



Universitat Autònoma de Barcelona

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  http://cat.creativecommons.org/?page_id=184

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>

WARNING. The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>



**Universitat Autònoma
de Barcelona**

Departamento de Farmacología, de Terapéutica y de Toxicología

**INFLUENCIA DEL PEROXINITRITO EN
LOS CAMBIOS VASCULARES
OBSERVADOS TRAS LA ISQUEMIA
CEREBRAL FOCAL EN RATA**

TESIS DOCTORAL 2016

Yara Onetti Vilalta



**Universitat Autònoma
de Barcelona**

**INFLUENCIA DEL PEROXINITRITO EN
LOS CAMBIOS VASCULALES
OBSERVADOS TRAS LA ISQUEMIA
CEREBRAL FOCAL EN RATA**

Tesis Doctoral presentada por: Yara Onetti Vilalta

PARA ACCEDER AL TÍTULO DE DOCTORA DENTRO DEL PROGRAMA
DE DOCTORADO DE FARMACOLOGÍA DEL DEPARTAMENTO DE
FARMACOLOGÍA, DE TERAPÉUTICA Y DE TOXICOLOGÍA DE LA
UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA

Dirigida por: Elisabet Vila Calsina y Francesc Jiménez Altayó

UNIDAD DE FARMACOLOGÍA, FACULTAD DE MEDICINA

Bellaterra, 2016



Universitat Autònoma de Barcelona

ELISABET VILA CALSINA, Catedrática del Departament de Farmacologia, Terapèutica i Toxicologia de la Universitat Autònoma de Barcelona y **FRANCESC JIMÉNEZ ALTAYÓ**, profesor agregado interino del Departamento de Farmacología, de Terapéutica i de Toxicología de la Universitat Autònoma de Barcelona

CERTIFICAN:

Que el trabajo de investigación denominado *Influencia del peroxinitrito en los cambios vasculares observados tras la isquemia cerebral focal en rata*, elaborado por Yara Onetti Vilalta para optar al grado de Doctora, ha sido realizado bajo su dirección en el Departament de Farmacologia, Terapèutica i Toxicologia de la Universitat Autònoma de Barcelona y reúne los requisitos necesarios para su defensa.

Y para que conste, expedimos el presente certificado en Bellaterra, a 12 de julio de 2016

Dra. Elisabet Vila Calsina

Dr. Francesc Jiménez Altayó

Doctoranda Yara Onetti Vilalta

Esta tesis se ha realizado gracias a una Ayuda a la investigación (SAF2010-19282) y a una beca predoctoral de Formación de Personal Universitario del Ministerio de Educación y Ciencia

ÍNDICE

ABREVIATURAS	17
INTRODUCCIÓN	25
1. Estructura arterial	27
1.1 Túnicas arteriales	27
1.1.1 Túnica íntima	27
1.1.2 Túnica media	28
1.1.3 Túnica adventicia	29
1.2 Matriz extracelular	31
2. Regulación de la función vascular cerebral	32
2.1 Contracción	32
2.2 Relajación	34
2.2.1 Óxido nítrico (NO)	36
2.2.2 Hiperpolarización derivada del endotelio (EDH)	39
2.3 Respuesta miogénica	43
2.4 Influencia del endotelio en la función vascular	44
2.5 Influencia de las especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno (RONS) en la función vascular	45
2.5.1 Anión superóxido (O_2^-)	46
2.5.2 Peróxido de hidrógeno (H_2O_2)	48
2.5.3 Radical hidroxilo (OH^-)	49
2.5.4 Peroxinitrito ($ONOO^-$)	49
3. Isquemia cerebral	52
3.1 Irrigación cerebral	53
3.2 Fisiopatología	54
3.3 Reperfusión e hiperemia reactiva	58

3.4	Implicación de las RONS en la I/R	60
3.5	Remodelado vascular en la I/R	61
3.5.1	RONS y remodelado vascular	63
3.5.2	Cambios estructurales en la I/R	64
3.5.3	Cambios mecánicos en la I/R	65
3.6	Respuesta miogénica en la I/R: papel del ONOO ⁻	66
3.7	Tratamiento farmacológico en la isquemia cerebral	68
3.7.1	Fármacos antioxidantes	69
3.7.2	El ácido úrico (AU)	70
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS		75
MATERIAL Y MÉTODOS		79
<hr/>		
1.	Modelo de isquemia cerebral focal	81
2.	Medición del flujo sanguíneo cerebral	82
3.	Tratamiento farmacológico	83
4.	Evaluación del daño neurológico	84
5.	Preparación del tejido y del plasma	85
6.	Evaluación del volumen de infarto cerebral	88
7.	Evaluación <i>in vitro</i> de la capacidad del AU para atravesar la barrera hematoencefálica	88
8.	Determinación de los niveles de AU en plasma y cerebro	91
9.	Determinación de los niveles plasmáticos de nitritos	92
10.	Determinación de los niveles plasmáticos de citoquinas	93

11. Medidas en ACM	95
11.1 Miografía de presión	95
11.1.1 Características generales	95
11.1.2 Estudios estructurales, mecánicos y de tono miogénico	96
11.1.2.1 Parámetros estructurales	97
11.1.2.2 Parámetros mecánicos	99
11.1.2.3 Parámetros miogénicos	101
11.2 Determinación de la producción de O ₂ ⁻	101
11.3 Inmunofluorescencia	102
11.3.1 ACM	102
11.3.2 Cerebro	104
11.4 Estudio del contenido de actina endotelial	105
11.5 Estudio de la estructura general y de la distribución celular tridimensional	107
11.6 Análisis de los niveles de ARNm	109
11.7 Estudios de reactividad vascular	113
12. Medidas en células HMVEC	116
12.1 Modelo de hipoxia/reperfusión	116
12.2 <i>Western blot</i>	117
12.3 Cuantificación del <i>ratio</i> F-/G-actina	119
12.4 <i>Pull down</i> de RhoA activa	119
12.5 Inmunofluorescencia	121

13. Soluciones	122
13.1 Fisiológicas	122
13.2 RT-qPCR	123
13.3 Paraformaldehído	124
13.4 Determinación de nitritos	124
13.5 <i>Western blot</i>	124
14. Fármacos y reactivos	125
15. Expresión de los datos y análisis estadístico	126

Capítulo I. Participación del peroxinitrito en los cambios estructurales, mecánicos y miogénicos en arteria cerebral

media tras la isquemia cerebral focal: efecto del ácido úrico	127
--	------------

Resultados	129
1. Efecto de la I/R en los parámetros fisiológicos y corporales	129
2. Efecto del AU sobre el volumen de infarto cerebral y el daño neurológico	129
3. Efecto de la I/R sobre la producción de ONOO ⁻ en ACM y cerebro	133
4. Efecto de la I/R sobre la producción vascular de NO	136
5. Efecto de la I/R sobre la producción vascular de O ₂ ⁻	140
6. Cambios inducidos por I/R en los niveles de ARNm y en la expresión vascular de gp91 ^{phox} y p22 ^{phox}	142
7. Cambios inducidos por I/R en la estructura de la ACM	145
8. Cambios inducidos por I/R en la mecánica de la ACM	149

9. Cambios inducidos por I/R en las propiedades miogénicas de la ACM	151
10. Cambios inducidos por I/R en la distribución celular tridimensional de la ACM	153
11. Influencia de la I/R en la expresión vascular de ERK1/2 fosforilada	155
12. Efecto de la I/R en la producción plasmática de citoquinas/quimiocinas	157
13. Cambios inducidos por la I/R en la respuesta inflamatoria vascular	159
14. Permeabilidad del AU en el parénquima cerebral	165
Discusión	168
Capítulo II. Participación del peroxinitrito en la relajación de la arteria cerebral media tras la isquemia cerebral focal	175
<hr/>	
Resultados	177
1. Impacto de la I/R y la exposición a ONOO ⁻ sobre la nitrosilación endotelial	177
2. Influencia de la I/R sobre la relajación de la ACM	180
3. Efecto de los inhibidores de los canales de K _{Ca} sobre la vasorrelajación mediada por EDH tras la I/R	184
4. Efecto de la H/R sobre la activación de la vía de señalización de la Rho quinasa en células HMVEC	187

5. Influencia de la I/R sobre la expresión vascular de los canales SK _{Ca}	189
6. Impacto de la desestructuración de la F-actina endotelial sobre la vasorrelajación mediada por EDH	191
7. Impacto del ONOO ⁻ sobre la vasorrelajación mediada por EDH	195
8. Influencia de la H/R sobre el contenido de F-actina en células HMVEC	198
9. Influencia de la I/R sobre el contenido de F-actina endotelial	201
10. Efecto del tratamiento con FeTPPS sobre la vasorrelajación mediada por EDH tras la I/R	204
Discusión	206
DISCUSIÓN GENERAL	213
CONCLUSIONES	219
BIBLIOGRAFÍA	225

ABREVIATURAS

3-NT: 3-nitrotirosina

ACM: arteria cerebral media

ADN: ácido desoxirribonucleico

ADNc: ADN complementario

ANOVA: análisis de la varianza

ARN: ácido ribonucleico

ARNm: ARN mensajero

ARNt: ARN total

AST: área de la sección transversal

ATP: adenosina trifosfato

AU: ácido úrico

BK_{Ca}: K_{Ca} de conductancia larga

BHE: barrera hematoencefálica

CA: célula adventicia

CE: célula endotelial

CLM: cadena ligera de la miosina

CML: célula muscular lisa

COX: ciclooxigenasa

DAG: diacilglicerol

DMEM: medio de cultivo Eagle modificado por Dulbecco con nutrientes F-12

dNTPs: desoxinucleótidos trifosfato

EDH: hiperpolarización derivada del endotelio

EDHF: factor hiperpolarizante derivado del endotelio

EDTA: ácido etilendiaminotetraacético

EGTA: etilén glicol-bis(2-aminoetiléter)-N,N,N',N'-ácido tetraacético

eNOS: NOS endotelial

ET: endotelina

ET-1: endotelina isoforma 1

ET-A: receptor de ET subtipo A

F-actina: filamento de actina

FCLM: fosfatasa de la CLM

FeTPPS: 5,10,15,20-Tetrakis (4-sulfonatophenyl) porphyrinato *de* hierro (III)

FSC: flujo sanguíneo cerebral

G-actina: actina globular

GMPc: guanosina monofosfato cíclico

GTP: guanosina trifosfato

HE: hidroetidina

HEPES: ácido 4-(2-hidroxietil)-piperacín-1-etano-sulfónico

H₂O₂: peróxido de hidrógeno

HMVEC: células endoteliales de microvasos humanos

Hoechst: 2'-(4-etoxifenil)-5-(4-metil-1-piperacínil)-2,5'-bi-1H-benzimidazol

HPLC: cromatografía líquida de alta eficacia

HR: hiperemia reactiva

H/R: hipoxia reoxigenación

IK_{Ca}: K_{Ca} de conductancia intermedia

IL: interleuquina

iNOS: NOS inducible

IP₃: inositol 1,4,5- trifosfato

ICAM-1: molécula de adhesión intracelular-1

I/R: isquemia-reperfusión

K_{Ca}: canales de K⁺ activados por Ca²⁺

KCLM: quinasa de la CLM

KH: solución de Krebs-Henseleit

K_{ir}: canal rectificador de potasio

L-NAME: N^ω-nitro-L-arginina metil éster

MEC: matriz extracelular

MMP: metaloproteinasa de matriz

MMP-9: metaloproteinasa de matriz tipo 9

NADPH: nicotinamida adenina dinucleótido fosfato, forma reducida

NEDA: dihidroclorato N-(1-Naftil)-etilendiamina

nNOS: NOS neuronal

NO: óxido nítrico

NO₂⁻: nitrito

NOS: sintasa de óxido nítrico

O₂⁻: anión superóxido

OCT: Optimum Cutting Temperature

OH⁻: radical hidroxilo

ONOO⁻: peroxinitrito

PAMPA-BBB: membranas artificiales en paralelo que simulan la BHE

PBS: tampón fosfato salino

PBST-0.1: PBS + TWEEN 20 al 0.1%

PBST-0.3: PBS + TWEEN 20 al 0.3%

PE: conjugado estreptavidina-ficoeritrina

Pe: permeabilidad *in vitro*

PFA: paraformaldehído

PGI₂: prostaciclina

RBD: dominio de unión a Rho-GTP

RNasa: ribonucleasa

RNS: especies reactivas de nitrógeno

ROI: región de interés

RONS: especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno

ROS: especies reactivas de oxígeno

RS: retículo sarcoplasmático

rt-PA: activador tisular del plasminógeno recombinante

RT-qPCR: reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa, en tiempo real

SBF: suero bobino fetal

SD: Sprague-Dawley

SDS: dodecil sulfato de sodio

SK_{Ca}: K_{Ca} de conductancia pequeña

SLIGRL: Ser-Leu-Ile-Gly-Arg-Leu-NH₂

SOD: superóxido dismutasa

T^a: temperatura

Taq: ADN polimerasa termoestable

TGF-β: factor de crecimiento transformante-β

TNF-α: factor de necrosis tumoral-α

TP: receptor de TXA₂

Tris: tris-hidroximetil-aminoetano

TTC: cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolio

TWEEN 20: polioxietilén(20) sorbitán monolaurato

TXA₂: tromboxano A₂

U46619: 9,11-Dideoxi-9 α 11 α -metano-epoxi prostaglandina F2 α

VEH: vehículo

WB: *Western blot*

XO: xantina oxidasa

INTRODUCCIÓN

1. ESTRUCTURA ARTERIAL

La estructura general de la pared vascular es muy similar en todos los tipos arteriales. Sin embargo, según el territorio vascular analizado, la proporción de algunos de sus elementos puede variar. Las arterias se componen fundamentalmente de 3 capas o tunicas concéntricas: una interna o íntima, una central o media y una capa más externa denominada adventicia (Figura 1). Cada capa de células se encuentra embebida en la matriz extracelular (MEC), que sirve de soporte y de comunicación entre las células.

1.1 Tunicas arteriales

1.1.1 Túnica íntima

La túnica íntima es la capa interna del vaso que se encuentra en contacto directo con la sangre circulante. Está formada por el endotelio y la lámina basal que limita con la lámina elástica interna. El endotelio es una monocapa de células epiteliales planas cuyo espesor es de 0.2-0.4 μm , su ancho de 10 μm y su longitud aproximada de 100 μm . Esta monocapa de células endoteliales (CE) descansa sobre la membrana basal, rica en colágeno, elastina, fibronectina, laminina y proteoglicanos (Sumpio y cols., 2002; Benton y cols., 2009). A su vez, la membrana basal descansa sobre una lámina elástica interna muy fina y fenestrada (Lee, 1995; Briones y cols., 2003; 2007; Caracuel y cols., 2012), que separa la túnica íntima de la media. Las CE están unidas entre sí mediante uniones ocluyentes, uniones tiponexo y uniones estrechas (Telo y cols., 1997; Bazzoni y Dejana, 2004). La tasa de renovación de las CE en condiciones normales es muy baja (de dos a tres años), salvo en los puntos

de ramificación, donde la actividad mitótica es algo mayor. El endotelio no consiste únicamente en una barrera física que separa la sangre de los tejidos y que facilita el intercambio selectivo de sustancias, sino que es un órgano muy importante que participa en muchos procesos metabólicos y funcionales. Las CE son capaces de detectar cambios en la presión arterial, en el aporte de oxígeno y en el flujo sanguíneo, y responden a ello segregando sustancias que modulan el tono del músculo liso vascular, como endotelinas (ET), óxido nítrico (NO) y prostaciclina (PGI₂). Estos factores liberados por el endotelio También participan en la regulación de la homeostasis, la respuesta inflamatoria, la coagulación, la angiogénesis, la defensa inmune, la producción de factores de crecimiento y la formación de la matriz extracelular (Sumpio y cols., 2002; Félétou y cols., 2011; Garland y Weston, 2011; Szabó y Papapetropoulos, 2011).

1.1.2 Túnica media

La túnica media es la capa vascular de mayor grosor. Está formada predominantemente por células musculares lisas (CML) fusiformes dispuestas circular o helicoidalmente en 2-3 capas, hasta 40 en las arterias más grandes, alrededor del lumen del vaso. Estas células, cuyo diámetro es de 2-5 µm y su longitud de 20-60 µm, tienen un único núcleo central y se encuentran embebidas en una MEC rica en elastina y colágeno (Figura 1). La túnica media, además de servir como soporte muscular de la pared arterial, es la encargada de la actividad vasomotora, de manera que, la contracción o relajación de las CML afecta al diámetro interno del vaso. El aparato contráctil se encuentra en el interior de las CML y está formado por filamentos finos de actina y gruesos

de miosina. Una característica destacable de las CML es la presencia de uniones tipo nexo entre células vecinas, que aseguran una unidad funcional y que facilitan la coordinación de la contracción (Lagaud y cols., 2002; Brisset y cols., 2009). Asimismo, las CML pueden mantener contacto con las CE a través de las fenestras de la lámina elástica interna (Wong y Langille, 1996; Guo y cols., 2008). La proporción de tejido conectivo y de CML varía según el diámetro del vaso y su función.

1.1.3 Túnica adventicia

La túnica adventicia es la capa más alejada de la luz del vaso. Está formada por tejido conectivo (colágeno y elastina), fibroblastos de orientación longitudinal y otros tipos celulares como mastocitos, macrófagos y células ganglionares. Una membrana, denominada lámina elástica externa, separa esta capa de la túnica media (Figura 1). A través de la túnica adventicia penetra una red de vasos de calibre muy pequeño denominados *vasa vasorum* y las fibras nerviosas que inervan el músculo liso de las arterias (Hirst y Edwards, 1989; Boysen y cols., 2009). Los *vasa vasorum* ocasionalmente penetran en la túnica media y su función parece estar relacionada con el metabolismo de la pared (Stefanadis y cols., 1995; Stenmark y cols., 2013). Estos vasos no se encuentran en las arterias más delgadas, que obtienen el oxígeno por difusión desde la luz vascular. Tradicionalmente se consideraba que la función principal de la túnica adventicia era ejercer de soporte estructural de los vasos sanguíneos. No obstante, recientemente se ha sugerido que esta capa podría jugar un papel importante en la regulación del tono vascular y en la patogenia de algunas enfermedades cardiovasculares como la arterioesclerosis (Michel y

cols., 2007; Yamashita y cols., 2008), la hipertensión (Arribas y cols., 1997a; b; Kantachuesiri y cols., 2001; Herrmann y cols., 2005; Stenmark y cols., 2013) y la isquemia cerebral (Jiménez-Altayó y cols., 2007; 2009).

A pesar de que esta disposición en tres capas es común a todos los vasos sanguíneos, existen diferencias en relación a la función de cada región del árbol circulatorio y de cada sistema (venas, arterias y vasos linfáticos), pudiendo variar, entre otros parámetros, el grosor de cada capa o el grado de inervación de los tejidos (Stevens y Lowe, 1998).

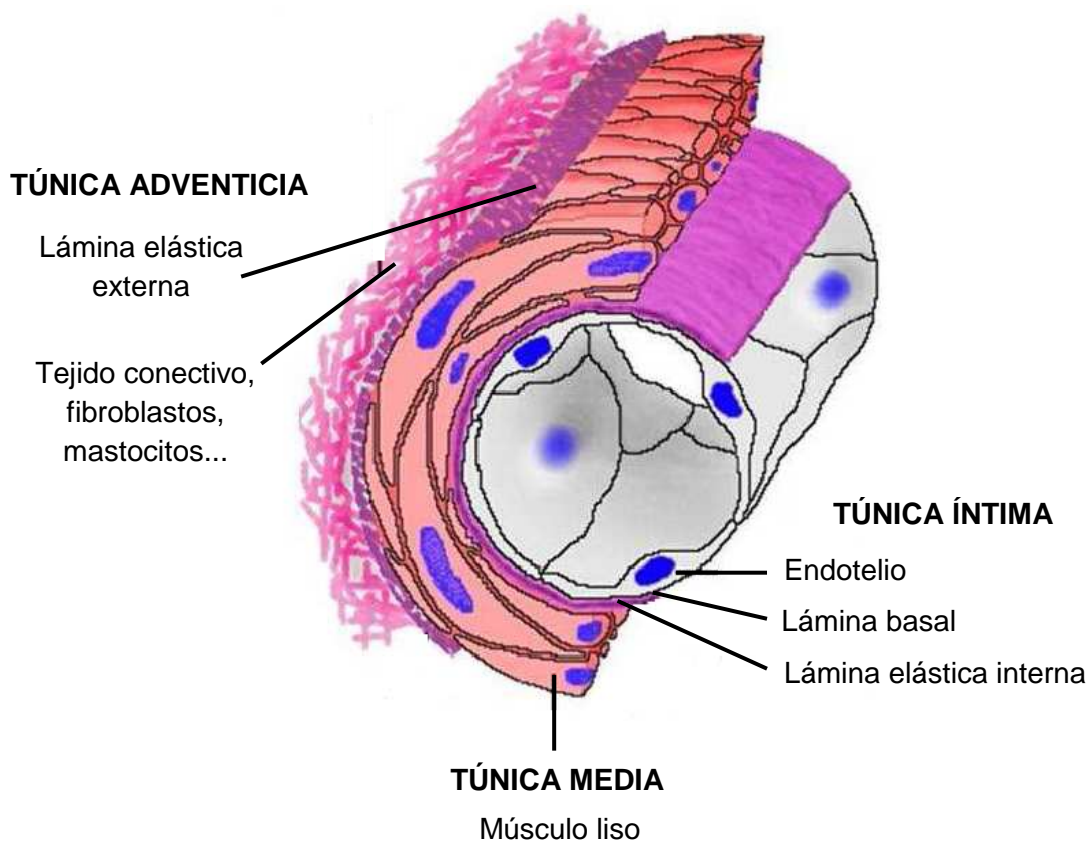


Figura 1. Diagrama representativo de la estructura arterial. (adaptado de <http://www.lab.anhb.uwa.edu.au/mb140>).

1.2 Matriz extracelular

La MEC, además de ser un almacén estructural esencial para las propiedades funcionales de la pared vascular, está implicada en la mecánica y en la función vascular, modulando también la respuesta a factores patológicos. La MEC confiere las propiedades de elasticidad y de resistencia al estiramiento y participa en la hidratación, filtración de iones, interacción con células y en la disponibilidad de factores de crecimiento. Las moléculas de la MEC son sintetizadas por los tres tipos celulares vasculares: CE, CML y células adventicias (CA). La cantidad de cada componente de la MEC es diferente para cada tejido, pero estas proporciones pueden variar cuando se produce daño vascular (Briones y cols., 2010; Márquez-Martín y cols., 2012). A lo largo de la vida adulta, la pared vascular se encuentra expuesta a múltiples factores como la deposición de lípidos, hipoxia, secreción de enzimas, producción de radicales libres y elevación de la presión arterial, que pueden dañar la MEC. En respuesta a estos factores, las CML pueden sintetizar, no sólo moléculas de la MEC, sino también inhibidores de las enzimas que la degradan, cambiando su composición y su organización tridimensional. Esta nueva MEC no es tan adecuada funcionalmente como la sintetizada durante la etapa fetal, lo que produce alteraciones en la función vascular normal (Arribas y cols., 2006; Wight, 2008; Wagenseil y Mecham, 2009; Eble y Niland, 2009; Briones y cols., 2010; Márquez-Martín y cols., 2012; Dantas y cols., 2014). Las proteínas más importantes de la MEC son el colágeno y la elastina, cuyas fibras se encuentran embebidas en un gel viscoelástico constituido por agua, además de proteoglicanos, glicoproteínas e integrinas, que son componentes que se encuentran en menor proporción.

2 REGULACIÓN DE LA FUNCIÓN VASCULAR CEREBRAL

La función vascular está regulada, entre otros, por distintos factores locales (músculo liso, endotelio), sistémicos (sistema renina-angiotensina-aldosterona), y nerviosos (sistema nervioso autónomo) que provocarán la contracción o relajación del músculo liso vascular (Satre y cols., 2010).

2.1 Contracción

La contracción de las arterias se realiza en el músculo liso. Las CML contienen filamentos de actina y de miosina que constituyen un aparato contráctil paralelo a la longitud de la célula. La contracción requiere consumo de adenosina trifosfato (ATP) y está impulsada por la interacción entre las cabezas de miosina y actina adyacentes, de manera que la cabeza de actina se desliza sobre el filamento de miosina provocando el acortamiento de la CML y, como consecuencia, la disminución del calibre del vaso sanguíneo (Rang y cols, 2016).

La contracción de la musculatura lisa vascular está regulada por el nivel de Ca^{2+} intracelular (Figura 2). La estimulación contráctil activa la liberación de Ca^{2+} de los depósitos intracelulares y/o la entrada de éste desde el espacio extracelular, desencadenando así un aumento de Ca^{2+} citosólico. Existen varios mecanismos que impulsan este proceso. Así, la activación, por agonistas de naturaleza contráctil, de receptores acoplados a proteína G, como los adrenérgicos, el receptor del tromboxano A_2 (TP) y el de la ET-1 (ET-A), promueve la activación de la fosfolipasa C que genera diacilglicerol (DAG) e inositol 1,4,5- trifosfato (IP_3) a partir de fosfatidil inositol 4,5-bifosfato. El DAG, a

su vez, estimula la proteína quinasa C, mientras que el IP_3 promueve la liberación de Ca^{2+} desde el retículo sarcoplasmático (RS) por activación del receptor- IP_3 de membrana del RS. Además, este Ca^{2+} desencadena un cambio en el potencial de equilibrio de la membrana plasmática, cambio que también se consigue mediante determinados iones, como el K^+ , que entran en la célula a través de canales iónicos específicos. Dicha despolarización de membrana provoca la apertura de los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje tipo L, dando lugar a la entrada de más Ca^{2+} al interior de la célula (Rang y cols, 2016). El incremento de Ca^{2+} citosólico propicia la formación del complejo Ca^{2+} -calmodulina (Ca^{2+} -CaM) que activará la quinasa de la cadena ligera de la miosina (KCLM; Cheung, 1980). Cuando la KCLM se fosforila, la cabeza de la miosina interactúa con el filamento de actina y el vaso sanguíneo se contrae. En algunas CML la fosforilación se mantiene a bajos niveles en ausencia de estímulos, estado que se conoce como tono basal del músculo liso (Rang y cols, 2016).

