.
333. Barua RS, Sy F, Srikanth S, Huang G, Javed U, Buhari C, Margosan D, Ambrose JA. 2010. Effects of cigarette smoke exposure on clot dynamics and fibrin structure: an ex vivo investigation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 30:75-79.
334. Meade TW, Imeson J, Stirling Y. 1987. Effects of changes in smoking and other characteristics on clotting factors and the risk of ischaemic heart disease. *Lancet* 2:986-988.
335. Kufner A, Nolte CH, Galinovic I, Brunecker P, Kufner GM, Endres M, Fiebach JB, Ebinger M. 2013. Smoking-thrombolysis paradox: recanalization and reperfusion rates after intravenous tissue plasminogen activator in smokers with ischemic stroke. *Stroke* 44:407-413.
336. Moulin S, Padjen-Bogosavljevic V, Marichal A, Cordonnier C, Jovanovic DR, Gautier S, Henon H, Beslac-Bumbasirevic L, Bordet R, Leys D. 2012. Influence of differences in case mix on the better outcome of smokers after intravenous thrombolysis for acute cerebral ischemia. *Eur Neurol* 67:178-183.

337. Aries MJ, Uyttenboogaart M, Koch MW, Langedijk M, Vroomen PC, Luijckx GJ, De Keyser J. 2009. Does smoking influence outcome after intravenous thrombolysis for acute ischaemic stroke? *Eur J Neurol* 16:819-822.
338. Meseguer E, Labreuche J, Gonzalez-Valcarcel J, Sirimarco G, Guidoux C, Cabrejo L, Lavallee PC, Klein IF, Amarenco P, Mazighi M. 2014. The smoking paradox: impact of smoking on recanalization in the setting of intra-arterial thrombolysis. *Cerebrovasc Dis Extra* 4:84-91.
339. Akaike A, Takada-Takatori Y, Kume T, Izumi Y. 2010. Mechanisms of neuroprotective effects of nicotine and acetylcholinesterase inhibitors: role of alpha4 and alpha7 receptors in neuroprotection. *J Mol Neurosci* 40:211-216.
340. Baron JA. 1986. Cigarette smoking and Parkinson's disease. *Neurology* 36:1490-1496.
341. Clemens P, Baron JA, Coffey D, Reeves A. 1995. The short-term effect of nicotine chewing gum in patients with Parkinson's disease. *Psychopharmacology (Berl)* 117:253-256.
342. Ciobica A, Padurariu M, Hritcu L. 2012. The effects of short-term nicotine administration on behavioral and oxidative stress deficiencies induced in a rat model of Parkinson's disease. *Psychiatr Danub* 24:194-205.
343. O'Neill MJ, Murray TK, Lakics V, Visanji NP, Duty S. 2002. The role of neuronal nicotinic acetylcholine receptors in acute and chronic neurodegeneration. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord* 1:399-411.
344. Gonzalez CL, Gharbawie OA, Kolb B. 2006. Chronic low-dose administration of nicotine facilitates recovery and synaptic change after focal ischemia in rats. *Neuropharmacology* 50:777-787.
345. Chen Y, Nie H, Tian L, Tong L, Yang L, Lao N, Dong H, Sang H, Xiong L. 2013. Nicotine-induced neuroprotection against ischemic injury involves activation of endocannabinoid system in rats. *Neurochem Res* 38:364-370.
346. Yang JT, Chang CN, Wu JH, Chung CY, Weng HH, Cheng WC, Lee TH. 2008. Cigarette smoking decreases neurotrophin-3 expression in rat hippocampus after transient forebrain ischemia. *Neurosci Res* 60:431-438.
347. Duris K, Manaenko A, Suzuki H, Rolland WB, Krafft PR, Zhang JH. 2011. alpha7 nicotinic acetylcholine receptor agonist PNU-282987 attenuates early brain injury in a perforation model of subarachnoid hemorrhage in rats. *Stroke* 42:3530-3536.
348. Krafft PR, Altay O, Rolland WB, Duris K, Lekic T, Tang J, Zhang JH. 2012. alpha7 nicotinic acetylcholine receptor agonism confers neuroprotection through GSK-3beta inhibition in a mouse model of intracerebral hemorrhage. *Stroke* 43:844-850.

Estudio preclínico de la paradoja de la obesidad en la isquemia cerebral:
efecto terapéutico del tratamiento con nicotina

349. Sun F, Jin K, Uteshev VV. 2013. A type-II positive allosteric modulator of alpha7 nAChRs reduces brain injury and improves neurological function after focal cerebral ischemia in rats. *PLoS ONE* 8:e73581.
350. Wang H, Yu M, Ochani M, Amella CA, Tanovic M, Susarla S, Li JH, Wang H, Yang H, Ulloa L, Al-Abed Y, Czura CJ, Tracey KJ. 2003. Nicotinic acetylcholine receptor alpha7 subunit is an essential regulator of inflammation. *Nature* 421:384-388.
351. Han Z, Li L, Wang L, Degos V, Maze M, Su H. 2014. Alpha-7 nicotinic acetylcholine receptor agonist treatment reduces neuroinflammation, oxidative stress, and brain injury in mice with ischemic stroke and bone fracture. *J Neurochem* 131:498-508.
352. Guan YZ, Jin XD, Guan LX, Yan HC, Wang P, Gong Z, Li SJ, Cao X, Xing YL, Gao TM. 2015. Nicotine inhibits microglial proliferation and is neuroprotective in global ischemia rats. *Mol Neurobiol* 51:1480-1488.
353. Schaar KL, Brenneman MM, Savitz SI. 2010. Functional assessments in the rodent stroke model. *Exp Transl Stroke Med* 2:13.
354. Clemens MJ. 2001. Initiation factor eIF2 alpha phosphorylation in stress responses and apoptosis. *Prog Mol Subcell Biol* 27:57-89.