La finalización de la estimulación contráctil se produce por una disminución de la concentración citosólica de Ca^{2+} , que a su vez reduce la actividad de la KCLM y permite la activación de la fosfatasa de la CLM (FCLM), enzima que desfosforila la CLM. Así, la cabeza de la miosina se disocia de la actina y, por lo tanto, el músculo liso vuelve a su estado basal.

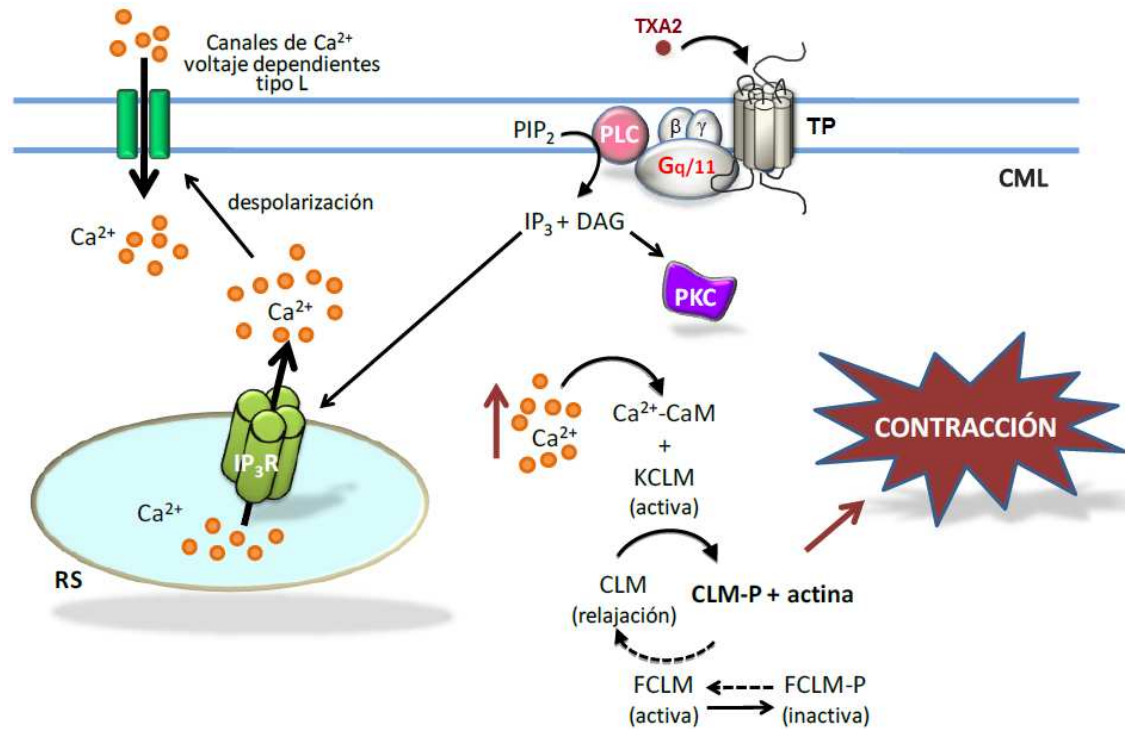


Figura 2. Regulación de la contracción del músculo liso vascular (adaptado de Flacco, 2014). CaM: calmodulina; CLM: cadena ligera de miosina; CML: célula muscular lisa; DAG: diacilglicerol; FCLM: fosfatasa de CLM; IP₃: inositol 1,4,5- trifosfato; IP₃R: receptor de IP₃; KCLM: quinasa de CLM; P: estado fosforilado; PIP₂: fosfatidil inositol 4,5-bifosfato; PKC: proteína quinasa C; PLC: fosfolipasa C; RS: retículo sarcoplásmico; TXA₂: tromboxano A₂; TP: receptor del TXA₂. Flecha continua: contracción; flecha punteada: relajación.

2.2 Relajación

La relajación del músculo liso tiene lugar tras la retirada del estímulo contráctil o por acción de compuestos que inhiben la maquinaria contráctil, como el NO y el factor hiperpolarizante derivado del endotelio (EDHF). Para que tenga lugar la relajación, se debe producir una reducción de los niveles de Ca²⁺ intracelular y un aumento de la actividad de la FCLM (Rang y cols, 2016).

Existen varios mecanismos implicados en la disminución del Ca^{2+} citosólico, que citamos a continuación (Figura 3). En la membrana del RS, la ATPasa de Ca^{2+} dependiente de Mg^{2+} , cuando está fosforilada, bombea Ca^{2+} desde el citosol al lumen del RS. Varias proteínas del RS como la calsecuestrina y la calreticulina se unen a Ca^{2+} , favoreciendo así la disminución de Ca^{2+} citosólico. La membrana plasmática también contiene una ATPasa de Ca^{2+} dependiente de Mg^{2+} y un transportador de intercambio (antiporte) de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ que bombean Ca^{2+} al espacio extracelular. Otro mecanismo adicional para reducir el flujo de Ca^{2+} es la inhibición de los canales de Ca^{2+} voltaje dependientes tipo L (Rang y cols, 2016).

El adenosín monofosfato cíclico es el principal mediador de la relajación inducida por agonistas β -adrenérgicos, mientras que la guanosina monofosfato cíclico (GMPc) interviene en la relajación inducida por NO, entre otros (Carvajal y cols., 2000).

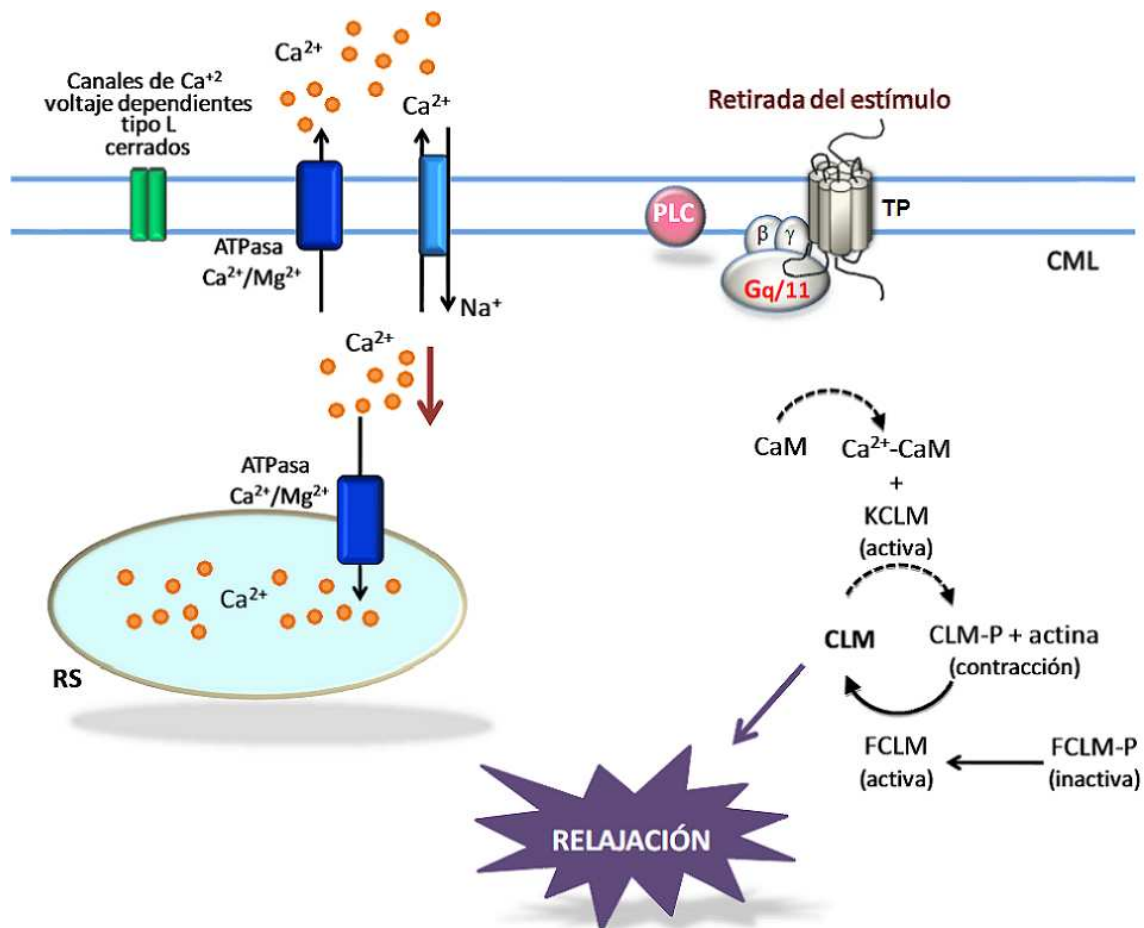


Figura 3. Regulación de la contracción del músculo liso vascular (adaptado de Flacco, 2014). CaM: calmodulina; CLM: cadena ligera de miosina; CML: célula muscular lisa; DAG: diacilglicerol; FCLM: fosfatasa de CLM; KCLM: quinasa de CLM; P: estado fosforilado; PLC: fosfolipasa C; RS: retículo sarcoplásmico; TP: receptor del TXA_2 . Flecha continua: contracción; flecha punteada: relajación.

2.2.1 Óxido nítrico (NO)

El NO es una molécula clave en el proceso de relajación vascular. Es un gas inestable, con una vida media muy corta y de fácil difusión a través de las membranas biológicas (Welch y Loscazo, 1994). Se sintetiza por la conversión de la L-arginina en L-citrulina a través de la sintasa de óxido nítrico (NOS, Palmer y cols., 1988), requiriéndose oxígeno molecular, flavin mononucleótido,

flavin adenina dinucleótido y el cofactor nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH). La expresión de la NOS puede estar regulada mediante su unión a la proteína CaM, la actividad de la cual es Ca^{2+} dependiente (Förstermann y Sessa, 2012). Se han descrito tres isoformas de la NOS:

- **NOS neuronal (nNOS)**: Se expresa de manera constitutiva en el tejido neuronal central y periférico, pero también en el sistema vascular, tanto en las CE (Papapetropoulos y cols., 1999) como en las CML (Papadaki y cols., 1998; Schwarz y cols., 1999), participando así en el control del tono vascular y de la presión arterial (Förstermann y Sessa, 2012).

- **NOS endotelial (eNOS)**: Es la isoforma más abundante del sistema vascular (Rafikov y cols., 2011). Se expresa principalmente en las CE, y el NO producido por ellas contribuye a mantener los vasos sanguíneos dilatados y controlar la presión arterial, además de tener otros efectos vasoprotectores y anti-ateroscleróticos. También se expresa en cardiomiocitos (Balligand y cols., 1993) y plaquetas (Mehta y cols., 1995; Sase y Michel, 1995). La eNOS, al igual que la nNOS, posee expresión constitutiva y es Ca^{2+} /CaM dependiente, produciéndose un aumento de la síntesis de NO al incrementar el Ca^{2+} citosólico. Aun así, con niveles bajos de Ca^{2+} es capaz de proporcionar una liberación basal de NO (Rafikov y cols., 2011).

- **NOS inducible (iNOS)**: Está presente en células del sistema inmune, como los macrófagos (Stuehr y cols., 1991) y las plaquetas (Mehta y cols., 1995), y también en todos los tipos celulares del sistema vascular (Beasley y cols., 1991; Papapetropoulos y cols., 1999). Normalmente necesita un estímulo inflamatorio para activarse, de manera que su expresión es inducida como

parte de la respuesta inmune, siendo, por lo tanto, independiente de los niveles de Ca^{2+} intracelular (Stuehr y cols., 1991; Rafikov y cols., 2011). A diferencia de las otras dos isoformas, produce grandes cantidades de NO en cortos periodos y de manera puntual (Marín y Rodríguez-Martínez, 1997; Moncada 1997), lo cual podría relacionarse con sus efectos nocivos (Mungrue y cols., 2002; Cullis y cols., 2006; Shao y cols., 2016).

Las tres isoformas de la NOS necesitan dimerizarse para ser activas (Rafikov y cols., 2011) y pueden ser inhibidas competitivamente por compuestos análogos de la L-arginina, como la N^{ω} -nitro-L-arginina metil éster (L-NAME; Moncada y cols., 1991).

El NO sintetizado en las CE atraviesa la membrana celular y difunde a las CML donde activa la guanilato ciclasa soluble, que incrementará los niveles de GMPc. El aumento de GMPc produce relajación por diferentes mecanismos, entre los cuales está la inhibición de la entrada de Ca^{2+} a través de los canales operados por receptor, la estimulación de la ATPasa de Ca^{2+} dependiente de Mg^{2+} de la membrana plasmática o la activación de la proteína quinasa dependiente de GMPc que fosforila la KCLM (Rang y cols., 2016).

Determinadas situaciones fisiopatológicas provocan disfunción endotelial, en la cual, el endotelio sufre alteraciones funcionales y estructurales, perdiendo su papel protector. Cuando la disponibilidad del NO se reduce, el endotelio pone en marcha mecanismos compensatorios, entre los que se incluye la liberación de otras sustancias relajantes como la prostaciclina o el EDHF.

2.2.2 Hiperpolarización derivada del endotelio (EDH)

La relajación del músculo liso vascular dependiente de endotelio implica, en muchos casos, una hiperpolarización de las CE (Garland y cols., 1995). Dicha hiperpolarización dependiente de endotelio (EDH) se suele atribuir a un factor difusible liberado por el endotelio denominado factor hiperpolarizante del endotelio (EDHF; Mombouli y Vanhoutte, 1997; Félétou y Vanhoutte, 2006; Bellien y cols., 2008). A pesar de que la naturaleza química del EDHF no se conoce, su participación en la respuesta vascular se atribuye a aquella vasorrelajación que permanece tras inhibir la síntesis de PGI_2 y de NO (Mombouli y Vanhoutte, 1997). La respuesta mediada por este factor puede ser inducida por diversos agonistas como la bradiquinina, la acetilcolina, la histamina o la sustancia P (Garland y cols., 1995). No obstante, en vasos de pequeño calibre no siempre está implicado un factor concreto en la relajación mediada por EDH, siendo un ejemplo de ello la propia presión tangencial, o *shear stress*, del flujo sanguíneo (Busse y cols., 2002; Félétou y Vanhoutte, 2006). Por lo tanto, utilizar siempre el acrónimo EDHF para referirse a este tipo de respuesta no sería del todo preciso. A medida que el calibre del vaso sanguíneo disminuye, la contribución del NO a la relajación dependiente de endotelio es menor y, en cambio, la del EDHF mayor, de manera que la relajación por EDH predomina en arterias de resistencia (Shimokawa y cols., 1996; You y cols., 1999), y es mayor en arterias que en venas (Félétou y cols., 1989; Zhang y cols., 2004).

Actualmente, se conoce que la relajación por EDH se inicia con un incremento en la concentración de Ca^{2+} endotelial y la consiguiente activación de tres tipos de canales de K^+ activados por Ca^{2+} (K_{Ca}): los SK_{Ca} (K_{Ca} 2.1, 2.2,

2.3), los IK_{Ca} (K_{Ca} 3.1) y los BK_{Ca} (K_{Ca} 1.1), de pequeña, mediana y larga conductancia respectivamente (Brusse y cols., 2002). Los canales SK_{Ca} e IK_{Ca} se encuentran generalmente en el endotelio (Brusse y cols., 2002), aunque los IK_{Ca} también se han detectado en las CML, a pesar de que se desconoce su función (McNeish y cols., 2006), y los BK_{Ca} se localizan en la musculatura lisa vascular (Garland y cols., 2011). En la arteria cerebral media (ACM), la salida de K^+ a través los canales SK_{Ca} e IK_{Ca} hacia el espacio extracelular podría activar a los canales rectificadores de K^+ y la ATPasa de Na^+ dependiente de K^+ en las CML, provocando hiperpolarización de la musculatura lisa y, por consiguiente, una respuesta vasodilatadora (Figura 4). Por ello, se ha sugerido que el K^+ podría actuar en dicha arteria como factor difusible hiperpolarizante o, lo que es lo mismo, podría ser un candidato a EDHF (Edwards y cols., 1998; McNeish y cols., 2005).

Las uniones *gap* son un tipo de conexión intercelular, formadas por dos hemicanales insertos entre dos células contiguas, y alineados con precisión, que permiten que los citoplasmas se comuniquen cuando dichas estructuras permanecen abiertas. En el endotelio existen uniones *gap* homocelulares, que permiten la propagación bidireccional de la respuesta de EDH a lo largo de la arteria (Haas y Duling 1997, Dora y cols., 2008). Los canales SK_{Ca} suelen concentrarse alrededor de esas uniones *gap* homocelulares. Entre las CE y las CML también existen uniones *gap*, que se localizan en las proyecciones que las CE emiten a través de los orificios de la lámina elástica interna (Sandow y Hill, 2000). Estas uniones mioendoteliales eliminan la necesidad de depender de un factor difusible para explicar las respuestas de EDH, ya que permiten transmitir directamente la hiperpolarización entre endotelio y músculo liso

(Figura 4). Los canales IK_{Ca} , que generalmente se localizan en dichas proyecciones endoteliales (Sandow y cols., 2006; Dora y cols., 2008), serían, en ACM de rata, los responsables de la respuesta de EDH en ausencia de NO, ya que ésta desaparece cuando los IK_{Ca} se bloquean con su inhibidor selectivo TRAM-34 (Marrelli y cols., 2003; McNeish y cols., 2005). No obstante, cuando la arteria dispone de NO, los canales SK_{Ca} también pueden contribuir a la respuesta de hiperpolarización (McNeish y cols., 2005; 2006), de manera que el NO ejercería un papel protector sobre la función de estos canales, aunque el mecanismo concreto es aún desconocido (Geeson y cols., 2002; Randriamboavonjy y cols., 2005). Por otro lado, se ha descrito que la activación de los receptores TP endoteliales provoca, en arteria mesentérica y ACM de rata, la inhibición de la respuesta de los canales SK_{Ca} (Plane y Garland, 1996; Crane y Garland, 2004; McNeish y Garland, 2007; McNeish y cols., 2012; Ellinsworth y cols., 2014; Gauthier y cols., 2014). El TXA_2 , agonista de los receptores TP, a nivel vascular se sintetiza en el endotelio, y también es uno de los múltiples factores liberados por plaquetas, las cuales se activan en exceso en determinados desordenes trombo-inflamatorios, como en la isquemia cerebral (Nieswandt y cols., 2011). El TXA_2 , a su vez, promueve el reclutamiento plaquetario y la contracción de las CML, favoreciendo así el estado protrombótico en la isquemia cerebral (Chamorro, 2009; Cortina y cols., 2013). La activación de los receptores TP, localizados en las CML aunque también presentes en las CE (McNeish y cols., 2012), estimula la vía de la RhoA/Rho quinasa (Huang y cols., 2004; Momotani y cols., 2011), que a su vez inhibe la respuesta de EDH mediada por los canales SK_{Ca} (McNeish y cols., 2012; Gauthier y cols., 2014; Figura 4).

Diversos estudios sugieren que las respuestas de EDH persisten o incluso aumentan cuando la biodisponibilidad del NO disminuye, tal y como ocurre en la isquemia cerebral y otras patologías (Marrelli y cols., 1999; Golding y cols., 2002; Cipolla y cols., 2009), de manera que ayudarían a mantener la vasorrelajación dependiente de endotelio. Se ha descrito que en ACM de rata, los canales SK_{Ca} e IK_{Ca} no participan en la regulación del tono basal (McNeish y cols., 2005; 2006; Cipolla y cols., 2009), presentando un nivel de expresión similar de ambos canales (Cipolla y cols., 2009). En cambio, en las arteriolas que ramifican de la ACM y penetran hacia el parenquima cerebral, los canales SK_{Ca} e IK_{Ca} no sólo contribuirían al mantenimiento del tono basal, sino que tras la isquemia cerebral ejercerían un papel protector, ya que aunque se ha observado que la biodisponibilidad del NO disminuye, el tono miogénico no queda afectado (Cipolla y cols., 2009). Además, Liao y cols. (2010) observaron que tras la oclusión de la ACM en ratón, la pérdida funcional de los canales BK_{Ca} aumentó el volumen de infarto cerebral. Por lo tanto, aunque se necesitan más estudios para confirmar el papel de estos canales tras el daño isquémico, los resultados obtenidos hasta el momento apuntarían, en todo caso, a una función protectora.

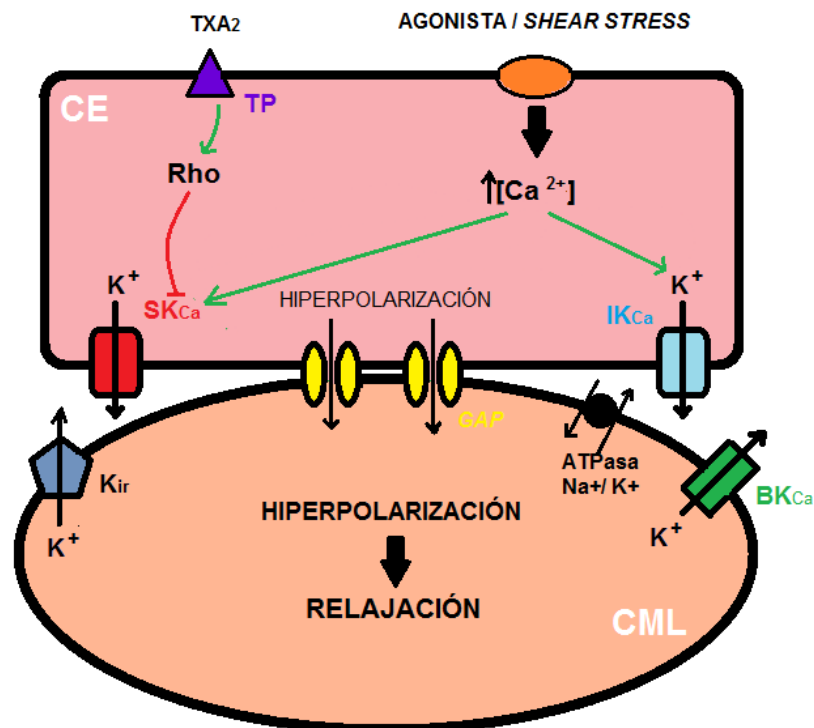


Figura 4. Respuesta de hiperpolarización derivada del endotelio. CE: célula endotelial; CML: célula muscular lisa; GAP: unión mioendotelial; K_{Ca} : canales de K^+ activados por Ca^{2+} ; K_{ir} : canal rectificador de K^+ ; TXA_2 : tromboxano A_2 ; TP: receptor del TXA_2 .

2.3 Respuesta miogénica

En condiciones normales, las grandes arterias piales extracraneales e intracraneales, como la ACM, mantienen un estado parcial de constricción, llamado tono basal o tono miogénico, que les permite aumentar o disminuir su diámetro, respuesta conocida como reactividad miogénica, proporcionándoles un mecanismo modulador del flujo sanguíneo local en respuesta a factores neuronales, endoteliales o metabólicos. En conjunto, el tono y la reactividad miogénica conforman la respuesta miogénica vascular (Osol y cols., 2002). Dicho fenómeno autorregulador contribuye a que el flujo sanguíneo cerebral

(FSC) se mantenga constante con independencia de las fluctuaciones en la presión sanguínea (Faraci y cols., 1989), protegiendo así a arteriolas y capilares cerebrales durante los cambios en la presión de perfusión (Owens, 2011; Peterson y cols., 2011). La actividad miogénica la determina, en última instancia, la actividad del músculo liso, el cual se contrae en respuesta al estiramiento o al aumento de la presión transmural y se relaja cuando dicha presión disminuye, contribuyendo todo ello a la autorregulación del FSC (Hill y cols., 2006).

2.4 Influencia del endotelio en la función vascular

El endotelio interviene en la regulación del tono vascular. Es un “órgano” complejo que responde a estímulos físicos y químicos generando un amplio rango de mensajeros moleculares orgánicos e inorgánicos capaces de influenciar la fisiología del tejido circundante (Le Brocq y cols., 2008). Participa en funciones diversas, como la regulación de la inflamación local, los procesos de adhesión celular, la agregación plaquetaria y la coagulación, entre otras. Pero una de sus funciones más importantes es procesar las señales que recibe, traduciéndolas en mecanismos reguladores del tono vascular y de la resistencia periférica, contribuyendo de forma importante al control de la presión arterial y del flujo sanguíneo (Vallance y cols., 1989). Las CE modulan el tono vascular liberando una serie de sustancias vasoactivas, unas con actividad vasodilatadora entre las que se encuentran el NO, el EDHF, la PGI₂ y la bradiquinina, y otras vasoconstrictoras, entre ellas los prostanoideos como el TXA₂ y la prostaciclina H₂, el anión superóxido (O₂⁻), la ET-1 y los componentes del sistema renina-angiotensina-aldosterona como la

angiotensina II (Sánchez-Ferrer y Marín, 1990; Félétou y Vanhoutte, 2006; Xu y Zhou, 2009; Garland y cols., 2011).

2.5 Influencia de las especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno (RONS) en la función vascular

Las especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno (RONS) son moléculas reactivas derivadas del oxígeno (ROS) y del nitrógeno (RNS), respectivamente, que se producen en todas las células aeróbicas. Algunas de estas especies son altamente reactivas, como el radical hidroxilo (OH^\cdot), el O_2^\cdot y el peroxinitrito (ONOO^\cdot). El peróxido de hidrógeno (H_2O_2) no es un radical libre propiamente dicho, ya que no tiene electrones desapareados, sino que se genera a partir de ellos. Las RONS son neutralizadas por el sistema de defensa antioxidante y antinitrante, no obstante, el desequilibrio entre su producción y la neutralización se conoce como estrés oxidativo/nitrosativo. Dicho desequilibrio se puede presentar ya sea por una producción excesiva de RONS, una disminución de los mecanismos antioxidantes y antinitrantes, o por la combinación de ambos. Si el estrés persiste, conducirá al daño de moléculas y tejidos. Las RONS interaccionan con los mecanismos de señalización celular afectando, entre otras, a funciones celulares como la contracción muscular, la expresión génica, la proliferación, la migración y la muerte celular. Determinados factores de transcripción, como el *NF- κ B*, son sensibles a las RONS y activan la expresión de genes proinflamatorios como las interleuquinas (IL), moléculas de expresión celular y proto-oncogenes (Griendling y cols., 2000; Touyz, 2004).

2.5.1 Anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$)

El $O_2^{\cdot-}$ se forma por reducción del oxígeno originado principalmente en la mitocondria, en el RS y en las membranas nucleares de diferentes células (Gutteridge y cols., 1986). La producción vascular de $O_2^{\cdot-}$ puede provenir de distintas fuentes, aunque en los vasos la mayor fuente intracelular de $O_2^{\cdot-}$ es la NADPH oxidasa, enzima asociada a membrana que cataliza la reducción del oxígeno, utilizando NADPH como donador de electrones. Se trata de un complejo enzimático, identificado y caracterizado inicialmente en fagocitos, formado por varias subunidades, dos de las cuales, Nox y p22^{phox}, son de tipo transmembrana. También lo constituyen diferentes elementos citosólicos como p67^{phox}, p47^{phox}, p40^{phox} y la proteína G de bajo peso molecular Rac, que varían en función del tipo celular y se unen a las subunidades que forman el componente transmembrana (Figura 5).

En los últimos años se han caracterizado 7 isoformas de la NOX en mamíferos, denominadas Nox1-7 (Sumimoto, 2008). A nivel vascular, la Nox2, como también se conoce a gp91^{phox}, se localiza en las CML y CE (Han y cols., 2008), mientras que la Nox4 también se expresa en las CML (Briones y cols., 2011; Touyz y cols., 2011). La sobreexpresión de ambas subunidades contribuye al daño oxidativo y a la lesión vascular (Touyz y cols., 2011; Radermacher y cols., 2013), teniendo un papel relevante en la patología de la isquemia cerebral (Kahales y cols., 2007; Radermacher y cols., 2013). No obstante, recientemente se ha descrito que la Nox4 también podría ejercer un efecto protector sobre la pared de las arterias cerebrales (Onetti y cols., 2016). La subunidad p22^{phox} tiene un papel importante en la regulación de la actividad de la NADPH oxidasa, mientras que p47^{phox} facilita la unión de p67^{phox} y Rac.

La subunidad p40^{phox}, además de modular la actividad oxidasa de la enzima, facilita la unión de p47^{phox} y p67^{phox} al citocromo b558 (Soccio y cols., 2005). La activación de la NADPH oxidasa se inicia por la fosforilación de varias serinas situadas en la región C-terminal de p47^{phox}, favoreciendo la formación del complejo de las proteínas citoplasmáticas y desencadenando su translocación a la membrana para unirse al citocromo b558 e iniciar la actividad catalítica de la enzima. Entre los estímulos que inducen la activación de la NADPH oxidasa se encuentran factores de crecimiento, citoquinas, fuerzas mecánicas y lípidos (Brandes y cols., 2014).

Otras fuentes de producción vascular de O₂⁻ incluyen la eNOS, que en ausencia de suficiente L-arginina o deficiencia del cofactor tetrahidrobioptina, se desacopla y actúa como una NADPH oxidasa catalizando la reducción del O₂ (Heinzel y cols., 1992; Rabelink y Luscher, 2006); las enzimas mitocondriales, el citocromo P-450, la xantina oxidasa (XO), la ciclooxigenasa (COX), y la lipooxigenasa (Brandes y cols., 2014).

La enzima encargada de mantener los niveles fisiológicos de O₂⁻ es la superóxido dismutasa (SOD), que cataliza la conversión de dicho radical en O₂ molecular y H₂O₂ (McCord y Fridovich, 1969). En humanos existen tres tipos de SOD: mitocondrial, citosólica y extracelular.

La producción de O₂⁻ podría interferir en la relajación de los vasos sanguíneos no sólo por la inactivación del NO (Gryglewski y cols., 1986; Touyz, 2004; Pacher y cols., 2007) sino también por la alteración de los niveles de Ca²⁺ (Grover y Samson, 1988; Touyz, 2005), por cambios en la expresión

génica (Ito y cols., 1996) o por procesos de hipertrofia vascular (Murrell y cols., 1990; Fortuno y cols., 2005).

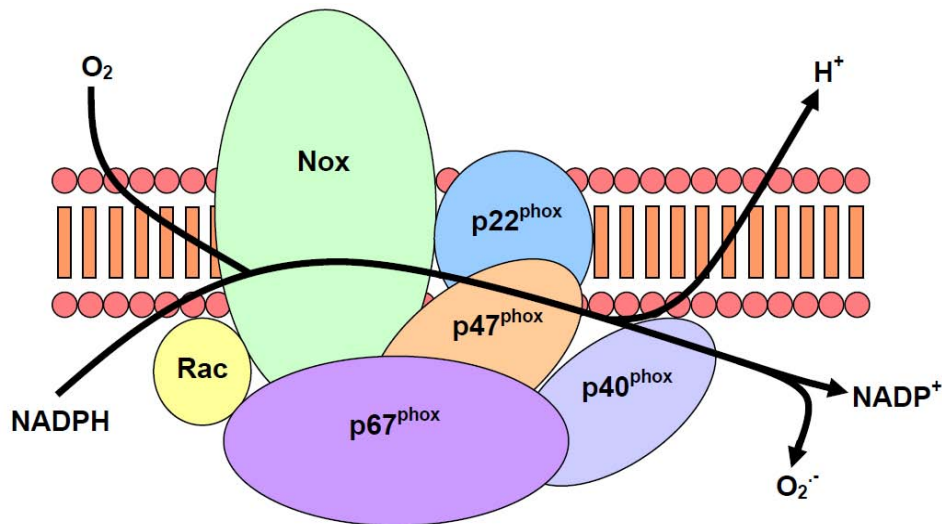


Figura 5. Complejo enzimático de la NADPH oxidasa vascular (adaptado de Cave y cols., 2006).

2.5.2 Peróxido de hidrógeno (H₂O₂)

El H₂O₂ se forma principalmente a partir de O₂⁻ como resultado de la actividad de la SOD, aunque también puede sintetizarse a través de la eNOS desacoplada (Heinzel y cols., 1992). Actúa como vasoconstrictor en algunos vasos sanguíneos, como en arterias renales (Gao y Lee, 2005), y como vasodilatador en arterias mesentéricas o coronarias (Hayabuchi y cols., 1998). Tiene múltiples acciones vasomotoras: puede favorecer la vasodilatación estimulando la liberación de NO o actuando como factor hiperpolarizante (Sobey y cols., 1997; Miura y cols., 2003), o provocar vasoconstricción favoreciendo la liberación de productos derivados de la COX, como el TXA₂

(Gao y Lee, 2005). El H_2O_2 también puede participar en la regulación de la estructura en arterias (Lyle y cols., 2009; Maiellaro-Rafferty 2011; Sutliff y cols., 2013). Es hidrolizado por la catalasa y por la glutatión peroxidasa (Dhalla y cols., 2000), y puede ser precursor de otros radicales como el OH^\cdot .

2.5.3 Radical hidroxilo (OH^\cdot)

El OH^\cdot se considera la especie más reactiva y perjudicial de todas las ROS. Se genera a partir de una reacción catalizada por iones metálicos (Fe^{2+} , Cu^+ ; Nordberg y Arner, 2001), y también, aunque en menor medida, a partir de H_2O y por degradación de ONOO^- (Darly-Usmar y Halliwell, 1996).

2.5.4 Peroxinitrito (ONOO^-)

Cuando el NO alcanza niveles del orden nanomolar compite con la SOD por el O_2^\cdot dando lugar a ONOO^- , especie oxidante y nitrante de vida corta que contribuye al estrés oxidativo y nitrosativo en varias patologías como la enfermedad de Alzheimer, la diabetes, la disfunción cardíaca y la isquemia cerebral (Thiyagarajan y cols., 2004; Carballal y cols., 2014; Bencsik y cols., 2015).

Los lugares de formación de ONOO^- están muy relacionados con la fuente de O_2^\cdot , ya que aunque el NO es relativamente estable y altamente difusible, el O_2^\cdot tiene una vida más corta y no puede difundir a través de las biomembranas. A pesar de que la vida media del ONOO^- es corta a pH fisiológico, hecho que impide su detección en los sistemas biológicos, su habilidad para cruzar las membranas celulares permite su influencia en las

células de su alrededor. El ONOO^- , a su vez, reacciona con otras moléculas generando nuevas especies reactivas que pueden inducir daño celular (Figura 6): a pH fisiológico se protona formando ácido peroxinitroso (HONOO), que puede descomponerse en dióxido de nitrógeno ($\text{NO}_2\cdot$) y OH^- ; en presencia de dióxido de carbono (CO_2), da lugar a nitrosoperoxycarboxilato (ONOOCO_2^-), que al isomerizar genera, en un 70% de los casos, CO_2 y nitrato (NO_3^-), y, en los casos restantes, radical carboxilo ($\text{CO}_3^{\cdot-}$) y $\text{NO}_2\cdot$ (Valdez y cols., 2000; Motterlini y cols., 2002). EL $\text{CO}_3^{\cdot-}$, $\text{NO}_2\cdot$ y OH^- son moléculas altamente reactivas. Por lo tanto, cuando los sistemas biológicos se encuentran expuestos a ONOO^- pueden producirse alteraciones en la viabilidad y funcionalidad de las células, dado que es un potente oxidante que parece estar implicado en la oxidación de proteínas, lípidos, cofactores (Welch y Loscalzo, 1994; Marín y Rodríguez-Martínez, 1995) y lipoproteínas de baja densidad (White y cols., 1994). Su actividad nociva también se debe a su capacidad para inducir roturas del ácido desoxirribonucleico (ADN) nuclear (Szabó y cols., 1996), reaccionar con proteínas que contienen iones metálicos provocándoles cambios conformacionales en su estructura tridimensional (Álvarez y Radi, 2003), participar en fenómenos de toxicidad celular directa (Guzik y cols., 2002) y nitrosilar residuos de tirosina, convirtiéndolos en 3-nitrotirosina (3-NT), que dará lugar a alteraciones de la función proteica (Ischiropoulos y cols., 1992). La 3-NT se utiliza como un marcador de la presencia de ONOO^- , aunque ésta no sea la única especie capaz de inducir su formación (Pietraforte y cols., 2003).

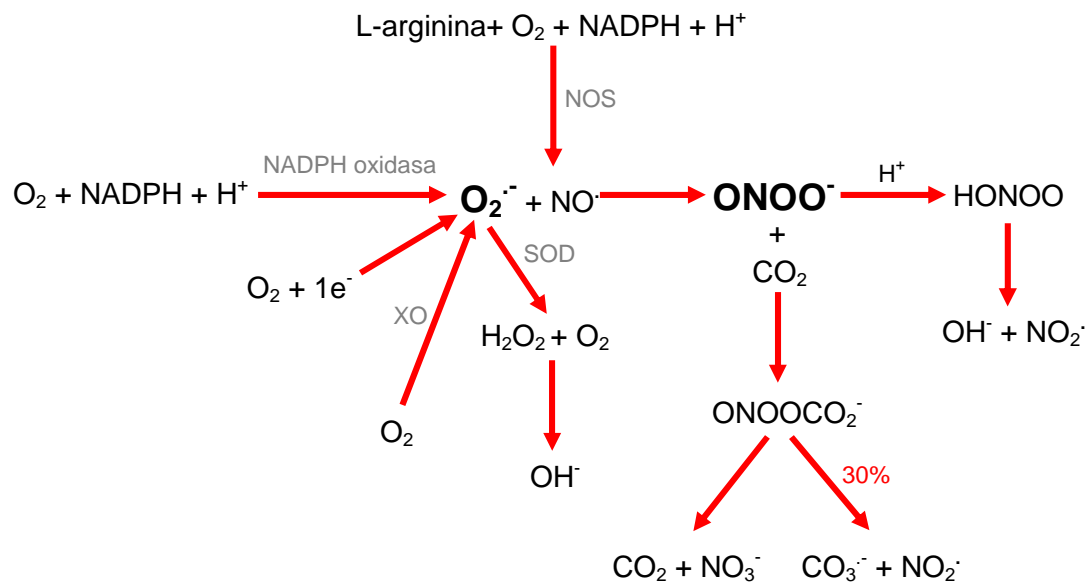


Figura 6. Formación de especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno. $\text{CO}_3^{\cdot-}$: radical carbonato; e^- : electrón; H_2O_2 : peróxido de hidrógeno; HONOO: ácido peroxinitroso; NO: óxido nítrico; CO_2 : dióxido de carbono; NO_2^\cdot : dióxido de nitrógeno; NO_3^- : nitrato; NOS: sintasa de NO; O_2 : oxígeno; $\text{O}_2^{\cdot-}$: anión superóxido; OH^\cdot : radical hidroxilo; ONOO⁻: peroxinitrito; ONOOCO₂⁻: nitrosoperoxicarbonato; SOD: superóxido dismutasa; XO: xantina oxidasa.

El ONOO⁻ juega un papel importante en la respuesta inflamatoria a varios niveles: tiene funciones tanto pro-inflamatorias, entre ellas la inducción de la expresión de moléculas de adhesión intracelular-1 (ICAM-1) y P-selectinas en células endoteliales, como anti-inflamatorias, que tienen lugar principalmente en la última fase de la inflamación, inactivando la COX y produciendo la nitrosilación de lípidos que facilita la finalización del proceso inflamatorio (Belik y cols., 2004). Durante el proceso inflamatorio también reacciona con mediadores inflamatorios como diversas IL y con la iNOS.

Con el fin de investigar la participación del ONOO^- en diversos modelos experimentales, se han desarrollado compuestos capaces de descomponer esta molécula. Un ejemplo de ello es el *5,10,15,20-Tetrakis (4-sulfonatophenyl) porphyrinato de hierro (III)* (FeTPPS; Figura 7), que cataliza la isomerización de ONOO^- a NO_3^- , el cual no es un agente oxidante (Jensen y Riley 2002). En el estudio de Kunz y cols. (2007) el FeTPPS administrado redujo la nitrosilación proteica inducida por lipoporisacáridos en ACM de ratón, y en el de Coucha y cols. (2013) previno las alteraciones miogénicas descritas en ACM de ratas isquémicas, y que se relacionan con una mayor producción de ONOO^- .

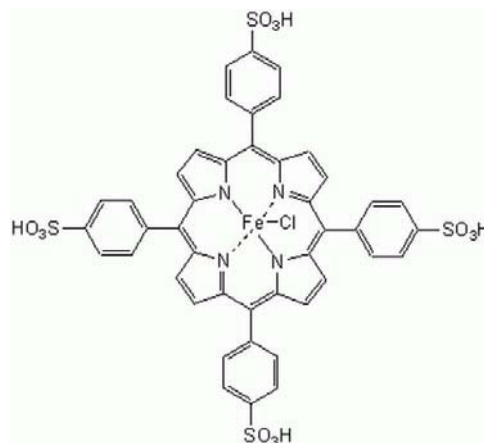


Figura 7. Estructura molecular del *5,10,15,20-Tetrakis (4-sulfonatophenyl) porphyrinato de hierro (III)* (FeTPPS).

3. ISQUEMIA CEREBRAL

El ictus, o accidente cerebrovascular, es un trastorno neurodegenerativo agudo que se caracteriza por un aporte insuficiente de sangre a un territorio cerebral determinado. El 80% de los ictus son isquémicos, mientras que 20% restante son de origen hemorrágico (Donnan y cols., 2008). El ictus isquémico, o isquemia cerebral, se debe a una interrupción transitoria o permanente del

FSC; en cambio, en el ictus hemorrágico, se produce la rotura de un vaso sanguíneo, produciendo extravasación de sangre al parénquima cerebral. La isquemia cerebral representa, en los países desarrollados, la segunda causa de mortalidad en mayores de 60 años, la principal causa de incapacidad permanente, y la segunda más frecuente de demencia. En humanos, existen básicamente dos tipos de isquemia cerebral en función del origen de la oclusión arterial: i) isquemia inducida por una pérdida total del flujo cerebral, como la que tiene lugar en un paro cardíaco, y que se denomina *isquemia global*, e ii) isquemia en la que se produce una disminución del flujo cerebral local por bloqueo, por un émbolo o por trombosis local, de una arteria (Easton y cols., 2004). Una interrupción del flujo sanguíneo en una arteria cerebral afectará, principalmente, a sus áreas de irrigación directa. Esto es lo que se conoce como *isquemia focal*.

3.1 Irrigación cerebral

El encéfalo es irrigado desde tres territorios vasculares: las dos arterias carótidas por un lado, y las arterias vertebrales que se fusionan dando lugar a la arteria basilar, por el otro. En la base del encéfalo se encuentra el principal sistema anastomótico entre los tres territorios, conocido como polígono de Willis (Figura 8). Dicho sistema lo conforman las arterias cerebrales anteriores, la arteria comunicante anterior y las comunicantes posteriores, lo que permite el aporte sanguíneo colateral entre territorios cuando uno de éstos resulta deficitario. A nivel de la base del encéfalo, la arteria carótida común origina la arteria cerebral anterior, la ACM, la arteria comunicante posterior i la arteria coloidal anterior. La ACM se ramifica abasteciendo parte del córtex, y algunas

de sus ramificaciones penetran en el cerebro para irrigar los ganglios basales anteriores; de manera que se trata de la arteria que irriga un mayor territorio del parénquima cerebral (Drake y cols., 2015). Por lo tanto, una interrupción del flujo sanguíneo en la ACM por isquemia focal puede comportar daños cerebrales irreversibles (Moskowitz y cols., 2010).

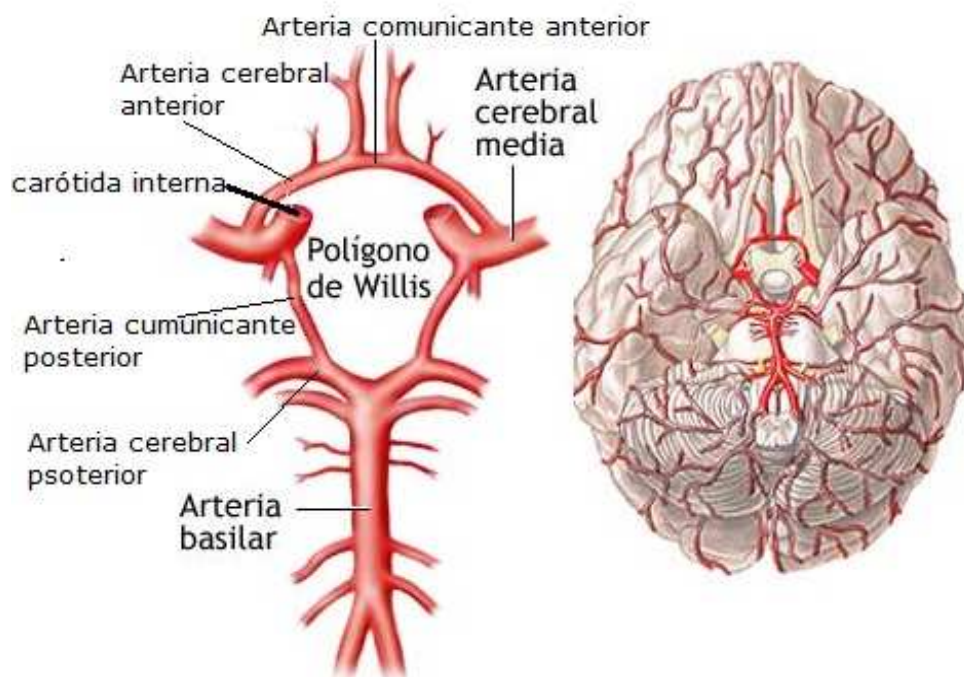


Figura 8. Representación de las arterias cerebrales humanas que comunican al polígono de Willis. También válida para roedores (adaptado de *A.D.A.M. health Solutions, Ebix Inc.*, 2016).

3.2 Fisiopatología

El daño cerebral que se produce después de una isquemia cerebral es el resultado de un conjunto de mecanismos altamente complejos que da lugar a la maduración del infarto. Dado que el cerebro necesita gran cantidad de glucosa y oxígeno, la disminución del flujo sanguíneo produce una reducción del aporte

de estos compuestos a las neuronas, siendo éste el primer paso de una cascada de acontecimientos que desembocarán en la muerte celular y en la formación del núcleo del infarto. Rodeando al núcleo del infarto se encuentra un área denominada *penumbra*, zona de tejido moderadamente isquémico que se encuentra irrigado por arterias colaterales, por lo que si se restaura el flujo sanguíneo permanece viable (Heiss y cols., 2004). Por ello, a pesar de que la zona nuclear es irrecuperable, la zona de penumbra es una diana importante para el desarrollo de estrategias terapéuticas (Figura 9).

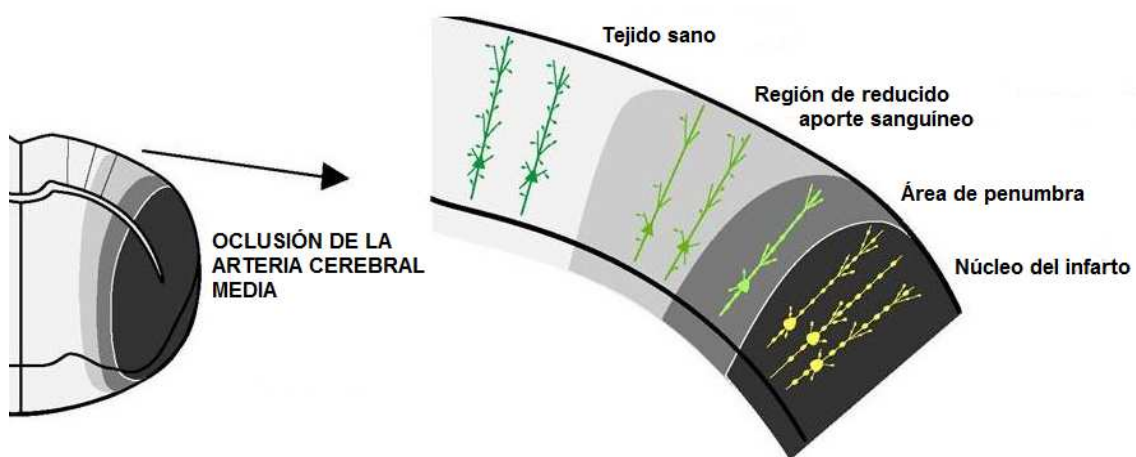


Figura 9. Representación esquemática de la penumbra isquémica (Adaptado de Li y Murphy, 2008).

Inicialmente, en la isquemia cerebral, se produce una caída significativa en los niveles tisulares de ATP, que es considerablemente mayor en el núcleo del infarto que en el área de penumbra. Como consecuencia, se altera el gradiente iónico dependiente de las ATPasas, y la membrana neuronal y glial se despolarizan favoreciendo el edema citotóxico y el aumento en la concentración de Ca^{2+} intracelular (Lipton, 1999). A su vez, el Ca^{2+} intracelular

activa las proteasas dependientes de calcio, las lipasas y las ADNasas, causando en los primeros minutos del proceso la muerte, por catabolismo, de las células del núcleo (Doyle y cols., 2008). Paralelamente, se acumulan neurotransmisores excitatorios en el espacio extracelular, especialmente el glutamato, desencadenando excitotoxicidad (Pacher y cols., 2007). Por otro lado, La hipoxia activa el metabolismo anaeróbico celular y la consecuente acidosis láctica (Dirnagl y cols., 1999). Por último, las mitocondrias liberan radicales libres y ROS, y aumentan las citoquinas implicadas en la producción de metaloproteinasas. Estas últimas, debido a su capacidad para alterar la barrera hematoencefálica (BHE), pueden favorecer el desarrollo de edema vasogénico y el riesgo de transformación hemorrágica.

La hipoxia, el aumento de Ca^{2+} intracelular y la presencia de RONS activan mecanismos de proteólisis y lipólisis, así como la síntesis de factores de transcripción que inducirán la expresión de genes proinflamatorios, moléculas de adhesión, citoquinas, factores de crecimiento y enzimas antioxidantes (Schweizer, 2013). Las células endoteliales facilitarán la transmigración de los leucocitos polimorfonucleares al tejido isquémico (Granger, 1989), los cuales producirán más RONS que, junto con el agotamiento secundario de las reservas antioxidantes, contribuirán a la lesión tisular (Ikeda y Long, 1990). Aunque la síntesis excesiva de RONS tiene lugar de manera temprana tras la isquemia, se amplificará tras la reperusión (Fabian y Kent, 1999).

La inflamación es uno de los mecanismos relevantes en la patogénesis del ictus isquémico (Muir y cols., 2007; Lakhan y cols., 2009; Denes y cols., 2010). La producción de determinadas citoquinas, tanto pro- como antiinflamatorias, se incrementa tras el infarto. La IL-1 β , la IL-8 y el factor de necrosis tumoral- α

(TNF- α), citoquinas proinflamatorias, favorecerían el daño isquémico, mientras que la IL-10 y el factor de crecimiento transformante- β (TFG- β) que son antiinflamatorias actuarían como neuroprotectores (Emsley y cols., 2008). La presencia de niveles elevados de citoquinas proinflamatorias se asocia a infartos mayores y a un peor pronóstico, lo que conlleva a considerar la inflamación que se produce durante la I/R como una diana importante para limitar el daño isquémico.

En resumen, el desequilibrio iónico en el núcleo del infarto conducirá a la aparición de edema, muerte y lisis celular o necrosis, mientras que en la zona de penumbra se activaran principalmente genes implicados en la activación de respuestas inflamatorias y muerte celular tardía o apoptosis (Figura 10).

El daño asociado a la reperfusión dependerá de varios factores como la severidad y la duración de la oclusión de la ACM, factores genéticos o comorbilidad en humanos, además de los diversos efectos de la propia reperfusión, entre los que se incluyen la producción vascular de RONS como O_2^- y $ONOO^-$ (Chan, 1996), la alteración de la BHE (del Zoppo y Mabuchi, 2003), la acumulación de leucocitos en los vasos sanguíneos (del Zoppo y cols, 1991) e infiltración de éstos en el parénquima cerebral (Zhang y cols., 1994) y la activación plaquetaria (Chong y cols, 2001) y del complemento (d'Ambrosio y cols., 2001; Figura 10).

Durante la reperfusión puede aparecer un incremento del FSC por encima de los valores basales, proceso que se denomina hiperemia reactiva (HR). Este fenómeno se observa tanto en animales (Tamura y cols., 1980; Traupe y cols., 1982; Gourley y Heistad, 1984; Todd y cols., 1986; Tsuchidate y cols., 1997; Pérez-Asensio y cols., 2010) como en humanos (Paulson, 1970; Christensen y cols., 1973; Uemura y cols., 1978; Olsen y cols., 1981; Kidwell y cols., 2001; Yu y cols., 2015). En modelos animales se asocia a un mayor daño cerebral (Tamura y cols., 1980; Moskowitz y cols., 1990; Macfarlane y cols., 1991; Pérez-Asensio y cols., 2010), incluyendo disrupción de la BHE, edema cerebral y mayor estrés oxidativo/nitrosativo y neurológico (Pérez-Asensio y cols., 2010); en pacientes, la HR se ha asociado recientemente a un mayor riesgo de sufrir hemorragia cerebral transitoria (Yu y cols., 2015). En consonancia con todos estos resultados, se ha observado que la supresión de la HR presenta efectos protectores (Yamagami y cols., 1998; Kim y cols., 2006). En los estudios de Christensen y cols. (1973) y Olsen y cols. (1981) alrededor de un 35-40% de los pacientes presentaron HR tras las primeras horas de un

episodio de isquemia cerebral; en el realizado por Yu y cols. (2015) un 34% la padecieron durante los primeros días y, en el estudio llevado a cabo por Uemura y cols. (1978), incluso un 10% la experimentó a los 2-6 meses del infarto. A nivel preclínico, en el estudio realizado por Pérez Asensio y cols. (2010) un 60% de las ratas mostraron hiperemia, al menos, durante los primeros 15 min de reperfusión. La HR se origina debido a la vasodilatación que se produce cuando disminuye la resistencia vascular durante la isquemia (Gourley y Heistad, 1984) y, aunque todavía se desconocen los mecanismos exactos que la desencadenan, se sugiere que intervienen procesos neurogénicos (Macfarlane y cols., 1991) así como el incremento de los niveles de NO (Humphreys y Koss, 1998).

3.4 Implicación de las RONS en la I/R

En modelos experimentales murinos, la síntesis de RONS tiene lugar desde el inicio de la isquemia, aunque se acelera rápidamente durante la reperfusión, en paralelo con la disminución de la actividad de los sistemas antioxidantes endógenos (Fabian y cols., 1995; Chan, 2001). Concretamente, la producción de RONS aumenta durante aproximadamente 6-12 h tras la isquemia, pudiendo persistir niveles elevados en células vulnerables hasta las 24 h (Lipton, 1999). Se ha descrito un aumento de la producción de ONOO^- a las dos horas de iniciarse la isquemia, similar entre el núcleo del infarto y el área de penumbra, aunque en esta última se llega a alcanzar en ratas el doble de su producción tras tres horas de reperfusión (Fukuyama y cols, 1998). El aumento de radicales libres se ha observado hasta 21 días después en modelos de isquemia permanente (Uemura y cols., 1991; Dringen, 2000). El estrés

oxidativo/nitrosativo generado tras la I/R puede desencadenar un círculo vicioso que implique disfunción mitocondrial, excitotoxicidad, alteraciones en el ADN e inflamación, agravando así el daño en el tejido cerebral (Akbar y cols., 2016).

El cerebro es un órgano especialmente vulnerable al daño oxidativo, debido a su alto consumo de O₂, su elevado contenido en hierro y lípidos, y su escasa capacidad antioxidante (Chen y cols., 2011). La reoxigenación que tiene lugar tras la reperfusión espontánea o tras el tratamiento trombolítico permite la utilización del O₂ como sustrato de numerosas reacciones enzimáticas de oxidación, principalmente en las mitocondrias. Las RONS sintetizadas tras la I/R, además de la toxicidad directa que generan sobre macromoléculas como lípidos, proteínas o ácidos nucleicos, alteran la expresión de ciertos genes, resultando en una mayor producción de citoquinas proinflamatorias y de moléculas de adhesión (Frijns, 2002) que favorecerán la infiltración en el tejido isquémico de células inflamatorias, que a su vez agravarán el estrés oxidativo y el daño tisular. En relación a la hiperemia reactiva, ésta se ha asociado, en modelos experimentales de I/R, a una mayor producción de ONOO⁻ en arterias y tejido cerebral (Coucha y cols., 2013).

3.5 Remodelado vascular en la I/R

La pared vascular tiene la capacidad de modificar su estructura a través de un proceso denominado *remodelado*, mecanismo adaptativo que se produce generalmente como respuesta a los cambios, a largo plazo, en condiciones hemodinámicas como el desarrollo o el envejecimiento. No obstante, el remodelado vascular puede resultar desadaptativo y aparecer en la

fisiopatología de determinadas enfermedades cardiovasculares como la isquemia cerebral (Jiménez-Altayó y cols., 2007; 2009), la hipertensión (Briones y cols., 2010; Puato y cols., 2016) y la diabetes (Rizzoni y Rosei, 2009; Ti y cols., 2016), originando complicaciones cuando tiene lugar en arterias pequeñas.

A lo largo de las últimas décadas, se han realizado avances significativos en el estudio de la estructura de los vasos y de los procesos de remodelado que se producen tanto en condiciones fisiológicas como patológicas, con un énfasis especial en los vasos de resistencia (Mulvany y cols., 1996; Intengan y Schiffrin, 2001; Schiffrin, 2004; Briones y cols., 2003; 2007; 2009; Jiménez-Altayó y cols., 2007; 2009; Caracuel y cols., 2012; Márquez-Martín 2012; Dantas y cols., 2014).

El concepto de remodelado vascular se ha definido como un mecanismo complejo en el que se encuentran involucrados procesos de crecimiento y atrofia (Mulvany y cols., 1996). En este sentido, el remodelado puede conllevar un incremento en la cantidad de material del vaso (*remodelado hipertrófico*), una reducción (*remodelado hipotrófico*) o una reorganización de los distintos componentes de la pared vascular, sin cambio en la cantidad de material (*remodelado eutrófico*; Mulvany y cols., 1996; Mulvany, 2002). El tipo hipotrófico da lugar a una pared más delgada y una relación pared/luz menor. En cambio, el tipo hipertrófico se caracteriza por el engrosamiento de la pared vascular debido a una hiperplasia/hipertrofia celular y/o a una mayor deposición de material de la MEC, que implica un aumento de la relación pared/lumen. En el eutrófico, la relación pared/lumen no varía. El remodelado, además, puede

ser hacia el interior (*inward*), hacia el exterior (*outward*), o compensado, cuando el diámetro interno del vaso disminuye, aumenta o no se modifica, respectivamente (Figura 11). Se ha sugerido que el remodelado vascular puede ser inducido como respuesta a la producción de RONS (Lee y Griending, 2008; Jiménez-Altayó y cols., 2009).

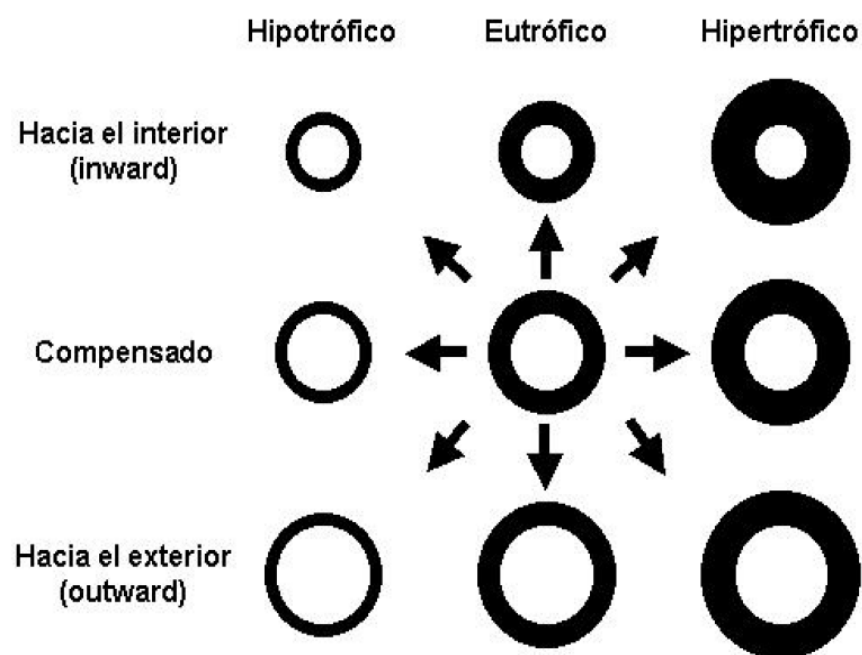


Figura 11. Tipos de remodelado vascular (adaptado de Mulvany, 2002). El remodelado arterial puede ser hipotrófico (columna izquierda), eutrófico (columna central) e hipertrófico (columna derecha), y además, según como se modifique el diámetro interno, puede ser hacia el interior, compensado o hacia el exterior.

3.5.1 RONS y remodelado vascular

Las RONS regulan la función vascular modulando el crecimiento, la apoptosis y la migración celular, además de promover la expresión de mediadores proinflamatorios y el recambio proteico de la matriz extracelular,

contribuyendo con ello al remodelado en el corazón (Hori y Nishida, 2009; Redout y cols., 2010) y en los vasos sanguíneos (Xu y Touyz, 2006; Paravicini y Touyz, 2008; Terashima y cols., 2009). Así, en diversos estudios se ha observado que las RONS influyen en el remodelado vascular aumentando la deposición de proteínas de la MEC, como el colágeno, y modulando la actividad de las metaloproteinansas de la matriz (MMP), enzimas encargadas de la degradación de la MEC (Lee y Griendling, 2008). Tras la hipoxia se ha descrito un aumento en la proliferación de los fibroblastos de la capa adventicia (Krick y cols., 2005), siendo identificados éstos como las células más reactivas de la pared vascular que parecen iniciar el remodelado vascular en respuesta al daño (Stenmark y cols., 2013). Además, la estimulación de la capa adventicia por las RONS se ha asociado a un cambio fenotípico de los fibroblastos a miofibroblastos, células con capacidad de contraerse y que producen grandes cantidades de MEC (Sappino y cols., 1990; Shi y cols., 2009). El hecho de que en diversas patologías en las que se produce remodelado vascular como en la isquemia cerebral (Cipolla y cols., 1997; Jiménez-Altayó y cols., 2009), la hipertensión (Cousin y cols., 2010), y la diabetes (Hayden y cols., 2007) también se hayan observado aumentos en el estrés oxidativo/nitrosativo parece apoyar una relación entre ambos fenómenos.

3.5.2 Cambios estructurales en la I/R

Una estructura vascular anómala puede favorecer el posterior desarrollo de alteraciones cardiovasculares (Rizzoni y cols, 2003; De Ciuceis y cols., 2007; Mathiassen y cols., 2007; Dantas y cols., 2014). La I/R provoca cambios en la

estructura vascular. Así, diversos estudios (Cipolla y cols., 1997; Jiménez Altayó y cols., 2007; 2009) observaron que, tras la I/R, se producía un aumento del grosor de la pared en la ACM de ratas. El incremento del grosor de la pared arterial observado en el estudio de Jiménez-Altayó y cols. (2007) fue debido al remodelado hipertrófico que dio lugar a un aumento del diámetro externo, acompañado por un incremento del área de la sección transversal y de la relación pared/luz, y cuya causa parecía ser el aumento en el número de CA y en el volumen de la capa adventicia. No obstante, en otro estudio posterior (Jiménez-Altayó y cols., 2009) dicho remodelado hipertrófico pareció asociado a una ligera reducción del diámetro interno de la ACM.

3.5.3 Cambios mecánicos en la I/R

El remodelado vascular se ha asociado también a cambios en las propiedades mecánicas de la pared vascular. Estas propiedades son críticas para desempeñar una función vascular normal y tienen un papel primordial en las patologías vasculares (De Ciuceis y cols., 2007; Mathiassen y cols., 2007). Así, la alteración de la rigidez del vaso, si va acompañada de una reducción del diámetro interno, puede afectar a la resistencia periférica y al flujo sanguíneo. Los cambios en la rigidez arterial vienen determinados por alteraciones cualitativas y cuantitativas de la MEC vascular debidas a factores hemodinámicos, genéticos o humorales (Briones y cols., 2010). Además, las propiedades mecánicas arteriales no sólo dependen de la cantidad de sus constituyentes sino también de su organización espacial, su distribución relativa y las interacciones entre ellos (Bank y cols., 1996; Intengan y Schiffrin, 2001).

La ACM de ratas isquémicas presenta mayor o menor rigidez que la de sus respectivos controles *sham* en función de la duración del periodo de oclusión y/o de reperfusión (Cipolla y cols., 1997; Coulson y cols., 2002). En el estudio de Jiménez-Altayó y cols. (2007) se observó, en la ACM de ratas sometidas a I/R cerebral, una disminución de la rigidez de la pared a la vez que un aumento en la elasticidad intrínseca de ésta, incluso en el hemisferio contralateral a la isquemia; en cambio, en un estudio posterior con ratas de otra cepa (Jiménez-Altayó y cols., 2009), la rigidez de la pared no se vio alterada cuando se comparó con la del grupo *sham*. En ambos trabajos (Jiménez-Altayó y cols., 2007; 2009) se observó una disminución en el estrés de la pared de estas arterias como consecuencia de la adaptación geométrica que tiene lugar para compensar el posible aumento en la presión intravascular producido después de la isquemia.

3.6 Respuesta miogénica en la I/R: papel del ONOO⁻

La pérdida o alteración de la respuesta miogénica y, por lo tanto, la falta de autorregulación del FSC, puede conllevar daño tisular, episodios de edema y hemorragia (Kuroiwa y cols., 1989; Warner y cols., 2004). La I/R parece provocar cambios en el tono vascular, incluso en el hemisferio contralateral a la isquemia (Cipolla y Curry, 2002; Jiménez-Altayó y cols., 2007; Coucha y cols., 2013). En el estudio de Cipolla y cols. (1997), tras un episodio de isquemia cerebral y 24 h de reperfusión, disminuyó el tono y la reactividad miogénica en la ACM de ratas. Además, se observó que la pérdida de actividad miogénica estaba ligada tanto al aumento del periodo de isquemia (Cipolla y cols., 2001) como al de reperfusión (Cipolla y Curry, 2002). Paralelamente, el mismo grupo

(Cipolla y cols., 2001; Maneen y cols., 2006) sugirió que en el empeoramiento del control miogénico de la ACM podría estar implicada una despolimerización del citoesqueleto de actina en el músculo liso vascular, ya que el aumento de la duración de la isquemia estaba relacionado con la pérdida de filamentos de actina (F-actina). En cambio, no se detectó una correlación directa entre la duración de la reperfusión y la pérdida de F-actina (Cipolla y Curry, 2002), indicando que en la reperfusión el mecanismo responsable del daño miogénico es diferente al inducido por la isquemia. Previamente, el grupo de Korthuis y Granger (1993) había mostrado que el aumento de RONS producido durante la isquemia podría participar en la disrupción del citoesqueleto de actina. En este sentido, se ha identificado al ONOO^- como uno de los posibles responsables (Maneen y cols., 2006; Tiago y cols., 2006; Maneen y Cipolla, 2007; Coucha y cols., 2013; Palomares y Cipolla, 2014). Dicho radical libre se forma durante la isquemia cerebral focal no sólo en el tejido cerebral (Warner y cols., 2004; Maneen y cols., 2006; Romanos y cols., 2007; Pérez-Asensio y cols., 2010; Coucha y cols., 2013), sino también en las arterias cerebrales (Maneen y cols., 2006; Jiménez-Altayó y cols., 2009; Coucha y cols., 2013), y cada vez hay más evidencias sobre sus efectos perjudiciales en las arterias cerebrales (Faraci, 2006; Iadecola y Davisson, 2008; Coucha y cols., 2013). Se ha propuesto que la pérdida de tono miogénico arterial inducida por el ONOO^- tras la I/R podría deberse a su efecto nitrante sobre la F-actina de las células musculares, causando así su disrupción (Maneen y cols., 2006; Maneen y Cipolla, 2007). Cabe destacar que en el estudio de Maneen y cols. (2006), sólo concentraciones de ONOO^- a partir del orden del micromolar provocaron la pérdida de tono miogénico, ya que concentraciones menores inducían la

contracción de la arteria cerebral; no obstante, se ha propuesto que los niveles de ONOO^- existentes durante la I/R alcanzarían concentraciones micromolares (Dewitt y cols., 2001). Sin embargo, no se puede descartar que el ONOO^- provoque, además, alteraciones miogénicas por mecanismos diferentes al de la nitrosilación de la F-actina, aunque parecería que la capacidad de dicho radical libre para alterar la actividad de los canales BK_{Ca} (Li y cols., 2005) y para oxidar los tioles proteicos, mecanismos que favorecerían la hiperpolarización de las CML y la desnaturalización de la F-actina, respectivamente, no afectarían al tono miogénico (Maneen y Cipolla, 2007).

Aunque el ONOO^- resulta una diana terapéutica clave para limitar la parálisis vascular durante la I/R, determinados estudios han demostrado que también ejercería un efecto neuroprotector en la llamada *tolerancia isquémica* (Kirino, 2002; Kunz y cols., 2007) o incluso que se necesitaría una producción basal de ONOO^- para mantener el tono miogénico basal (Coucha y cols., 2013).

3.7 Tratamiento farmacológico en la isquemia cerebral

El objetivo principal en el tratamiento del ictus isquémico es restituir, lo antes posible, el flujo sanguíneo a la zona afectada. Actualmente, el único tratamiento farmacológico aprobado en Europa para el ictus isquémico es el activador tisular del plasminógeno recombinante (rt-PA), proteína proteolítica que de manera natural se sintetiza en el endotelio y que cataliza la conversión del plasminógeno a plasmina. Este trombolítico sistémico debe administrarse durante las primeras 4.5 h del inicio de los síntomas (*Stroke Study Group*, 1995), aunque dada su estrecha ventana terapéutica y el riesgo asociado a

hemorragia y rotura de la BHE por activación de las MMP (Tsuji y cols., 2005), este tratamiento se administra en menos del 10% de los casos (Khaur y cols., 2003; Fonarow y cols., 2011). Además, en un estudio reciente (Yu y cols., 2015) los pacientes tratados con rt-PA presentaron un riesgo tres veces mayor de experimentar hiperemia reactiva que los no tratados. El rt-PA se administra por vía intravenosa, aunque se ha observado que, si se infunde por vía intraarterial, mejora el pronóstico funcional (Fiels y cols., 2011). Aun así, el uso de rt-PA mediante esta última vía de administración todavía no ha sido aprobado por la *Food and Drug Administration*.

La zona de penumbra de un infarto resulta una diana clave para el desarrollo de estrategias terapéuticas, de manera que, con el fin de favorecer la eficacia del tratamiento trombolítico, actualmente se utilizan técnicas de imagen para determinar la zona cerebral salvable. No obstante, también se debería tener en cuenta la capacidad de recanalización de la arteria afectada (Lansberg y cols., 2012; Kidwell y cols., 2013; Campbell y cols., 2015).

3.7.1 Fármacos antioxidantes

El daño inducido por la acumulación extracelular de glutamato, el incremento de la producción de RONS y la respuesta inflamatoria exacerbada que se producen tras un ictus isquémico, son las tres dianas terapéuticas en las que se focalizan los estudios actuales.

El cerebro es muy susceptible al estrés oxidativo/nitrosativo, y las RONS contribuyen significativamente al daño cerebral isquémico, especialmente cuando la isquemia se sigue de reperusión (McCord, 1985; Jiménez-Altayó y

cols., 2009; Coucha y cols., 2013). Además, en muchas patologías cardiovasculares, la mayoría relacionadas con un aumento de estrés oxidativo/nitrosativo, se produce un remodelado vascular (Cipolla y cols., 1997; Jiménez-Altayó y cols., 2009). De manera que, las terapias antioxidantes capaces de alterar la biodisponibilidad de las RONS disminuyendo su producción y/o aumentando su eliminación podrían reducir el daño tisular de la I/R, así como revertir el remodelado vascular asociado. Hasta la fecha, pese a que numerosos fármacos antioxidantes han resultado ser efectivos en modelos experimentales de isquemia cerebral, la mayoría han fracasado en la clínica; algunos ejemplos de ello son el compuesto recaptador de RONS NXY-059 (Diener y cols., 2008) o el antioxidante tirilazad (*Tirilazad International Steering Committee*, 2000). No obstante, la edavarona, barredor de radicales libres, ha demostrado ser efectiva en preclínica (Abe y cols., 1988; Kawai y cols., 1997; Lapchak y Zivin, 2009) además de mejorar el pronóstico en pacientes si se administra durante las primeras 72 h tras sufrir el infarto cerebral (*Evadarone Acute Infarction Study Group*, 2003; Kikuchi y cols., 2013); a pesar de que este tratamiento está aprobado en Japón desde el 2001, actualmente aún se está evaluando la ventana terapéutica óptima para su administración.

3.7.2 El ácido úrico (AU)

El AU (Figura 12) se obtiene del catabolismo de las purinas a partir de la reacción mediada por la enzima xantina oxidasa, generándose paralelamente $O_2^{\cdot-}$ (Berry y Hare, 2004). En la mayoría de mamíferos el AU es metabolizado a alantoína, compuesto más soluble, por la enzima hepática uricasa, aunque en humanos ésta se encuentra mutada e inactiva (Wu y cols., 1992). Este último

hecho, junto con su deficiente reabsorción, comporta que en humanos exista una concentración de AU más elevada en comparación con otras especies (Johnson y cols., 2005). A pesar de que en humanos no se dispone de una uricasa funcional, el AU se oxida a alantoína mediante vías no enzimáticas por acción de las RONS, como el ONOO^- o el OH^- (Hicks y cols., 1993; Santos y cols., 1999); de acuerdo con ello, se han descrito niveles elevados de alantoína en patologías relacionadas con un mayor nivel de estrés oxidativo/nitrosativo, como la isquemia cerebral (Gruber y cols., 2009). Por otro lado, el incremento de RONS en el ictus isquémico aumenta la síntesis y actividad de la XO, y con ello los niveles locales de AU (Tayag y cols., 1996).

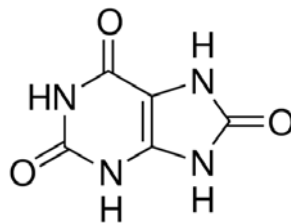


Figura 12. Estructura molecular del ácido úrico.

El AU es el antioxidante natural más abundante en humanos y constituye dos terceras partes de la capacidad antioxidante del plasma (Becker, 1993); concretamente, sus concentraciones en plasma pueden llegar a ser casi diez veces superiores a las de otros antioxidantes, como el ascorbato (Ames y cols., 1981). A nivel cerebral, los mecanismos antioxidantes endógenos se clasifican en enzimáticos, incluyendo la SOD, la catalasa y la glutatión peroxidasa, y no enzimáticos, entre los que se encuentran el glutatión, la vitamina A y C, y el AU. Actualmente existen evidencias suficientes acerca de las propiedades

antioxidantes y neuroprotectoras del AU sobre el tejido cerebral isquémico: i) es un potente neutralizador de RONS como el H_2O_2 , el OH^- , el ONOO^- y los radicales libres obtenidos de la degradación de este último (Squadrito y cols., 2000; Whiteman y cols., 2002); ii) induce la síntesis neuronal del antioxidante glutatión (Aoyama y cols., 2011); iii) previene la toxicidad inducida por el glutamato sobre la astrogliá (Du y cols., 2007); iv) inhibe eficazmente la peroxidación lipídica; v) previene la degradación de la SOD; vi) actúa como quelante de metales de transición; y vii) inhibe la reacción de Fenton, proceso de oxidación por el cual se genera OH^- (Squadrito y cols., 2000).

A nivel preclínico, el tratamiento con AU ha mostrado efectos neuroprotectores en modelos de isquemia cerebral, tanto transitoria como permanente, en rata (Yu y cols., 1997; Romanos y cols., 2007), sugiriendo también efectos sinérgicos en la reducción del volumen de infarto si se combina con rt-PA (Romanos y cols., 2007). En un estudio con ratones (Ma y cols., 2009), la administración de AU también consiguió disminuir el tamaño del infarto, debido, en parte, a su capacidad antioxidante/antinitrante al disminuir la formación de O_2^- y ONOO^- en el parénquima cerebral.

En pacientes que padecieron ictus isquémico, se ha observado una asociación entre concentraciones séricas elevadas de AU endógeno y el buen pronóstico funcional tras la administración de rt-PA (Chamorro y cols., 2002; Amaro y cols., 2011; Logallo y cols., 2011), sugiriendo que el AU mejora los beneficios del tratamiento trombolítico. No obstante, los niveles endógenos de AU se van agotando gradualmente tras la isquemia (Galiballa y cols., 2002; Amaro y cols., 2007; Hong y cols., 2010). En el ensayo clínico URICO-ICTUS[®] de fase II realizado por Amaro y cols. (2007; 2009) se evaluó la seguridad

clínica y la actividad biológica del AU administrado en pacientes con ictus isquémico y tratados con rt-PA. Los resultados confirmaron su seguridad y permitieron establecer los niveles circulantes de malonaldehído (marcador de peroxidación lipídica) y de MMP-9 como biomarcadores de eficacia clínica, ya que éstos disminuyeron en los pacientes tratados con AU. Dadas las evidencias preclínicas que mostraron el efecto protector del AU y los resultados clínicos de fase II obtenidos, se realizó el ensayo clínico URICO-ICTUS[®] de fase IIb/3 (Chamorro y cols., 2014), que permitió evaluar si la administración de AU junto con rt-PA era clínicamente más eficaz que el tratamiento únicamente con trombolítico. Los resultados mostraron que aquellos pacientes tratados con AU y rt-PA presentaron un incremento absoluto del 6% en la tasa de pronóstico excelente a los 3 meses.

La hiperglucemia puede afectar a más de un 30% de los pacientes con ictus isquémico agudo, a menudo sin un diagnóstico previo de diabetes (Dungan y cols., 2009), y está asociada a un peor pronóstico, incluyendo mayores infartos, formación de edema y riesgo de mortalidad (Pulsinelli y cols., 1982; Capes y cols., 2001; Bruno y cols., 2010). Se conoce que el daño asociado a la hiperglucemia es menor en modelos de isquemia permanente (Quast y cols., 1997), sugiriendo que la reperfusión juega un papel importante. Por otro lado, las mujeres presentan niveles basales de AU inferiores a los de los hombres (Chamorro y cols., 2002), y a partir de los 65 años el riesgo de sufrir un ictus isquémico es mayor que en ellos (Davis y cols., 2013). En el estudio de Chamorro y cols. (2014), tanto los pacientes con hiperglucemia al ingreso como las mujeres parecían obtener mayor beneficio clínico del

tratamiento con AU, probablemente por ser perfiles con mayor exposición al daño tisular, o bien, menor capacidad antioxidante endógena, respectivamente.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

HIPÓTESIS

Evidencias experimentales demuestran que tras un episodio transitorio de isquemia cerebral focal se inducen cambios estructurales, mecánicos y miogénicos en la pared de las arterias cerebrales, así como un aumento en la producción de peroxinitrito, tanto en los vasos sanguíneos como en el parénquima cerebral. Todas estas alteraciones se han asociado con la expansión del daño cerebral. El peroxinitrito es una especie oxidante/nitrante que, debido a su elevada capacidad de modificar proteínas, puede deteriorar diferentes tejidos, incluido el cerebro. En el presente estudio hemos hipotetizado que el peroxinitrito es un factor clave implicado en las alteraciones de la arteria cerebral media y del daño cerebral que se observan tras episodios de isquemia-reperfusión.

OBJETIVOS

El **objetivo general** de este trabajo ha sido estudiar el papel del peroxinitrito en las alteraciones cerebrovasculares que se producen después de un episodio de isquemia cerebral focal transitoria.

Objetivos específicos:

1. Analizar la participación del peroxinitrito en las alteraciones estructurales, mecánicas y miogénicas de la arteria cerebral media tras la isquemia-reperfusión, en presencia y ausencia de hiperemia reactiva, proceso ligado a incrementos en la formación de peroxinitrito en tejido cerebral.
2. Estudiar el potencial efecto beneficioso del ácido úrico, barredor de peroxinitrito, sobre las alteraciones vasculares y el infarto cerebral observados tras la isquemia-reperfusión, tanto en presencia como en ausencia de hiperemia reactiva.
3. Evaluar las respuestas vasodilatadoras de la arteria cerebral media tras la isquemia-reperfusión, analizando el papel del peroxinitrito sobre las alteraciones observadas.
4. Estudiar los mecanismos implicados en las alteraciones de la vasodilatación inducidas por el peroxinitrito tras la isquemia-reperfusión.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizaron ratas macho ($n = 191$) de la cepa *Sprague-Dawley* (SD) de 2 meses de edad (270–320 g de peso corporal), suministradas por Harlan (Barcelona, España). El cuidado y tratamiento de los animales se realizó siguiendo las directivas establecidas por la legislación española (RD 1201/2005) y de acuerdo con las directrices de la Directiva Europea (2010/63/EU) para la Protección de Animales Vertebrados Utilizados para Experimentación y otros Fines Científicos. Los protocolos experimentales realizados fueron aprobados por el Comité de Ética de la *Universitat Autònoma de Barcelona*.

1. MODELO DE ISQUEMIA CEREBRAL FOCAL

La cirugía cerebral se realizó siguiendo el método descrito por Pérez-Asensio y cols. (2010). La anestesia se indujo con isoflurano al 5%, vaporizado en una mezcla de O₂ y N₂O (30:70) seguida por una dosis de mantenimiento (isoflurano al 2.5-3 % más O₂ y N₂O 30:70). A continuación, se canuló la arteria femoral izquierda para medir y controlar la presión arterial durante toda la intervención quirúrgica. La temperatura (T^a) corporal, controlada con una sonda rectal, se mantuvo a 37 ± 0.5 °C mediante una manta eléctrica. Seguidamente, se procedió a abrir el campo de cirugía colocando retractores para separar los músculos esternomastoideo, digástrico y esternoidal. Justo debajo se encuentra el punto de bifurcación de la arteria carótida común en arteria carótida externa e interna. El primer paso consistió en electrocoagular y cortar las ramas laterales de las arterias carótida externa, tiroidea superior y occipital, para proceder a ligar la arteria pterigopalatina, de manera que sólo quedara abierta

a la circulación la arteria carótida interna. Por debajo de la mandíbula se encuentra el punto donde la arteria carótida interna se bifurca en las arterias maxilar y lingual. El segmento de arteria carótida externa sirvió de guía para la introducción del monofilamento de *nylon 4/0* con el extremo redondeado y engrosado para permitir la oclusión. Con dos clips de microcirugía se pinzaron la arteria carótida común y la arteria carótida interna, lo que permite trabajar en el segmento restante de arteria carótida externa sin peligro de hemorragia. Seguidamente, se realizó una incisión en el extremo de la arteria carótida externa y se introdujo el filamento, que se aseguró con un hilo de sutura ligado alrededor de esta arteria. Se retiraron los clips de la arteria carótida común e interna y se deslizó el filamento de *nylon* unos 21 mm por el interior de la carótida interna hasta el nivel en el cual la ACM se ramifica desde el círculo de Willis. Una vez ocluida la ACM, se colocó un clip en la arteria carótida común. Transcurridos 90 min en los animales isquémicos y menos de 1 min en los animales control (*sham*), se retiró el clip de la arteria carótida común, se suturó la incisión y se permitió que la rata se recuperara de la anestesia hasta el momento de su sacrificio, 24 h después (periodo de reperfusión).

2. MEDICIÓN DEL FLUJO SANGUÍNEO CEREBRAL

El FSC de la ACM se monitorizó mediante un sistema de láser-Doppler (Perimed AB, Järfalla, Suecia) antes (30 min), durante (90 min) y después (60 min, periodo de reperfusión) de la oclusión (isquemia). Para ello, el día anterior a la realización de la isquemia se les implantó, bajo anestesia, una guía en la superficie dorsal del cráneo. La guía se fijó al hueso craneal con cianocrilato usando las siguientes coordenadas estereotáxicas: 2 mm posterior y 3.5 mm

hacia la derecha de bregma, que corresponden a una porción cortical superficial del territorio irrigado por la ACM del lado ipsilateral. Al día siguiente, la sonda láser-Doppler se introdujo por la guía y se inició el registro del FSC. Cuando los valores de registro del FSC se estabilizaron se procedió a inducir la isquemia tal y como se ha descrito anteriormente. Aquellos animales que, durante los primeros 15 min de reperfusión mostraron un incremento del FSC igual o superior al 20% del valor basal (anterior a la oclusión) se consideró que sufrieron hiperemia reactiva. Tanto la hemorragia subaracnoidea como la incorrecta medición del FSC debida a problemas técnicos durante la cirugía se utilizaron como criterio de exclusión de animales del estudio.

3. TRATAMIENTO FARMACOLÓGICO

El AU (16 mg/kg) o el vehículo (VEH, 3 ml de tampón Locke) se infundieron durante 20 min por la vena femoral derecha a los 135 min de iniciarse la isquemia (o, lo que es lo mismo, a los 45 minutos del inicio de la reperfusión). El FeTPPS (20 mg/kg) o su VEH (1 ml de NaCl al 0.9%) se administraron por vía intraperitoneal a los 10 min del inicio de la isquemia. La elección de las dosis utilizadas viene avalada por estudios previos en los que se demostró la eficacia del AU para proteger del daño inducido por isquemia cerebral focal transitoria (Yu y cols., 1998; Romanos y cols., 2007; Ma y cols., 2012); y la eficacia del FeTPPS para inhibir los efectos del ONOO⁻ sobre el tono miogénico de las arterias cerebrales tras la I/R cerebral (Coucha y cols., 2013).

Los animales se asignaron de forma aleatoria al grupo *sham*, control (no sometidos a ningún proceso quirúrgico), o isquémico (sometidos a I/R). En

referencia a los experimentos de miografía de presión, las ratas isquémicas, a su vez, se subdividieron en función de si presentaron o no hiperemia durante la reperfusión, y del tratamiento farmacológico que recibieron, obteniéndose así los siguientes grupos experimentales: ratas *sham* + VEH, $n = 13$; ratas isquémicas no hiperémicas (I/NH) + VEH, $n = 12$; ratas isquémicas hiperémicas (I/H) + VEH, $n = 11$; ratas *sham* + AU, $n = 5$; ratas I/NH + AU, $n = 8$; ratas I/NH + AU, $n = 12$. En los experimentos de reactividad vascular, se obtuvieron los siguientes grupos experimentales: ratas *sham*, $n = 15$; ratas control, $n = 73$; ratas isquémicas, $n = 21$; ratas *sham* + VEH, $n = 8$; ratas isquémicas + VEH, $n = 7$; ratas isquémicas + FeTPPS, $n = 6$.

4. EVALUACIÓN DEL DAÑO NEUROLÓGICO

A las 24 h de la isquemia, y antes del sacrificio, los animales se sometieron a un test simple (Tabla 1) descrito por Justicia y cols. (2006) que valora, sobre una escala de 9 puntos (0, sin empeoramiento; 9, máximo empeoramiento), el grado de daño neurológico inducido por la I/R. Los puntos conseguidos en cada uno de los cuatro parámetros se sumaron para la obtención de la puntuación neurológica final.

A. Desplazamiento/exploración:	C. Sujeción de la pata delantera izquierda:
<p>(0) Normal</p> <p>(1) Desplazamiento sin exploración</p> <p>(2) Desplazamiento al estimular o no se desplaza en absoluto</p>	<p>(0) No permite</p> <p>(1) Permite con resistencia</p> <p>(2) No opone resistencia</p>
B. Deriva a la izquierda:	D. Reflejo paracaídas:
<p>(0) Nunca</p> <p>(1) Al elevar por la cola (hacia delante y hacia atrás)</p> <p>(2) Espontáneamente</p> <p>(3) "Peonza" (giro sin desplazamiento)</p>	<p>(0) Simétrico</p> <p>(1) Asimétrico</p> <p>(2) Pata izquierda retraída hacia el cuerpo</p>

Tabla 1. Test simple para la evaluación del daño neurológico inducido por I/R cerebral en ratas tras 24h de reperusión.

5. PREPARACIÓN DE LOS TEJIDOS Y DEL PLASMA

Las ratas *sham* e isquémicas se sacrificaron, previa anestesia con una mezcla de isoflurano al 5% vaporizado en O₂ y N₂O (30:70), por decapitación a las 24 h del inicio de la reperusión (Jiménez-Altayó y cols., 2009). Una vez desangrado el animal, se extrajo el cerebro y se mantuvo a 4 °C en una solución oxigenada (95% de O₂, 5% de CO₂) de Krebs-Henseleit (KH). Posteriormente, se diseccionó la ACM tanto del hemisferio ipsilateral (lado en el que se produjo la oclusión) como del contralateral, manteniéndola en solución de KH oxigenada, a 4 °C. El segmento de la ACM ipsilateral proximal al círculo de Willis se utilizó para los estudios de miografía (miografía de presión y reactividad vascular) realizados el mismo día de su disección, mientras que las

distintas porciones del segmento distal se utilizaron para estudios posteriores de producción de O_2^- , inmunofluorescencia y niveles de ARNm. La disposición anatómica de la ACM situada en la base del cerebro se muestra en la Figura 13. Una vez realizados los estudios de miografía de presión, el segmento arterial se fijó a una presión intraluminal de 70 mmHg con paraformaldehído al 4% (PFA; pH 7.4), durante 45 min a T^a ambiente, para analizar posteriormente la distribución de los núcleos de los distintos tipos celulares que conforman la pared arterial y para el estudio de los filamentos de actina endoteliales.

El segmento de ACM a utilizar en los estudios de inmunofluorescencia se fijó durante 45 min, a T^a ambiente, con PFA seguido de tres lavados, de 10 min cada uno, con tampón fosfato salino 0.1 M (PBS; pH 7.4). Posteriormente la arteria se mantuvo toda la noche en solución de sacarosa al 30% en PBS. A continuación se transfirió a un criomolde de plástico (Bayer Química Farmacéutica, España), sumergida en el medio de inclusión Tissue-Tek® OCT (*Optimum Cutting Temperature*, Sakura Finetek Europe, Zoeterwoude, Holanda) para su congelación con nitrógeno líquido y almacenamiento a -70 °C.

Para la determinación de O_2^- , los segmentos de ACM se sumergieron durante toda la noche en una solución de sacarosa al 30% en KH, y, posteriormente, se congelaron y almacenaron siguiendo el mismo protocolo descrito para los estudios de inmunofluorescencia.

La tercera sección coronal anterior de 2 mm de cerebro, previamente fijada con PFA y mantenida en PBS a 4 °C, se cortó, mediante un vibrátomo, en

secciones coronales de 50 μm que se almacenaron en solución anticongelante a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta el día de los experimentos de inmunofluorescencia.

Las muestras de sangre se extrajeron de cada rata, bajo anestesia, por punción intracardiaca justo antes de sacrificarlas (a las 24 h de reperfusión), o a través de la arteria femoral izquierda a los 0 min (justo antes del tratamiento farmacológico), 10 min, 30 min y a las 24 h después de la administración del AU o del VEH realizada durante la reperfusión. Se centrifugaron a 3000 g durante 10 min, a T^{a} ambiente, en tubos Vacutainer[®] que contenían el anticoagulante ácido etilendiaminotetraacético (EDTA; Becton Dickinson, Plymouth, Inglaterra). Seguidamente, se recuperó el plasma (sobrenadante), el cual se mantuvo a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta la determinación de los niveles plasmáticos de citoquinas, nitritos y AU.

Para el estudio de los niveles de AU en cerebro, los animales anestesiados se perfundieron por vía intracardiaca con NaCl al 0.9% para eliminar la sangre de los vasos cerebrales, y, tras el sacrificio, el cerebro se obtuvo a los 10 y 30 min después del tratamiento con AU o VEH.

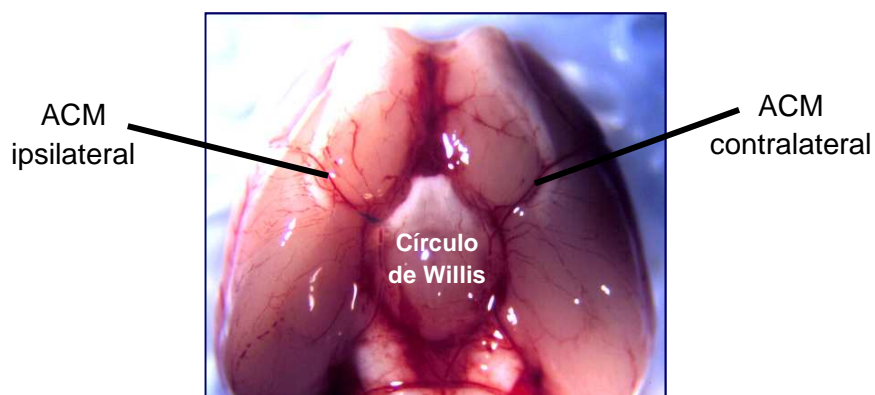


Figura 13. Localización anatómica de la arteria cerebral media (ACM) en la base del cerebro de rata.

6. EVALUACIÓN DEL VOLUMEN DE INFARTO CEREBRAL

El volumen de infarto cerebral se evaluó a las 24 h de reperfusión siguiendo el método descrito por Pérez-Asensio y cols. (2010). El cerebro de ratas *sham* e isquémicas se cortó en secciones coronales de 2 mm, que se tiñeron durante 10 min y a 37 °C con cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolio (TTC) al 3% en NaCl al 0.9%, y se fijaron con PFA durante 24 h. Las áreas (mm²) infartadas de los animales destinados al estudio de miografía de presión se midieron con el programa de análisis de imagen *ImageJ* (National Institutes of Health, Bethesda, MD, EUA) y los valores resultantes se integraron para obtener el volumen de infarto (mm³). Las secciones cerebrales fueron digitalizadas junto a una escala milimetrada. Las áreas fueron seleccionadas manualmente y se identificó la zona infartada como la zona pálida en la imagen (sin tinción con TTC). El área de infarto, corregida por el edema, se calculó multiplicando el área infartada por la relación entre el área contralateral y el área ipsilateral. Para el cálculo del volumen de infarto se integraron las áreas de las 6–7 secciones del cerebro analizadas.

7. EVALUACIÓN *IN VITRO* DE LA CAPACIDAD DEL AU PARA ATRAVESAR LA BARRERA HEMATOENCEFÁLICA

La penetración predictiva de AU por transporte pasivo al cerebro se evaluó utilizando el ensayo de permeabilidad *in vitro* (Di y cols., 2003) que consta de membranas artificiales en paralelo que simulan la BHE (PAMPA-BBB). La permeabilidad *in vitro* (Pe) al AU junto a 14 fármacos de referencia (proxicam, promazin, ofloxacino, lomefloxacino, corticosterona, hidrocortisona, clonidina,

imipramina, desipramina, verapamil, norfloxacin, cimetidina, progesterona y testosterona; Sigma-Aldrich Chemical Co., St. Louis, MO) se determinó, por triplicado, a través de extractos lipídicos de membrana de cerebro porcino (Avanti Polar Lipids, París, Francia). Esta técnica se basa en la utilización de dos placas microtituladoras, una donadora y otra aceptora, el contenido de las cuales está separado por la membrana lipídica (Figura 14). La placa donadora es la que contiene los fármacos disueltos e incorpora la membrana. La placa aceptora únicamente contiene tampón. El fármaco atraviesa la membrana mediante transporte pasivo, hasta que la concentración en ambas placas se equilibra.

A cada pocillo de la placa donadora se le añadieron 10 μ l de extracto lipídico de membrana e inmediatamente después 170 μ l de fármaco (0,1 mg/ml en tampón PBS:etanol (70:30) previamente centrifugado. Como blanco se utilizó la mezcla PBS:etanol. Posteriormente, se añadieron 385 μ l del tampón PBS:etanol en cada pocillo para asegurar el contacto de la membrana de la placa donadora con la solución de la placa aceptora. Ambas placas se unieron, se incubaron durante 16 h a 25 °C y se procedió a la lectura de la absorbancia en cada uno de los pocillos de la placa receptora, realizando un barrido de 250 a 500 nm. La permeabilidad se calculó relacionando la absorbancia obtenida después de la incubación de la placa aceptora con la absorbancia teórica que se conseguiría si todo el fármaco hubiese atravesado la membrana lipídica, a través de la siguiente ecuación, en la cual se tiene en cuenta el volumen (V) añadido al pocillo donador (D) y aceptor (A), el área de la membrana lipídica, y el tiempo de incubación:

$$P_{app} = C \times -\ln \left(1 - \frac{[\text{drug}_{\text{acceptor}}]}{[\text{drug}_{\text{equilibrium}}]} \right)$$

$$\text{donde: } C = \frac{V_D \times V_A}{(V_D + V_A) \times \text{area} \times \text{time}}$$

Para evaluar la permeabilidad de la membrana lipídica al AU se construyó una recta de calibrado a partir de los fármacos de referencia. Para la validación del ensayo se evaluó la correlación lineal entre la permeabilidad obtenida experimentalmente y la descrita (Di y cols., 2003) para los fármacos de referencia seleccionados ($y = 1.566x - 1.089$; $R^2 = 0.9303$). A partir de esta ecuación y, teniendo en cuenta los límites determinados por Di y cols. (2003), se establecieron los rangos de valores que determinaron una permeabilidad alta: [sistema nervioso central (SNC)⁺]: $Pe (10^{-6} \text{ cm/s}) > 5.175$; una permeabilidad baja: (SNC⁻): $Pe (10^{-6} \text{ cm/s}) < 2.043$; y una permeabilidad intermedia: (SNC^{+/-}): $5.175 > Pe (10^{-6} \text{ cm/s}) > 2.043$.

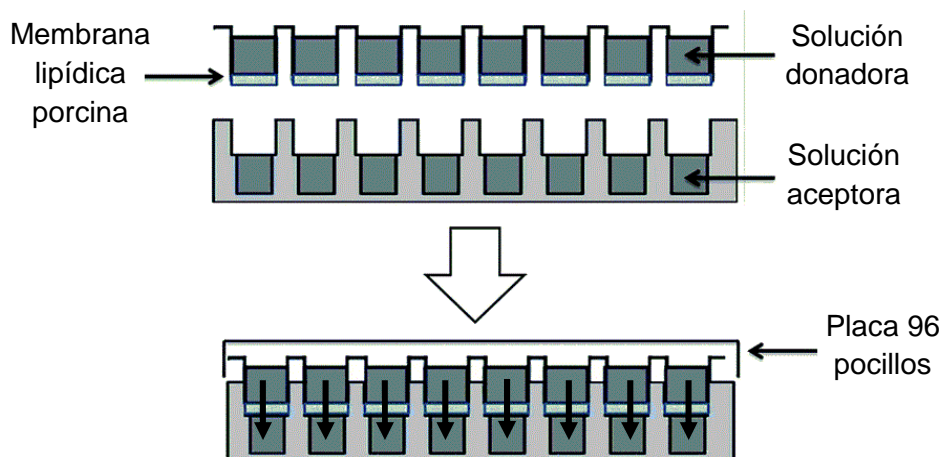


Figura 14. Representación esquemática de la técnica PAMPA-BBB (adaptado de <http://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2015/ra/c4ra17255h>).

8. DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE AU EN PLASMA Y CEREBRO

La concentración de AU en plasma y en tejido cerebral se evaluó mediante cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) con detección ultravioleta. El procedimiento utilizado para la determinación de AU se adaptó de un método descrito previamente por Kim y cols. (2001). Para ello, el plasma (100 μ l) y el tejido cerebral (700 mg) se desproteinizaron con ácido tricloroacético al 10% (20 μ l en plasma; 150 μ l en cerebro), se *sonicaron* durante 20 s y se centrifugaron a 12000 g durante 5 min. Después, 10 μ l de sobrenadante se inyectaron en el sistema de HPLC (PerkinElmer, Madrid, España) que contenía una bomba 200E, un autodispensador de muestras 717 plus y un detector dual de absorbancia λ de 2487 (Figura 15). Se utilizó un ODS2 de fase inversa (4.6 • 200 mm, 5 μ m de tamaño de partícula; Waters, Barcelona, España). La fase móvil utilizada fue metanol- 5 mM/acetato de amonio/acetonitrilo (1:96:3 v/v/v), que corrió a un flujo isocrático regular de 1.2 ml/min, y el detector de longitud de onda ultravioleta se fijó en 292 nm. La cuantificación se realizó a partir de la interpolación de una recta de calibrado. El pico de AU en el plasma y en cerebro se confirmó por espectrometría de masas.

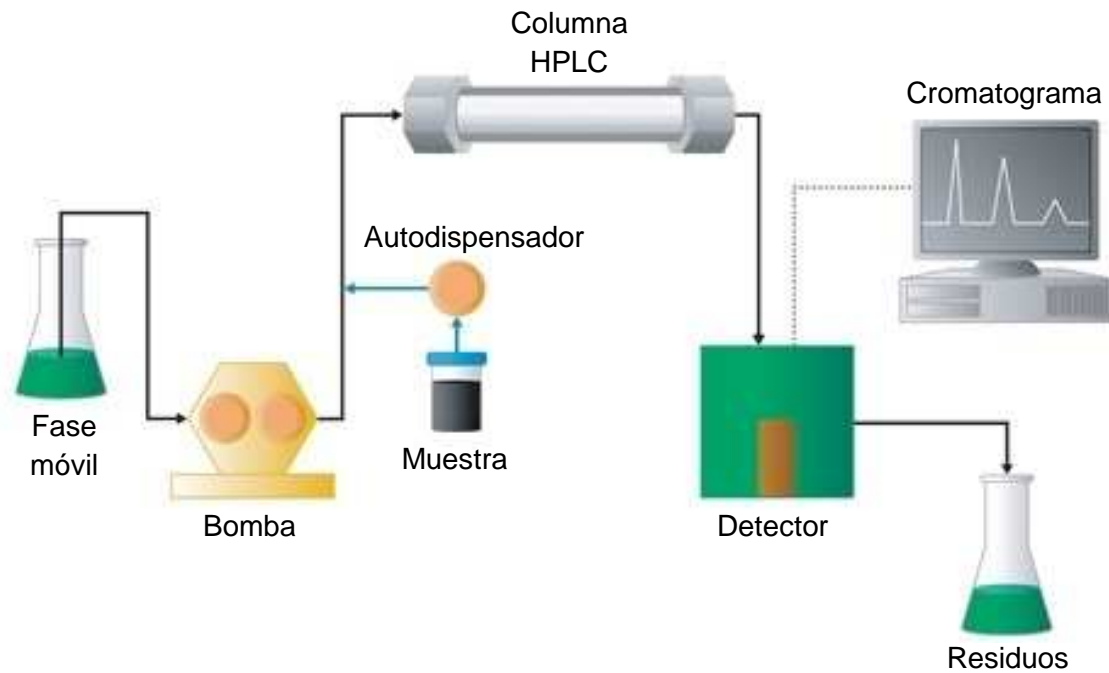


Figura 15. Representación esquemática del sistema cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC; adaptado de http://www.waters.com/waters/es_ES/How-Does-High-Performance-Liquid-ChromatographWork%3F/nav.htm?cid=10049055&locale=es_ES).

9. DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES PLASMÁTICOS DE NITRITOS

Los nitritos (NO_2^-) son el único producto final estable y no volátil de la degradación del NO en soluciones acuosas como líquido cefalorraquídeo y el líquido sinovial, y su concentración es proporcional a la cantidad de NO inicial. No obstante, en el plasma sanguíneo los NO_2^- reaccionan con la oxihemoglobina dando lugar a nitratos (Stichtenoth y Frölich, 1998; Ersoy y cols., 2002). La medida de nitritos plasmáticos se realizó mediante una modificación del método de Griess (Green y cols., 1982) descrita por Miranda y cols. (2001) que permite la transformación de nitratos a NO_2^- . Esta técnica se basa en una detección colorimétrica en la que el reactivo de Griess, formado por sulfanilamida y dihidroclorato N-(1-Naftil)-etilendiamina (NEDA), se

combina con los NO_2^- del plasma para formar un compuesto nitrogenado rojizo que absorbe luz visible a 540 nm. La intensidad del color producido es proporcional a la cantidad de NO_2^- presente en la muestra.

En primer lugar, se llevó a cabo la desproteínización del plasma, ya que la hemoglobina puede interferir con la reacción. Para ello, se mezclaron las muestras plasmáticas con etanol (1:2 v/v), se centrifugaron (10000, 10 min, 4 °C) y se recogió el sobrenadante. A continuación, por cada 100 μl de sobrenadante se añadieron 100 μl de cloruro de vanadio, que transforma los nitratos en NO_2^- , y 100 μl de la mezcla de sulfamida y NEDA. La concentración de NO_2^- de las muestras se determinó interpolando en una curva de calibración de concentraciones conocidas de nitrito de sodio frente a la absorbancia obtenida a 540 nm por espectrofotometría.

10. DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES PLASMÁTICOS DE CITOQUINAS

Las muestras de plasma se prepararon para el análisis en una placa microtituladora de 96 pocillos utilizando el kit de ensayo MILLIPLEX (Millipore Corp., Billerica, MA, EUA) que permite la detección luminométrica de 27 citoquinas/quimiocinas en rata, siguiendo los protocolos específicos del kit proporcionados por Millipore. Los analitos se cuantificaron mediante el luminómetro Magpix, que utiliza la tecnología xMAP (Luminex Corp., Austin, TX) y xPONENT 4,2 (Luminex). La tecnología xMAP se basa en microesferas magnéticas fluorescentes recubiertas de antígenos citoquina-específicos. Después de que las microesferas capturen las citoquinas, un anticuerpo anti-inmunoglobulina humana conjugado con biotina se une a ese complejo.

Posteriormente, se añade un conjugado estreptavidina-ficoeritrina (PE) que se adhiere a la biotina como molécula señalizadora. En el interior del luminómetro, las microesferas magnéticas se disponen en una monocapa mediante un imán, donde se utilizan dos diodos emisores de luz que excitan tanto el fluoróforo de las microesferas como la PE, mediante haces de luz de longitudes de onda de 635 y 488 nm respectivamente. El fluoróforo de la microesfera permite la identificación de los antígenos, y la PE conjugada permite la detección de la cantidad de anticuerpo específico presente en la muestra (Figura 16). Una cámara, con dispositivo de carga acoplada, capta estas imágenes, que son analizadas por el programa *Analyst MILLIPLEX* (Millipore).

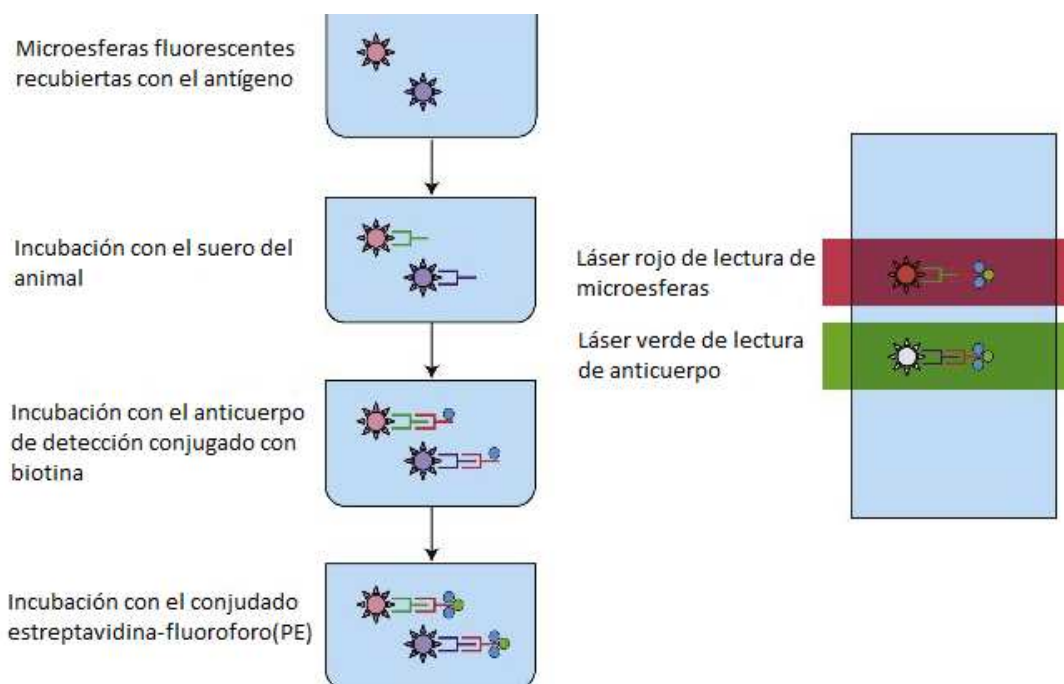


Figura 16. Representación esquemática del ensayo luminométrico múltiple para la detección de citoquinas (adaptado de <http://www.reumatologiaclinica.org/es/tecnicas-inmunologicas-que-apoyan-el/articulo/13149602/>).

11. MEDIDAS EN ACM

11.1 Miografía de presión

11.1.1 Características generales

Para estudiar las propiedades estructurales, mecánicas y miogénicas se usó el método utilizado anteriormente por nuestro grupo de investigación (Jiménez-Altayó y cols., 2009). Para ello, las arterias se montaron entre dos microcánulas de vidrio en un baño de órganos de 10 ml que contenía KH, acoplado a un miógrafo de presión (modelo P100; Danish Myo Technology, Aarhus, Dinamarca; Figura 17), que permite modificar la presión intravascular. Cada extremo del segmento arterial se aseguró con hilo de sutura de *nylon*. Después de comprobar que todas las ramas arteriales laterales estuvieran atadas para evitar pérdidas de presión intravascular, las paredes del vaso se ajustaron hasta quedar paralelas. Posteriormente, se aumentó la presión intraluminal a 140 mmHg manteniendo la pared vascular en paralelo. A continuación, se disminuyó la presión intraluminal a 70 mmHg y se estabilizó la preparación durante 1 h a 37 °C en KH oxigenado (95% O₂, 5% CO₂), antes de realizar los experimentos.

El sistema de miografía de presión (Figura 17) permite medir los cambios en el diámetro externo e interno del vaso en condiciones que se asemejan a las fisiológicas mediante un estereomicroscopio invertido de alta resolución, que lleva incorporado un sistema de vídeo.

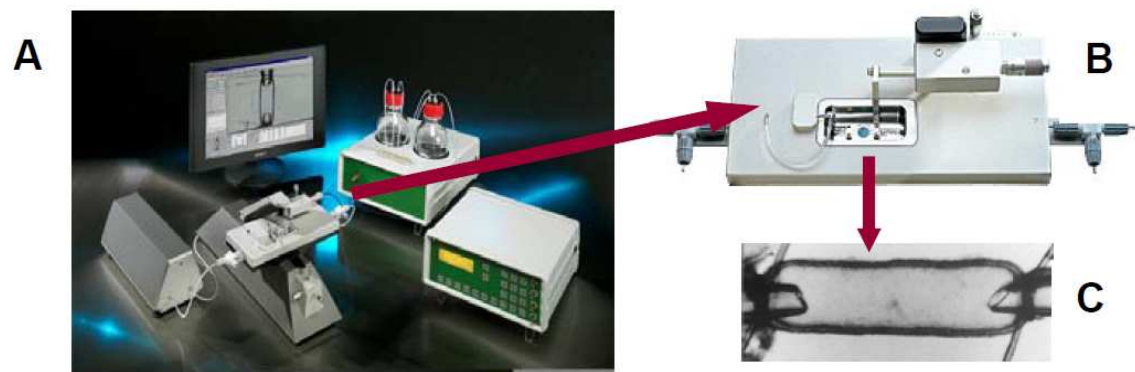


Figura 17. A: componentes del miógrafo de presión y B: del baño de órganos. C: arteria cerebral media presurizada en un baño de órganos.

11.1.2 Estudios estructurales, mecánicos y de tono miogénico

El protocolo experimental utilizado en los experimentos realizados con la ACM de ratas SD *sham* e isquémicas se esquematiza en la Figura 18. Se tomaron medidas del diámetro externo e interno de la arteria a presiones intraluminales crecientes, cada 3 min, primero a 3 mmHg y seguidamente a 10 mmHg para continuar aumentando la presión en pasos de 20 mmHg (de 20 a 120 mmHg), en solución de KH a 37 °C. A continuación, para obtener una relajación máxima, se lavó la preparación con una solución de KH que carecía de Ca^{2+} (KH-0 Ca^{2+}) y se mantuvo durante 30 min a 70 mmHg de presión intraluminal en solución de KH-0 Ca^{2+} . Posteriormente, se realizó una curva a presiones intraluminales crecientes en presencia de Ca^{2+} , en la que se midieron los diámetros externo e interno siguiendo los pasos descritos anteriormente. Finalmente, las arterias se fijaron con PFA durante 45 min a T^a

ambiente y a 70 mmHg de presión intraluminal, y se almacenaron a -70 °C. El análisis de los cambios de diámetro en condiciones activas (KH-2.5 mM Ca²⁺) ofrece datos sobre la capacidad funcional del segmento arterial, y en condiciones pasivas (KH-0 Ca²⁺) permite el estudio de la estructura general y de las características mecánicas pasivas de la arteria, debido a que no se produce contracción de las fibras musculares por ausencia de Ca²⁺. La relación entre las condiciones activas y pasivas determina el tono miogénico intrínseco del vaso.

11.1.2.1 *Parámetros estructurales*

Los parámetros estructurales se han calculado con los datos obtenidos en condiciones pasivas mediante las siguientes ecuaciones:

- **Grosor de la pared:** $(D_{e0Ca} - D_{i0Ca}) / 2$
- **Relación pared/luz:** $(D_{e0Ca} - D_{i0Ca}) / 2D_{i0Ca}$
- **Área de la sección transversal (AST):** $(\pi/4) \times [(D_{e0Ca})^2 - (D_{i0Ca})^2]$

Donde D_{e0Ca} y D_{i0Ca} son el diámetro externo e interno, a cada presión, en una solución de KH-0 Ca²⁺.

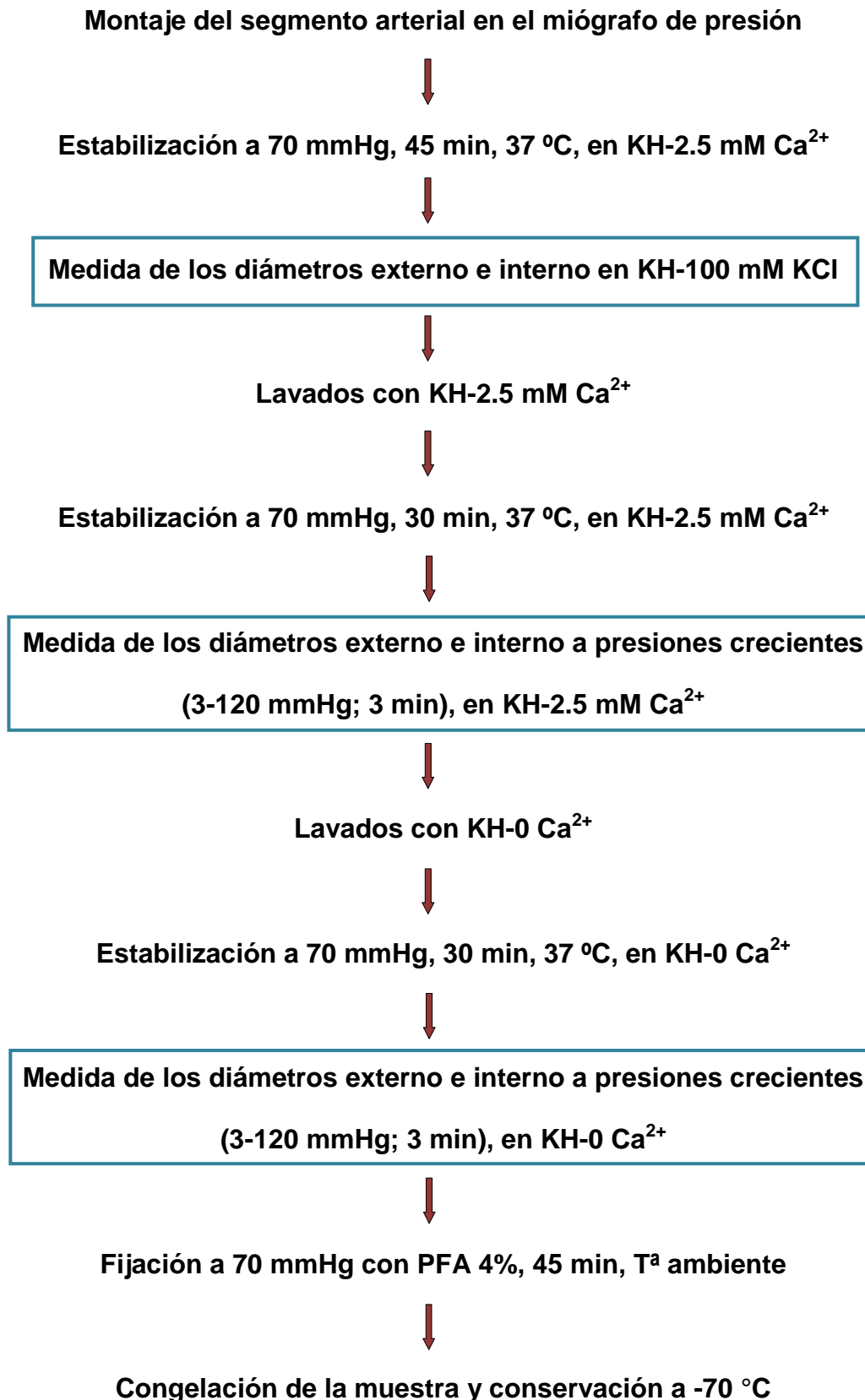


Figura 18. Protocolo experimental utilizado en los experimentos de estructura, mecánica y miogenia realizados con la ACM de ratas SD *sham* e isquémicas.

11.1.2.2 Parámetros mecánicos

Las características mecánicas vasculares están determinadas por los componentes pasivos, principalmente colágeno y elastina. También contribuyen de manera desconocida otros componentes no fibrosos de la MEC como los proteoglicanos, además de las células endoteliales, los fibroblastos y las terminaciones nerviosas de la túnica adventicia (Briones y cols., 2010).

Estos parámetros se han determinado en condiciones pasivas según el método de Baumbach y Heistad (1989).

- **Estrés circunferencial de la pared (σ):** Es la fuerza por unidad de área ejercida por la pared del vaso en sentido opuesto a la fuerza ejercida por la presión arterial (Dobrin, 1978). Se expresa en (N/m², dinas/cm²).

$$\sigma = (P \times D_{i0Ca}) / (2 \times \text{grosor de la pared})$$

Donde P es la presión intraluminal (1 mmHg = 1.334 x 10² N/m²).

- **Tensión (ϵ):** Es el incremento fraccional en el diámetro de un vaso cuando se somete a una presión intraluminal.

$$\epsilon = (D_{i0Ca} - D_{00Ca}) / D_{00Ca}$$

Donde D_{00Ca} es el diámetro a 3 mmHg y D_{i0Ca} es el diámetro interno a las distintas presiones.

- **Relación Estrés-Tensión:** La relación estrés-tensión es el módulo elástico de Young (E).

$$E = \sigma/\epsilon$$

Esta relación proporciona una medida de la rigidez intrínseca del vaso independientemente de su geometría (Dobrin, 1978).

La relación estrés-tensión (σ/ϵ) no es lineal, por lo que es más apropiado calcular el módulo elástico tangencial o incremental (E_{inc}) a través de la pendiente de la curva estrés-tensión ($E_{inc}=d\sigma/d\epsilon$; Dobrin, 1978). Para determinar la rigidez intrínseca de un tejido, el E_{inc} se calcula aproximando los datos de la relación estrés-tensión de cada animal a una curva exponencial usando la ecuación:

$$\sigma_{orig} \exp(\beta\epsilon)$$

Donde σ_{orig} es el estrés en el diámetro inicial (diámetro a 3 mmHg). Realizando la derivada de dicha ecuación se obtiene $E_{inc} = \beta\sigma$. Para un valor determinado de σ , β es directamente proporcional a E_{inc} . Un incremento en β implica un incremento en E_{inc} , que significa un incremento en la rigidez intrínseca.

En arterias, la relación estrés-tensión es una curva exponencial. Esta característica se debe a la distinta participación de la elastina y el colágeno en la mecánica del vaso. La primera parte de la curva representa el comportamiento de la elastina, ya que ésta empieza a estirarse a presiones intraluminales bajas. La elevada distensibilidad de la elastina determina que cambios pequeños de presión (estrés) produzcan grandes cambios de diámetro (tensión). La segunda parte de la curva, con mayor pendiente, refleja el comportamiento de la elastina ya estirada y del colágeno, el cual al ser mucho más rígido, no permite grandes cambios en las dimensiones del vaso, aunque el aumento de presión sea grande (Dobrin, 1978).

11.1.2.3 Parámetros miogénicos

Las propiedades activas de un vaso están determinadas por el grado de activación, la cantidad, el tamaño y la organización de las CML. Para ello se ha determinado el **diámetro normalizado**, relación entre el diámetro en condiciones activas y el diámetro en condiciones pasivas a una determinada presión intraluminal. Este parámetro determina la respuesta miogénica o capacidad del vaso de contraerse ofreciendo resistencia al aumento de diámetro producido por el incremento de presión intraluminal. Se calcula según la siguiente ecuación:

$$100 \times D_{iCa} / D_{i0Ca}$$

Donde D_{iCa} es el diámetro interno a cada presión en una solución de KH-2.5 Mm Ca^{2+} . Donde D_{i0Ca} es el diámetro interno a cada presión en ausencia de calcio (KH-0 Ca^{2+}).

11.2 Determinación de la producción de O_2^-

Para evaluar la producción *in situ* de O_2^- se utilizó la oxidación de la sonda fluorescente hidroetidina (HE) siguiendo la técnica descrita previamente (Dikalov y cols., 2007) La HE es un agente permeable a las membranas celulares que en presencia de O_2^- se oxida generando 2-hidroxitidio (Jacek y cols., 2007), el cual emite fluorescencia en rojo (excitación $\lambda = 561$; emisión $\lambda = 610$ nm; Zielonka y cols., 2008).

Segmentos arteriales, sin fijar y previamente congelados, se cortaron en secciones transversales de 14 μm de grosor con un criostato y se dispusieron en un portaobjetos gelatinado. Después de 30 min de secado a 37 °C, se

incubaron en solución de KH-HEPES (pH 7.4) durante 30 min a 37 °C en una cámara húmeda. A continuación, dichas secciones se incubaron con HE (2 µM), en una cámara húmeda, a 37 °C y protegidas de la luz, durante 30 min en ausencia o en presencia del quelante de $O_2^{\cdot -}$ Mn(III)tetrakis(1-methyl-4-pyridyl)porphyrin (MnTMPyP; 1.4335 mg/ml; Sharma y cols., 2007). Para conservar la fluorescencia de las muestras se utilizó el medio de montaje Fluorep® y se cubrieron con un cubreobjetos de vidrio. La visualización se realizó mediante un microscopio láser confocal (Leica TCS SP2, Heidelberg, Alemania; 63X), usando los mismos parámetros de adquisición de la imagen en todas las condiciones experimentales. La autofluorescencia de la elastina de la LEI se observó por excitación a $\lambda = 488$ nm y emisión a $\lambda = 500-560$ nm. Para cuantificar las imágenes obtenidas se midió la intensidad de la señal fluorescente por área, en mínimo dos anillos de cada animal, mediante el programa de análisis de imagen *Metamorph* (Molecular Devices Corporation, Sunnyvale, CA). Los valores obtenidos se representaron como unidades arbitrarias.

11.3 Inmunofluorescencia

11.3.1 ACM

Las secciones transversales (14 µm), obtenidas mediante un criostato, de ACM congeladas se dispusieron en un portaobjetos gelatinado. Después de 90 min de secado a 37 °C, las uniones inespecíficas se bloquearon en una cámara húmeda (2 h, 37 °C) con albúmina sérica bovina (BSA) al 5% en PBS + TWEEN 20 al 0.3% (PBST-0.3). A continuación, se incubaron en una cámara

húmeda (1 h, a 37 °C) con un anticuerpo primario monoclonal de ratón anti-eNOS (1:100; BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ) o anti-cúmulo de diferenciación 68 (CD68⁺, 1:75; AbD Serotec, Kidlington, Oxford, UK); un anticuerpo primario policlonal de conejo anti-interleuquina(IL)-18 (1:50; Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA), anti-nitrotirosina (1:100; Merck Millipore, Billerica, MA), anti-iNOS (1:50; Thermo Scientific, Rockford, IL), anti-nNOS (1:100; Life Technologies, Alcobendas, Spain) o anti-canales SK_{Ca} (1:100; Alomone labs, Jerusalem, Israel); un anticuerpo primario monoclonal de conejo anti-quinasa fosforilada regulada por señales extracelulares (pERK1/2, 1:100; Cell Signaling Technology, Danvers, MA); o un anticuerpo primario policlonal de cabra anti-molécula de adhesión vascular-1 (VCAM-1) o anti-subunidades gp91^{phox} y p22^{phox} del complejo enzimático NADPH oxidasa (1:50; Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA) diluidos en BSA al 2% en PBST-0.3. Seguidamente, se realizaron tres lavados de 10 min con PBST-0.3 y se incubaron (45 min, 37 °C) en una cámara húmeda protegidos de la luz, con el anticuerpo secundario IgG (1:200), de asno anti-ratón (eNOS, CD68⁺), anti-conejo (IL-18, nitrotirosina, iNOS, nNOS, pERK1/2) o anti-cabra (VCAM-1, gp91^{phox}, p22^{phox}) conjugado con Cianina[®] 3 (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., West Grove, PA, EUA) o Alexa Fluor 643 (Life technologies, Alcobendas, España), diluidos en BSA al 2% en PBST-0.3. Después de repetir los lavados, las muestras se incubaron (15 min, T^a ambiente) con el colorante nuclear 2'-(4-etoxifenil)-5-(4-metil-1-piperacínil)-2,5'-bi-1H-benzimidazol (Hoechst 33342; 1:10) y a continuación se realizaron 3 lavados de 10 min con PBS. Finalmente, las muestras se cubrieron con un cubreobjetos de vidrio utilizando Fluoprep[®].

Las señales inmunofluorescentes se visualizaron con un microscopio láser confocal (Leica TCS SP2; 63X). El anticuerpo conjugado con Cianina[®] 3 se observó por excitación a $\lambda = 561$ nm y emisión a $\lambda = 600-700$ nm, y el conjugado con Alexa fluor 633 por excitación a $\lambda = 632$ nm y emisión a $\lambda = 650-750$ nm. La fluorescencia del Hoechst 33342 se visualizó por excitación $\lambda = 351-364$ nm, emisión $\lambda = 400-500$ nm. La autofluorescencia de la elastina de la LEI se observó por excitación a $\lambda = 488$ nm y emisión a $\lambda = 500-560$ nm. La especificidad de la señal se evaluó por omisión del anticuerpo primario. En estas condiciones, no se observó tinción de la pared vascular.

La cuantificación de las células CD68⁺ se llevó a cabo de manera sistemática y se calculó el promedio del recuento por anillo para cada animal. El análisis cuantitativo de la fluorescencia se realizó mediante el programa de análisis de imagen *Metamorph*. En ACM se midió la intensidad de la señal fluorescente por área en al menos dos anillos de cada animal, para cada condición experimental.

11.3.2 Cerebro

Las secciones coronales (50 μm) de cerebro se colocaron en un eppendorf con PBS. El bloqueo se realizó en agitación (1 h 30 min, T^a ambiente) con BSA al 5% en PBST-0.3. A continuación, se incubaron en agitación (3h, a T^a ambiente) con un anticuerpo primario policlonal de conejo anti-nitrotirosina (1:200; Merck Millipore, Billerica, MA, EUA) diluido en BSA al 2% en PBST-0.3. Seguidamente, se realizaron tres lavados de 10 min con PBST-0.3 y se incubaron (1h, T^a ambiente) en agitación y protegidos de la luz, con el

anticuerpo secundario IgG (1:1000) de asno anti-conejo conjugado con Cianina[®] 3 (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., West Grove, PA, EUA) diluido en BSA al 2% en PBST-0.3. Después de repetir los lavados, las muestras se incubaron (10 min, T^a ambiente) en agitación con el colorante Hoescht 33342 (1:1000), y seguidamente se realizaron 3 lavados de 10 min con PBS. Finalmente, las secciones se colocaron en un portaobjetos y se cubrieron con un cubreobjetos de vidrio utilizando el medio de montaje Fluoprep[®].

Las señales inmunofluorescentes se visualizaron siguiendo la misma metodología utilizada en las secciones de ACM. Se escogió del hemisferio ipsilateral un área subcortical similar para todos los animales que coincidiera con el área infartada en los grupos isquémicos y, a continuación, se midió la intensidad de la señal fluorescente de la imagen completa (750 x 750 μm) para cada condición experimental mediante el programa de análisis de imagen *Metamorph*. Los valores obtenidos se representaron como unidades arbitrarias.

11.4 Estudio del contenido de actina endotelial

La ACM se montó en el miógrafo de presión para vasos de pequeño calibre, tal y como se ha descrito anteriormente (*ver apartado 11.1.2*). Se fijó con PFA (45 min, a T^a ambiente) a 70 mmHg de presión intraluminal y se almacenó en PFA a 4 °C. El día de la tinción se realizaron 3 lavados de 10 min con PBST-0.3 y las arterias se bloquearon (2 h, 37 °C) con BSA al 1% en PBST-0.3. A continuación, se tiñeron los filamentos de actina incubando la ACM (45 min, T^a ambiente) con Alexa Fluor[®] 568 Faloidina (1:20; Thermo Fisher Scientific Inc.,

Kalamazoo, MI, EUA) diluida en BSA al 1% en PBST-0.3. Seguidamente se realizaron 3 lavados de 10 min con PBST-0.3 y se incubó (1 h, a T^a ambiente) con el colorante nuclear Hoechst 33342 (1:10). Finalmente se realizaron 3 lavados de 10 min con PBST-0.3 y cada arteria se dispuso en un portaobjetos, con espaciador de silicona para evitar la deformación del vaso, y se cubrió con un cubreobjetos de vidrio utilizando el medio de montaje Fluoprep[®].

Las señales inmunofluorescentes se visualizaron con un microscopio láser confocal (Leica TCS SP5; 63X). La tinción de los filamentos de actina se observó por excitación a $\lambda = 561$ nm y emisión a $\lambda = 600-700$ nm. La fluorescencia del Hoechst 33342 se visualizó por excitación $\lambda = 351-364$ nm, emisión $\lambda = 400-500$ nm. Se capturaron imágenes seriadas en el eje z (*stack*), con una distancia entre planos de 0.4 μm . Dichos *stacks* se tomaron en dos o más regiones diferentes de la arteria que, al menos, contuvieran 2 núcleos endoteliales, y que abarcaban desde el inicio de la primera célula endotelial hasta el lumen. Cada imagen se realizó bajo las mismas condiciones de zoom (4.5X), intensidad del láser, brillo y contraste.

El análisis de los *stacks* se realizó mediante el programa de análisis de imagen Imaris 8.1 (Bitplane, Oxford Instruments, Abingdon, RU). Para ello, se definieron dos regiones de interés (ROI) cuboides por *stack*, de manera que cada una de ellas incluyera el núcleo y la región citoplasmática de una célula endotelial, y se midió la intensidad de la fluorescencia y el volumen de los filamentos de actina sobre una máscara de la reconstrucción tridimensional obtenida para cada ROI, en el eje z (*stacks* de 8 μm de grosor).

11.5 Estudio de la estructura general y de la distribución celular tridimensional

Aprovechando no sólo la capacidad de captar la fluorescencia sino también la confocalidad que proporciona la microscopia confocal, se analizó la estructura general y de la distribución celular de la pared de la ACM con un microscopio confocal (Leica TCS SP2) con láser de argón y de helio-neón, acoplado a un microscopio invertido (Leica DMIRE2). Este microscopio confocal es un microscopio espectral que permite seleccionar la longitud de onda de emisión. Además, el microscopio confocal tiene la ventaja de proporcionar secciones de la arteria sin necesidad de realizar cortes histológicos. De cada sección óptica se captura una imagen de gran nitidez, puesto que cada sección recoge la luz emitida sólo por el plano enfocado, sin interferencia de la luz procedente de planos adyacentes (Figura 19).

Las ACM, presurizadas y fijadas, se montaron intactas en un portaobjetos con Fluoprep[®] y se visualizaron utilizando un objetivo de 63X. El conjunto de imágenes capturado en el eje z se procesó con el programa de análisis de imagen *Metamorph*, que permite obtener una proyección bidimensional del tejido objeto de estudio. Esta proyección, rotada en el espacio, permite la visualización tridimensional de la arteria. Asimismo, el programa permite cuantificar la intensidad de fluorescencia.

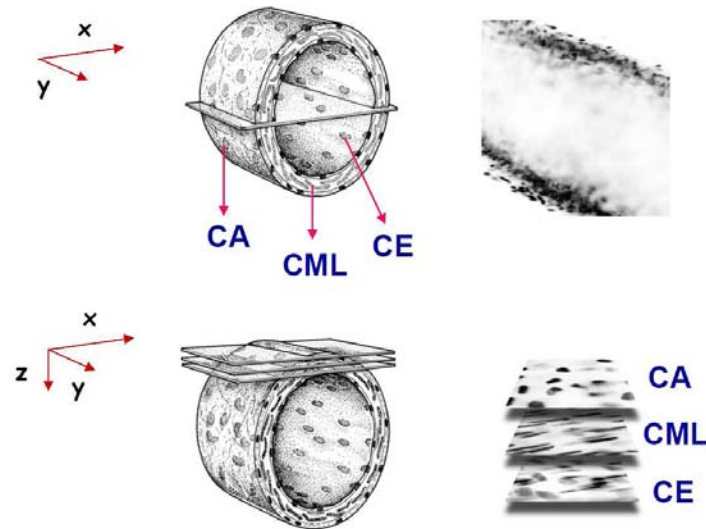


Figura 19. Esquema de la obtención de secciones ópticas con un microscopio confocal de fluorescencia de una arteria teñida con un colorante nuclear (adaptado de Arribas y cols., 1997b). CA: células adventicias; CML: células musculares lisas; CE: células endoteliales.

Las distintas capas de los vasos teñidos con colorantes nucleares pueden ser claramente distinguidas por microscopía confocal, teniendo en cuenta la forma y la orientación de los núcleos celulares (McGrath y cols., 1995). Dichos colorantes poseen la ventaja de mostrar las células como objetos individuales, lo que permite obtener información del número de células en cada capa y de la morfología de los núcleos celulares.

Para este estudio se utilizaron arterias montadas en condiciones pasivas y fijadas con PFA a una presión intraluminal de 70 mmHg. Los segmentos se incubaron (30 min, T^a ambiente), protegidos de la luz, con Hoechst 33342 (10 µg/ml) y se prepararon para su visualización mediante microscopía confocal (Arribas y cols., 1999; Briones y cols., 2006; Caracuel y cols., 2012).

Se capturaron imágenes seriadas en el eje z de las distintas capas de la pared vascular (adventicia, media e íntima) con un objetivo de 63X y zoom 1X, con una distancia entre planos de 0.5 μm .

Para la medida del grosor de las distintas capas se tomó como primera imagen de cada una de las capas, aquella en la que aparece el primer núcleo de una célula en su máxima intensidad de fluorescencia. De manera similar, se determinó la imagen en la que aparecía la última célula de cada capa (Arribas y cols., 1997).

De cada conjunto de imágenes, se analizaron los siguientes parámetros:

- **Grosor de la capa adventicia y media (μm)**
- **Grosor total de la pared (μm):** suma del grosor de la capa adventicia y media.
- **Número de células de cada capa por mm de longitud de la ACM:** se determinó contando el número de núcleos que aparecen en las imágenes seriadas correspondientes a cada capa y calculado por mm de longitud.

11.6 Análisis de los niveles de ARNm

Se cuantificó el ARNm de gp91^{phox}, p22^{phox}, VCAM-1, IL-18, IL-18BP, IL-1 β y SK_{Ca}, previamente retrotranscrito a ADN complementario (ADNc), mediante la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-qPCR), siguiendo el protocolo descrito por Novensa y cols. (2010) y Caracuel y cols. (2012). Para ello se utilizaron segmentos de ACM de ratas *sham* e isquémicas, congeladas en nitrógeno líquido y mantenidas a -70°C. Para llevar a cabo la

extracción del ARN total (ARNt), las arterias congeladas se pulverizaron con un mortero y se homogeneizaron en trizol (TRI Reagent), tampón específico para el aislamiento de ARNm, y cloroformo. La mezcla se agitó manualmente durante unos 15 segundos, seguidos de 10 min de reposo a T^a ambiente y posteriormente se centrifugó (12000 g, 15 min, 4 °C) para favorecer la separación de fases: i) fase acuosa, donde se localiza el ARN, ii) interfase, iii) fase orgánica, donde están el ADN genómico y las proteínas. A continuación, se recogió la fase acuosa a la que se añadió isopropanol, dejándola reposar 10 min a T^a ambiente para que el ARNt precipitara. Nuevamente, se centrifugaron las muestras (12000 g, 10 min, 4 °C) para favorecer la formación de un precipitado, y se eliminó el sobrenadante por vertido. El precipitado obtenido se lavó con etanol al 75%. Finalmente, se resuspendió con agua bidestilada-0.1% dietilpircarbonato y se congeló a -70 °C hasta su posterior análisis. La calidad del ARNt obtenido fue analizada mediante electroforesis desnaturizante en gel de agarosa al 1%, y su concentración y pureza se determinó midiendo la absorbancia en el ultravioleta, a $\lambda = 260$ nm y a $\lambda = 280$ nm, con un espectrofotómetro. La concentración se obtuvo multiplicando la absorbancia obtenida a $\lambda = 260$ nm por la constante de análisis, que en el caso del ARN es 40, y la pureza se calculó a través de la relación de absorbancia $\lambda = 260/280$ nm, incluyendo en los experimentos sólo las muestras que presentaron valores entre 1.8 y 2.0. A continuación, 1 μ g del ARNt fue retrotranscrito a ADNc usando un kit comercial (High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit, Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). El protocolo se llevó a cabo de acuerdo a las instrucciones comerciales en 25 μ l de volumen de reacción, que incluyen el ARNt, el tampón de retrotranscripción, una mezcla de

desoxinucleótidos trifosfato (dNTPs), sondas aleatorias, un inhibidor de la ribonucleasa (RNasa), la retrotranscriptasa (MultiScribe™ *Reverse Transcriptase*) y H₂O bidestilada-0.1% dietilpirocarbonato. La reacción de retrotranscripción tuvo lugar en un termociclador (*Peltier Thermal Cycler* PTC-200, Bio-Rad, Hercules, CA, EUA) durante 10 min a 25 °C y durante 2 h a 37 °C. Finalmente, la enzima fue desactivada por calentamiento a 85 °C durante 5 min. Los ADNc obtenidos se mantuvieron a -70 °C. Para la amplificación se añadieron 250 ng del ADNc a un tampón específico para qPCR con SYBR Green (SYBR® Green PCR Master Mix, Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), un fluorocromo que se une inespecíficamente y de forma dependiente del número de copias a todo ácido nucleico de doble cadena. Además, esta mezcla contiene un tampón adecuado para la reacción, una ADN polimerasa termoestable (Taq) y dNTPs. Para amplificar los genes de gp91^{phox}, p22^{phox}, VCAM-1, IL-18, IL-18bp e IL-1β se utilizaron pares de sondas específicas (a una concentración final de 1 μM), mostrados en la Tabla 2. El ARNm que codifica la subunidad ribosomal 18S (Hs99999901 s1) se utilizó como control interno de cada muestra. Las reacciones se ajustaron a un volumen de 25 μl. De esta manera, el ADNc se amplificó y se cuantificó mediante TaqMan® RTPCR a tiempo real, usando el sistema de detección secuencial GeneAmp 7500 PCR system (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), siguiendo las condiciones del fabricante: un primer paso de activación de la polimerasa a 95 °C durante 10 min y 40 ciclos compuestos de dos pasos, desnaturalización (95 °C, 15 s) y alineamiento/extensión (60 °C, 1 min). Al finalizar el proceso se obtuvieron los valores de Ct (*cycle threshold*; número de ciclo en el cual la fluorescencia sobrepasa el umbral determinado automáticamente por el

sistema) para cada gen. Los valores de Ct de cada gen se refirieron al Ct del control 18S ($\Delta\Delta Ct$) y fueron convertidos a la forma lineal usando $2^{-\Delta\Delta Ct}$ como un valor directamente proporcional del número de copias de ADNc y de la cantidad inicial de ARNm.

Genes de roedores	Forward (5'-3')	Reverse (3'-5')
gp91 ^{phox} (NM_172203.1)	CCTTCCATAAGCTGGTGGCAT	GCCATGGATCCCTAAGCAGAT
p22 ^{phox} (NM_007806.3)	GGCCATTGCCAGTGTGATCTA	TGCTTGATGGTGCCTCCAA
VCAM-1 (NM_011693.3)	GTCCGTTCTGACCATGGAGC	CCAGGGGGCCACTGAATTG
IL-18 (NM_008360.1)	CTTCACTGTACAACCGCAGTAAT	GAGAGGGTCCACAGCCAGTC
IL-18bp (NM_010531.1)	CCCAGCTCTGGGATGGATTG	GGTCAAGGTCATGCTGTGGT
IL-1 β (NM_008361.3)	GTGCAAGTGTCTGAAGCAGC	TCCACAGCCACAATGAGTGAT
SK _{Ca} (NM_019315.2)	ATCACCTGACAACAGCCCAG	GAGGACGCTAACGGCAAATG

Tabla 2. Secuencia de las sondas utilizadas para el análisis de los niveles de ARNm por RT-PCR cuantitativa.

11.7 Estudios de reactividad vascular

La reactividad vascular se estudió utilizando el método descrito por Mulvany y Halpern (1976). Para ello, segmentos de ACM (2 mm) se transfieren a un miógrafo isométrico para vasos de pequeño calibre (Modelo 410 A; Danish Myo Technology, Aarhus, Dinamarca), en el cual dos alambres de tungsteno de 25 μm de diámetro bañados en oro (Goodfellow, Cambridge Limited) se introducen por la luz arterial. Uno de estos alambres se conecta al transductor de fuerza que se encuentra acoplado al miógrafo y que registra los cambios de tensión. El miógrafo, a su vez, está conectado a un sistema de adquisición de datos (LabChart[®]7, Power Lab, ADInstruments) conectado a un ordenador. El otro alambre va unido a un tornillo micrométrico que permite el estiramiento de las arterias (Figura 20).

Tras un periodo de estabilización de 30 min en KH a 37 ± 0.5 °C y pH 7.4 las arterias se estiraron gradualmente (0.5 mN cada min) hasta conseguir una tensión basal óptima de 1.5 mN, obtenida en experimentos previos a partir de concentraciones crecientes de KCl. Seguidamente, las arterias se estabilizaron durante 1 h, realizando un lavado cada 15 min y reajustando la tensión basal en caso necesario. A continuación, el tejido se contrajo 3 veces con KCl (100 mM) lavando con KH tras cada contracción para recuperar el tono basal, y dejando entre contracciones 5 min de estabilización. Posteriormente, las arterias se estabilizaron durante 30 min antes de proceder a la realización de los diferentes protocolos experimentales.

Para investigar la influencia de la I/R sobre las respuestas contráctiles mediadas por la estimulación de los receptores TP, se realizaron curvas concentración-respuesta a U46619 (30 nM- 1 μ M). Para el estudio de la actividad vasodilatadora, las arterias se estimularon con U46619 (30-100 nM) o con el péptido vasoconstrictor endotelina-1 (10 nM) para obtener una contracción del 60-80% del tono inducido por KCl (100 mM) y estudiar, así, el efecto de los agonistas vasodilatadores. La relajación dependiente de endotelio se estimuló con SLIGRL (20 μ M), agonista de los receptores PAR2, bradiquinina (1 nM- 30 μ M), agonista de los receptores B1 y B2, o CyPPA (100 μ M), potente activador selectivo de los canales SK_{Ca}. Se utilizó una única concentración de SLIGRL y de CyPPA para evitar la posible desensibilización de los receptores PAR2 (Hwa y cols., 1996; Bucci y cols., 2005) y de los canales SK_{Ca}.

Para estudiar la influencia de diversos antagonistas e inhibidores enzimáticos sobre las respuestas vasodilatadoras de la ACM, éstos se incubaron durante los 30 min previos a la contracción con el agente contráctil. Los compuestos estudiados a las concentraciones previamente descritas (McNeish y Garland, 2007; McNeish y cols., 2012; Gauthier y cols., 2014) fueron: N ω -nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME; 300 μ M), inhibidor no selectivo de la NOS e indometacina, inhibidor no selectivo de la COX (10 μ M), que permitieron aislar la respuesta de EDH; TRAM-34 (1 μ M), inhibidor de los canales BK_{Ca}, apamina (100 nM), inhibidora de los SK_{Ca} y caribdotoxina (100 nM), inhibidora de los IK_{Ca} y BK_{Ca}, que permitieron estudiar la contribución en la relajación mediada por EDHF de cada uno de los K_{Ca}. Se necesitaron experimentos preliminares para obtener la concentración adecuada de

epicatequina (1 μM), inhibidor de la oxidación/nitrosilación, jasplaquinolida (100 μM), estabilizador del citoesqueleto, y de latrunculina B (10 nM-1 μM) y citocalasina D (50 nM), inhibidores de la polimerización de actina; todos ellos permitieron analizar la repercusión del estado del citoesqueleto en las respuestas de EDH. También se estudió el efecto del ONOO^- (5 μM), potente agente oxidante y nitrante, a concentraciones previamente descritas (Liu y cols., 2002), para afectar la actividad de los canales K_{Ca} . El ONOO^- descompuesto (5 μM) se obtuvo manteniendo el ONOO^- a 37 $^{\circ}\text{C}$ toda la noche. La actividad oxidante del ONOO^- original y del descompuesto se confirmó mediante espectrofotometría siguiendo el método descrito por Balavoine y Geletii (1999).

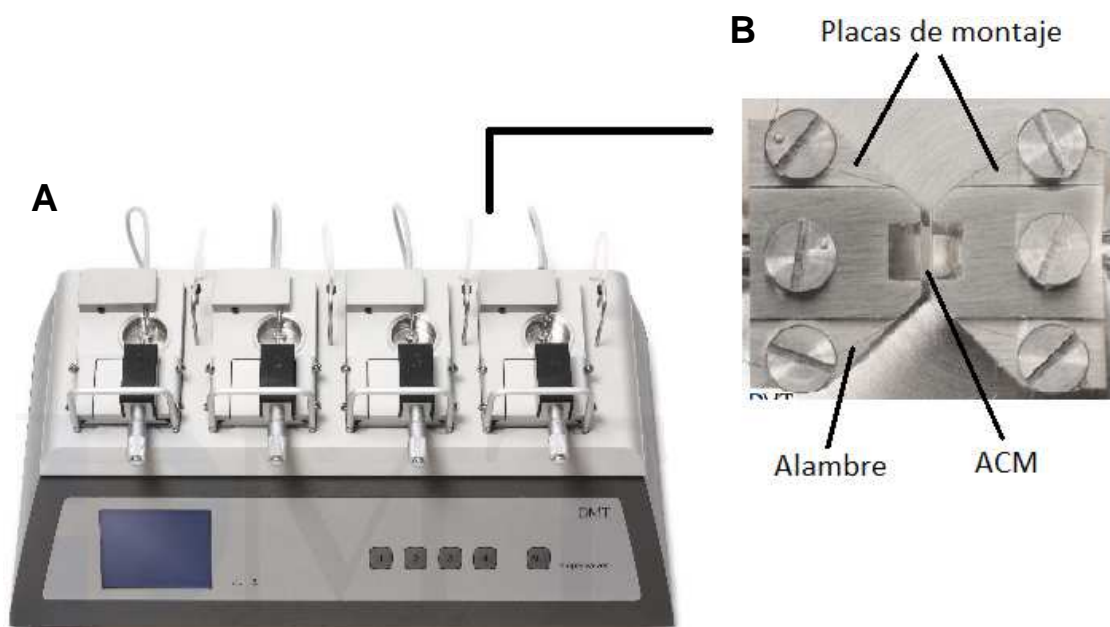


Figura 20. A: miógrafo isométrico para vasos de pequeño calibre (Danish Myo Technology, Dinamarca); B: placa de montaje.

12. MEDIDAS EN CÉLULAS HMVEC

12.1 Modelo de hipoxia/reoxigenación

La línea de células endoteliales obtenidas de microvasos humanos (HMVEC; Thermo Fisher Scientific Inc., Kalamazoo, MI, EUA) se mantuvo en medio de cultivo Eagle modificado por Dulbecco con mezcla de nutrientes F-12 (DMEM/F12) sin rojo fenol, suplementado con 10% (v/v) de suero bovino fetal (SBF) y suplemento de crecimiento microvascular (Thermo Fisher Scientific Inc., Kalamazoo, MI, EUA), a 37 °C en ambiente humidificado con 95% de aire y 5% de CO₂. Las células se sembraron en placas de cultivo recubiertas de gelatina (1%) y se estudiaron antes de llegar a la confluencia, entre los pases 5 y 7. Para inducir hipoxia/reoxigenación (H/R) el medio de cultivo se cambió por un medio bajo en SBF (1%) e inactivado con carbón, dificultando así la interacción de las proteínas plasmáticas con los fármacos utilizados, y las células se colocaron dentro de una cámara sellada. Las condiciones de hipoxia se crearon mediante la inyección en la cámara de N₂ al 94%, CO₂ al 5% y O₂ al 1%, manteniendo las células en dichas condiciones durante toda la noche. Tras el periodo de hipoxia, las células se lavaron con PBS fresco suplementado con DMEM-F12 + SBF al 10% y se reoxigenaron durante 24 h en el incubador con atmósfera humidificada para simular las condiciones de reperfusión (Koo y cols., 2001). En la condición control, las HMVEC se mantuvieron toda la noche en el incubador de atmósfera humidificada con medio bajo en SBF (1%) e inactivado con carbón. Finalmente, las HMVEC se incubaron con U46619 (100 nM) durante 15 min y, en determinados experimentos, el grupo control también con ONOO⁻ (500 nM) durante 2 h. Se utilizó una concentración de ONOO⁻

menor que en ACM (5 μ M) debido a que concentraciones más elevadas inducían la muerte de las HMVEC.

12.2 *Western blot*

La expresión proteica de los canales SK_{Ca}, nitrotirosina y HIF-1 α se estudió mediante la técnica analítica *Western blot*, que permite detectar proteínas específicas en una muestra determinada. Para ello, previamente las HMVEC se suspendieron en un tubo con la solución de lisis RIPA junto a una mezcla comercial que contenía inhibidores de proteasas (Complete[®], Roche Diagnostics, Alemania) y de fosfatasa (PhosSTOP[®], Roche Diagnostics, Alemania). Los homogeneizados celulares obtenidos del lisado se *sonicaron* durante 3 ciclos de 5 segundos y, a continuación, se centrifugaron a 16000 g durante 20 min a 4 °C. El sobrenadante obtenido, que contenía las proteínas solubles totales, se dividió en alícuotas y se almacenó a -80 °C. La cuantificación de las proteínas se determinó por el método del ácido bicinchonínico (Thermo Fisher Scientific Inc., Kalamazoo, MI, EUA), utilizando BSA para establecer la curva estándar.

A continuación, la misma cantidad de proteína (25 μ g) por muestra celular se incubó con el tampón de carga. La separación de las proteínas se realizó por electroforesis húmeda utilizando geles de poliacrilamida-SDS al 4-12% (Thermo Fisher Scientific Inc., Kalamazoo, MI, EUA) y tampón de electroforesis a un voltaje constante de 100 V durante 90 min (XCell Surelock[®]; Thermo Fisher Scientific Inc., Kalamazoo, MI, EUA). Transcurrido ese tiempo, los geles se transfirieron en seco a una membrana de nitrocelulosa durante 10 min a

4 °C, a un amperaje constante de 375 mA (iBLOT[®] *Dry Blotting System*; Thermo Fisher Scientific Inc., Kalamazoo, MI, EUA). Las membranas se bloquearon (1 h, T^a ambiente), para evitar las uniones inespecíficas, con leche desnatada en polvo al 3% en PBS + TWEEN 20 al 0.1% (PBST-0.1), en suave agitación. A continuación, se incubaron toda la noche en rotación a 4 °C, con los anticuerpos primarios policlonales de conejo (1:500): anti-canales SK_{Ca} (Alomone labs, Jerusalem, Israel), anti-nitrotirosina (Millipore, Billerica, MA, EUA), y anti-HIF-1 α (Millipore, Billerica, MA, EUA), diluidos en PBST-0.1 que contenía 2% de leche desnatada en polvo. Posteriormente se realizaron 3 lavados con PBST-0.1 y las membranas se incubaron (1 h, T^a ambiente) con el anticuerpo secundario anti-conejo conjugado con peroxidasa (1:2500; Thermo Fisher Scientific Inc., Kalamazoo, MI, EUA), diluido en PBST-0.1 con un 1% de leche desnatada en polvo. Se repitieron los lavados y finalmente las bandas fueron detectadas por incubación con el reactivo quimioluminiscente (SuperSignal west pico; Thermo Fisher Scientific Inc., Kalamazoo, MI, EUA). La señal quimioluminiscente se visualizó mediante el sistema de imagen LAS4000 (Fujifilm, Barcelona, España). Los análisis densitométricos de transferencias de *Western* se realizaron utilizando el programa de análisis de imagen *ImageJ*. Todas las membranas se reutilizaron usando un anticuerpo monoclonal anti-GAPDH (1:2500; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EUA.) como control de carga. Los datos se normalizaron a partir de los valores de densitometría de GAPDH.

12.3 Cuantificación del *ratio* F-/G-actina

Para determinar el *ratio* F-/G-actina en células endoteliales humanas, las HMVEC cultivadas en placas de 60 mm se lavaron con PBS frío (4 °C) antes de proceder a la lisis con el tampón de estabilización de la actina (Cytoskeleton, Denver, CO, EUA) durante 10 min en hielo. A continuación, se desengancharon mediante raspado y todo el extracto se mantuvo a 37 °C durante 10 min. Las muestras se ultra-centrifugaron a 100000 g durante 1 h, a 37 °C. El sobrenadante, que contenía la G-actina, se recuperó, y el *pellet*, que contenía la F-actina, se solubilizó con tampón de despolimerización de actina (Cytoskeleton, Denver, CO, EUA). Las alícuotas de las fracciones de sobrenadante y de *pellet* se separaron en geles de poliacrilamida-SDS al 4-12% y se realizó la transferencia *Western* (ver apartado 12.2) con el anticuerpo primario monoclonal de conejo anti-actina (1:500; Cytoskeleton, Denver, CO, EUA).

12.4 *Pull-down* de RhoA activa

La RhoA, miembro de la subfamilia Rho de las GTPasas pequeñas, cuando está unida guanosín trifosfato (GTP) es capaz de activar a la Rho quinasa. Los niveles de RhoA activa (Rho-GTP) se determinaron con la técnica de inmunoprecipitación por *pull-down* (Figura 21). Para ello, las HMVEC cultivadas en placas de 60 mm se fijaron con tampón de ligación (fosfato de sodio 0.01 M, NaCl 0.15 M; *suberato de disuccinimidilo* 20 mg/ml; pH 7.2). A continuación se lavaron dos veces en PBS y se incubaron durante 10 min en tampón de lisis Mg²⁺ (MLB; HEPES 25 mM, pH 7.5, NaCl 150 mM, 1% de Igepal CA-630, MgCl₂ 10 mM, EDTA 1 mM y 2% de glicerol). Los lisados celulares se

obtuvieron por raspado y los núcleos se recogieron por centrifugación (14000 g, 5 min, 4 °C). La misma cantidad de proteína (50 mg) por muestra se incubó durante toda la noche a 4 °C con Rhotekin RBD agarosa (Millipore, Billerica, MA, EUA), reactivo que contiene 65 µg de proteína recombinante con dominio de unión a Rho-GTP (RBD) en 50 µl de suspensión de resina de glutatión-agarosa. Después de 3 lavados con MLB y de la elución de los complejos RBD/Rho-GTP por ebullición en tampón reductor Laemmli, las muestras se separaron en geles de poliacrilamida-SDS al 4-12% y se realizó la transferencia *Western* (ver apartado 12.2) con el anticuerpo primario monoclonal de ratón anti-RhoA (1:1000; Santa Cruz Biotecnologías, Santa Cruz, CA, EUA). Los extractos celulares cultivados sin suero (baja actividad basal de RhoA) se utilizaron como control negativo. Los controles positivos se trataron con GTPγS, análogo no hidrolizable de RhoA activa. La señal específica se normalizó a partir de la RhoA total obtenida mediante *pull-down* de lisados celulares tratados con Rhotekin RBD agarosa.

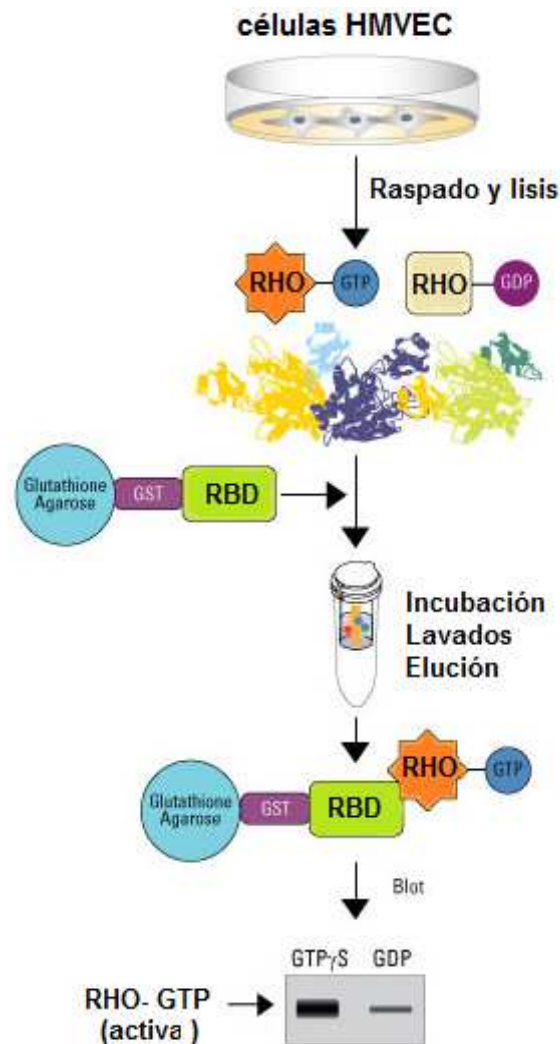


Figura 21. Representación esquemática del *pull-down* de Rho activa (adaptado de <https://www.thermofisher.com/es/es/home/life-science/protein-biology/protein-assays-analysis/overview-active-gtpase-pull-down-detection-kits.html>).

12.5. Inmunofluorescencia

Las células HMVEC cultivadas en cubreobjetos se lavaron con PBS y se fijaron con PFA. Después de la permeabilización con 0.1% de Tritón X-100/ 0.1% de BSA durante 5 min, y del bloqueo de las uniones inespecíficas con suero de caballo al 10% en PBS, las células se incubaron (1 h, T^a ambiente)

con el anticuerpo primario policlonal de conejo anti-nitrotirosina (1:100; Millipore, Billerica, MA, EUA). Después de tres lavados con BSA al 1% en PBST-0.3 las células se incubaron (1 h, T^a ambiente) con Alexa Fluor[®] 568 Faloidina (10 μM; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) para el marcaje de la F-actina, con Alexa Fluor[®] 488 deoxiribonucleasa I (10μM; Thermo Fisher Scientific Inc., Kalamazoo, MI, EUA) para el marcaje de la G-actina, y con el anticuerpo secundario IgG de cabra anti-conejo (1:500) conjugado con Alexa fluor 594, diluidos en BSA al 1% en PBST-0.3. Después de repetir los lavados, los cubreobjetos se montaron en portaobjetos usando el medio de montaje *ProLong Gold Antifade* con colorante nuclear 4',6-diamino-2-fenilindol (DAPI; Thermo Fisher Scientific Inc., Kalamazoo, MI, EUA), y se visualizaron con un microscopio láser confocal (Axiovert de 2000, Carl Zeiss Iberia, SL, España; 63X). Se tomaron imágenes de 15-20 células por cubreobjetos.

13. SOLUCIONES

13.1 Fisiológicas

Todas las soluciones descritas en este apartado se expresan en concentración mM.

Tampón Locke (pH 7.2): NaCl 154, KCl 5.6, CaCl₂ 2.3, MgCl₂ 1.0, NaHCO₃ 3.6, glucosa, 5, Hepes 5.

Solución de KH (2.5 mM Ca₂⁺; pH 7.4): NaCl 112.0, KCl 4.7, CaCl₂ 2.5, KH₂PO₄ 1.1, MgSO₄ 1.2, NaHCO₃ 25.0, Glucosa 11.1.

Solución de KH en ausencia de Ca₂⁺ (0 mM Ca₂⁺; pH 7.4): solución de KH en la que se omite el CaCl₂ y se le añade EGTA 10.0.

Solución de KH 100 mM de KCl (pH 7.4): solución de KH en la que el NaCl fue reemplazado por KCl en proporción equimolar.

Solución KH-HEPES (pH 7.4): NaCl 130.0, KCl 5.6, CaCl₂·2H₂O 2.0, MgCl₂·6H₂O 0.24, HEPES 8.3, glucosa 11.0.

Tampón PBS (0.1 M; pH 7.4): Na₂HPO₄·7H₂O 50.0, NaCl 136.9.

Solución anticongelante (pH 7.4): PBS 0.1M 30%, etilenglicol 40%, glicerol 30%.

13.2 RT-qPCR

Productos para la obtención del ARN: TRI Reagent (trizol), cloroformo, H₂O bidestilada-0.1% dietilpirocarbonato, isopropanol, etanol.

Solución de la reacción de retrotranscripción: tampón de RT, mezcla de dNTPs, sondas aleatorias, inhibidor de RNasa y la retrotranscriptasa MultiScribe™ Reverse Transcriptase (kit comercial High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit, Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA).

Solución para la amplificación: tampón para la reacción, el fluorocromo SYBR Green, dNTPs, la ADN polimerasa termoestable AmpliTaq Gold® (kit comercial SYBR® Green PCR Master Mix, Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) y los pares de sondas específicas para amplificar los genes de interés.

13.3 Paraformaldehído 4% (PFA)

Solución A: paraformaldehído 8%.

Solución B: solución fosfato (100 mM; pH 7.4) $\text{PO}_4\text{H}_2\text{Na}\cdot\text{H}_2\text{O}$ 0.24%,
 $\text{PO}_4\text{HNa}_2\cdot\text{H}_2\text{O}$ 0.97%.

13.4 Determinación de nitritos

Solución C: dihidroclorato N-(1-Naftil)-etilendiamina (NEDA) 0.1% en agua,
sulfanilamida: 2% en HCl 5%.

Cloruro de vanadio (VCl_3): 8 mg/ml en HCl 1M

Nitrito de sodio (NaNO_2): 100 mM

13.5 Western blot

Solución de lisis RIPA: HEPES 50 mM, NaCl 150 mM, glicerol 10%, MgCl_2 1,5 mM, dodecil sulfato de sodio (SDS; 0,1%), EGTA 1 mM, NaF 100 mM, tritón X-100 1%, deoxicolato sódico 1%.

Tampón de carga: SDS 2%, tris-hidroximetil-aminoetano (Tris)-HCl (pH 6.8) 60 mM, β -mercaptoetanol 5%, azul de bromofenol 0,01 %, glicerol 10%.

Tampón de electroforesis: Tris (pH 8.3) 25 mM, glicina 192 mM, SDS 0,1%.

Tampón de transferencia: Tris (pH 8.3) 25 mM, glicina 192 mM, metanol 20%, SDS 0,1%.

14. FÁRMACOS Y REACTIVOS

Ácido 4-(2-hidroxietil)-piperacín-1-etano-sulfónico (HEPES), ácido úrico, albúmina sérica bovina (BSA), bradiquinina, epicatecina, etilén glicol-bis(2-aminoetiléter)-N,N,N', N'-ácido tetraacético (EGTA), cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolio (TTC), indometacina, N-cyclohexyl-N-2-(3,5-dimethyl-pyrazol-1-yl) (CyPPA), N ω -nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME), TRAM-34 y TWEEN 20 se obtubieron de Sigma-Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA); citocalasina D, jasplaquinolida; ONOO⁻, dihidroclorato N-(1-Naftil)-etilendiamina (NEDA), y Mn(III)tetrakis(1-methyl-4-pyridyl)porphyrin (MnTMPyP) de EMD Millipore (Billerica, MA, EUA); 5,10,15,20-Tetrakis (4-sulfonatophenyl) porphyrinato de hierro (III) (FeTPPS) y 9,11-Dideoxi-9 α ,11 α -metano-epoxi prostaglandina F2 α (U46619) de Calbiochem (San Diego, CA, EUA); endotelina-1 de Enzo Life Science Inc., (Farmingdale, NY, EUA); Ser-Leu-Ile-Gly-Arg-Leu-NH₂ (SLIGRL) de Auspep (Tullamarine, Victoria, Australia); apamina y caribdotoxina de Latoxan (Valence, Francia); 2'-(4-etoxifenil)-5-(4-metil-1-piperacínil)-2,5'-bi-1H-benzimidazol (Hoechst 33342) e hidroetidina (HE) de Molecular Probes (Invitrogen, Eugene, OR, EUA); medio de cultivo Eagle modificado por Dulbecco con mezcla de nutrientes F-12 (DMEM/F12) de GIBCO[®] (Gaithersburg, MA, EUA); y *ProLong Gold Antifade* con 4',6-diamino-2-fenilindol (DAPI) de Thermo Fisher Scientific Inc. (Kalamazoo, MI, EUA); Fluoprep[®] de BioMérieux (Marcy l'Etoile, Francia).

Los fármacos utilizados en este estudio se disolvieron en agua bidestilada exceptuando el U46619, el TRAM-34, la citocalasina D, el CyPPA, la jasplaquinolida, y la latrunculina B, que se disolvieron en dimetilsulfóxido; la

indometacina, que se disolvió en NaHCO₃ al 2%; la bradiquinina, que se disolvió en CH₃COOH 0.1M; el MnTMPyP, que se disolvió en KH-HEPES; el nitrito de sodio (NaNO₂, 30 μM) que se disolvió en etanol (1:2 v/v), el ácido úrico, que se disolvió en NaOH 1N y a continuación en tampón LOCKE; y el FeTPPS, que se disolvió en NaCl 0.9%.

Todos los productos químicos empleados fueron de pureza adecuada para el análisis, y suministrados por Merck o Panreac.

15. EXPRESIÓN DE LOS DATOS Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados se expresaron como medias ± e.sm del número (n) de ratas que se indican en los pies de figura. La diferencia entre grupos y el efecto del tratamiento se evaluó mediante el análisis de la varianza (ANOVA) de dos vías seguida del test indicado en el pie de figura. Las respuestas vasodilatadoras se expresaron como el cambio porcentual del tono previo generado con U46619 o con endotelina-1. En el caso de un solo factor, se utilizó la *t* de Student para datos no apareados (dos grupos) o la ANOVA de una vía (más de dos grupos), seguida del test indicado en el pie de figura. El análisis de datos se realizó utilizando el software GraphPad PRISM™ versión 6.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA). Un valor de $P < 0.05$ se consideró significativo.

CAPÍTULO I. Participación del peroxinitrito en los cambios estructurales, mecánicos y miogénicos en arteria cerebral media tras la isquemia cerebral focal: efecto del ácido úrico

1. EFECTO DE LA I/R EN LOS PARÁMETROS FISIOLÓGICOS Y CORPORALES

En la Tabla 3 se muestran los valores de peso corporal, que fueron similares en todos los grupos estudiados, así como la presión arterial media y la T^a corporal, que se mantuvo homogénea durante la cirugía en todas las situaciones experimentales. Asimismo, la caída del FSC fue similar en los distintos grupos experimentales, siendo la incidencia de hiperemia reactiva durante la reperusión de un 56%. No se observaron variaciones en el FSC en los dos grupos de animales hiperémicos a los que posteriormente se les administró VEH o AU (Tabla 4). Ninguna rata murió antes del final del estudio.

2. EFECTO DEL AU SOBRE EL VOLUMEN DE INFARTO CEREBRAL Y EL DAÑO NEUROLÓGICO

La tinción con TTC de las secciones cerebrales de ratas isquémicas no hiperémicas e isquémicas hiperémicas mostró que tras la oclusión (90 min) de la ACM, seguida de un periodo de reperusión de 24 h, se había producido un infarto cerebral focal (Figura 22). Las secciones cerebrales teñidas con TTC confirmaron la ausencia de infarto cerebral en el grupo de ratas *sham*. La Figura 23A muestra cómo el volumen de infarto, en las regiones corticales y subcorticales de los animales que durante la reperusión mostraron hiperemia, fue mayor (volumen cortical: $P < 0.001$; volumen subcortical: $P < 0.05$) que en aquellos que no la desarrollaron. Una única administración de AU a los 135 min del inicio de la oclusión redujo ($P < 0.05$) el volumen de infarto total únicamente en presencia de HR (Figura 23A). Asimismo, la puntuación de las pruebas

neurológicas fue peor ($P < 0.001$) en ratas hiperémicas (Figura 23B) y el tratamiento con AU consiguió reducir ($P < 0.01$) dicho daño neurológico.

		I/NH		I/H	
		VEH	AU	VEH	AU
Peso corporal (g)		277,73 ± 5,51	264,86 ± 3,96	260,39 ± 4,96	260,25 ± 4,46
Presión arterial media (mm Hg)	Antes de la isquemia	93,64 ± 1,31	91,86 ± 1,57	92,67 ± 2,43	92,20 ± 2,92
	Durante la isquemia (60 min)	93,50 ± 1,11	93,00 ± 1,45	92,00 ± 2,25	90,80 ± 2,33
	Justo después de la reperusión	91,83 ± 1,09	90,57 ± 1,36	92,34 ± 2,17	92,00 ± 2,63
Temperatura corporal (°C)	Antes de la isquemia	37,24 ± 0,13	36,85 ± 0,21	37,59 ± 0,13	37,38 ± 0,18
	Durante la isquemia (60 min)	37,46 ± 0,15	37,26 ± 0,14	36,97 ± 0,10	37,21 ± 0,09
	Justo después de la reperusión	37,20 ± 0,12	36,80 ± 0,13	37,31 ± 0,16	36,98 ± 0,10

Tabla 3. Peso corporal y parámetros fisiológicos durante la cirugía. Los resultados están expresados como media ± e.s.m. de animales isquémicos no hiperémicos (I/NH; VEH: $n = 11$; AU: $n = 8$) e isquémicos hiperémicos (I/H; VEH: $n = 13$; AU: $n = 12$).

FSC (% basal)	I/NH		I/H	
	VEH	AU	VEH	AU
Isquemia	46.2 ± 3.7	44.7 ± 3.9	37.1 ± 3.7	46.6 ± 4.7
Reperusión	88.1 ± 6.2	93.1 ± 2.2	138.9 ± 5.5***	130.0 ± 2.8***

Tabla 4. Cambios en el FSC cortical durante la isquemia (90 min) y la reperusión (primeros 15 min). Los resultados están expresados como media ± e.s.m. de animales I/NH (VEH: $n = 11$; AU: $n = 8$) e I/H (VEH: $n = 12$; AU: $n = 12$); *** $P < 0.001$, I/H + VEH vs. I/NH + VEH o I/H + AU vs. I/NH + AU mediante ANOVA de dos vías seguido del test de Bonferroni.

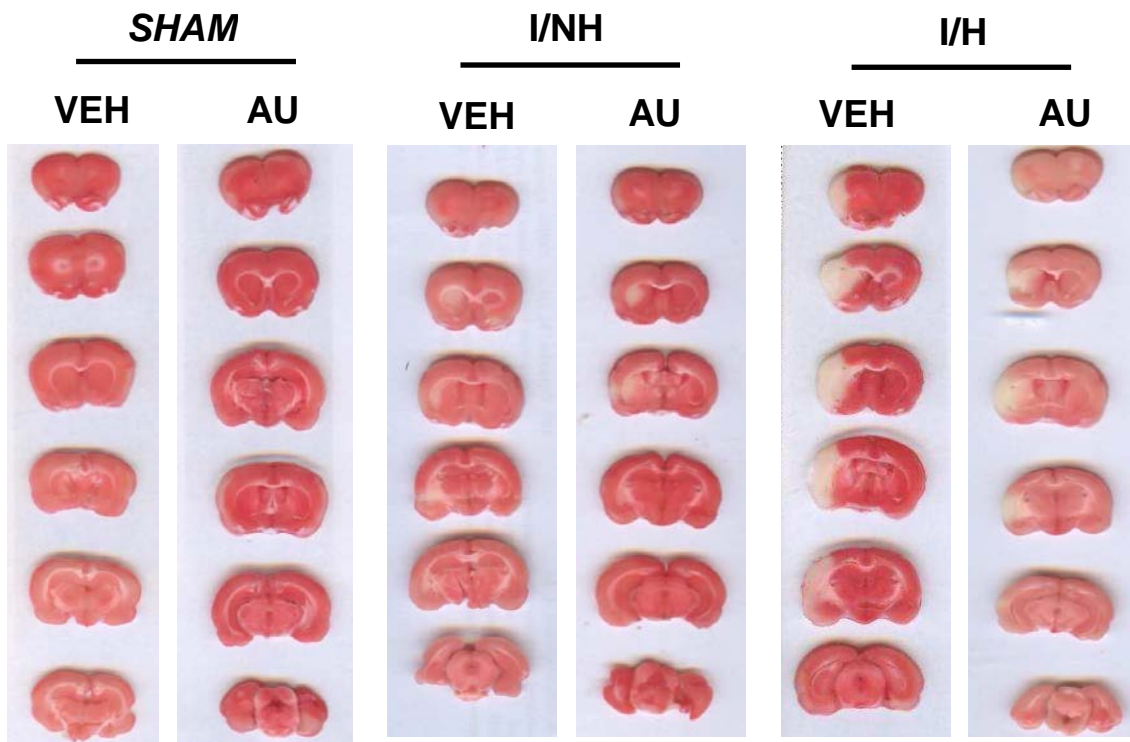


Figura 22. Imágenes representativas del volumen de infarto de ratas *sham*, isquémicas no hiperémicas (I/NH) e isquémicas hiperémicas (I/H), tratadas con ácido úrico (AU) o con vehículo (VEH). El tejido infartado aparece en blanco y el tejido vivo aparece teñido en rojo con 2,3,5-trifeniltetrazolio (TTC).

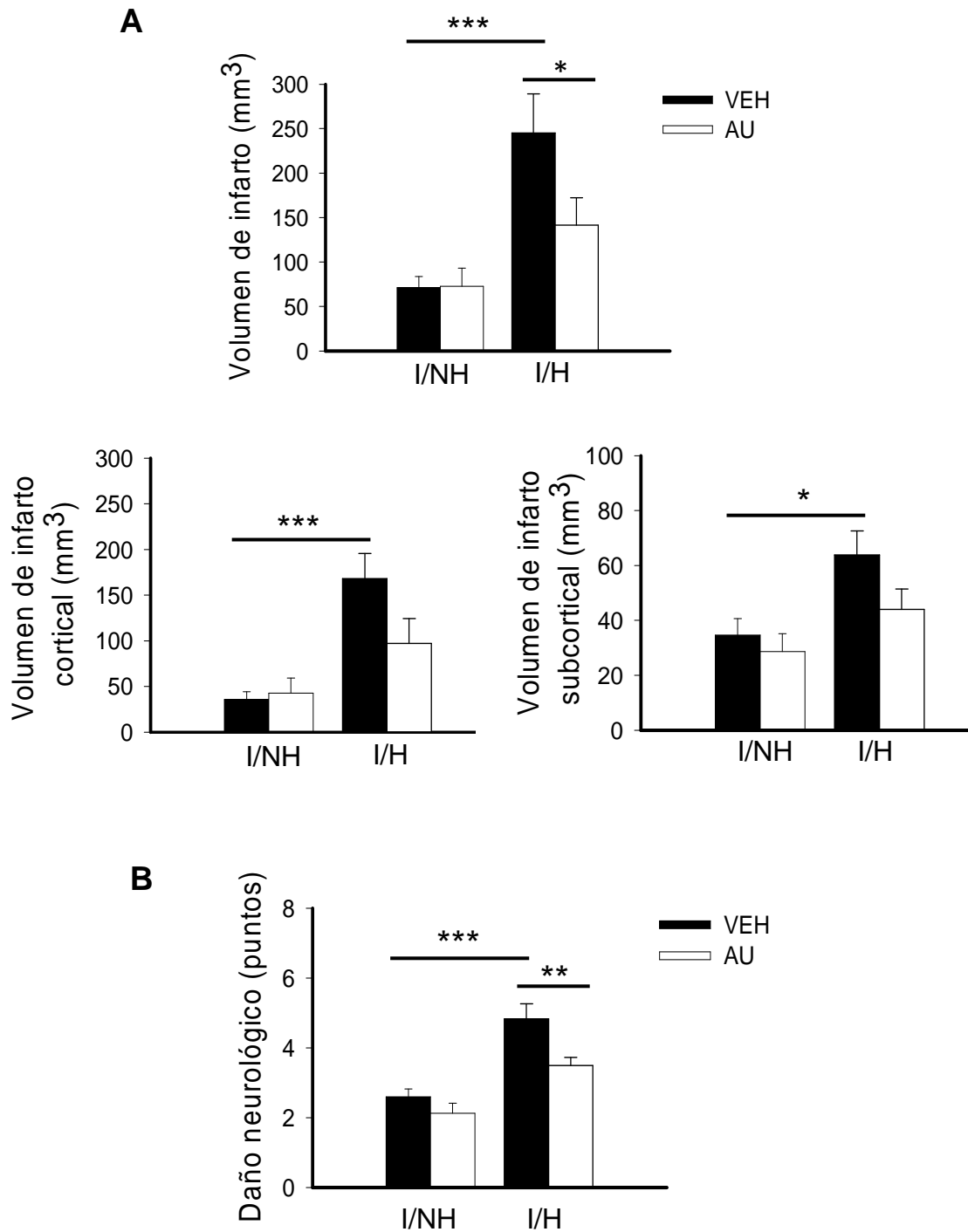


Figura 23. Efecto beneficioso del AU después de la I/R. A: cuantificación del volumen de infarto total, cortical y subcortical. B: efecto del AU sobre el daño neurológico, evaluado mediante un test simple en una escala de 9 puntos. Los resultados están expresados como media \pm e.s.m de animales I/NH (VEH: $n = 11$; AU: $n = 12$) e I/H (VEH: $n = 11$; AU: $n = 12$); * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ mediante ANOVA de dos vías seguido del test de Bonferroni.

3. EFECTO DE LA I/R SOBRE LA PRODUCCIÓN DE ONOO⁻ EN ACM Y CEREBRO

El NO reacciona con el O₂⁻ formando ONOO⁻, que puede producir oxidación y nitrosilación irreversible de proteínas (Pacher y cols., 2007). En las Figuras 24A y 25A se muestran imágenes representativas de inmunofluorescencia a nitrotirosina (medida indirecta de la producción de ONOO⁻) en secciones transversales de ACM ipsilateral (Figura 24A) y coronales de cerebro (Figura 25A) de ratas *sham*, isquémicas hiperémicas e isquémicas no hiperémicas tratadas con vehículo y con AU. La cuantificación de la señal fluorescente se muestra en las Figuras 24B y 25B. En los vasos sanguíneos de ratas hiperémicas se observó un aumento de la fluorescencia ($P < 0.05$) en comparación con la obtenida en animales *sham*, siendo la señal fluorescente particularmente elevada en la capa adventicia. De manera similar, únicamente las ratas hiperémicas mostraron un incremento ($P < 0.01$) de la señal inmunofluorescente a nitrotirosina en el tejido cerebral. Tras el tratamiento con AU, y en presencia de hiperemia, se redujo ($P < 0.05$) la fluorescencia a la nitrotirosina tanto en las arterias como en el cerebro.

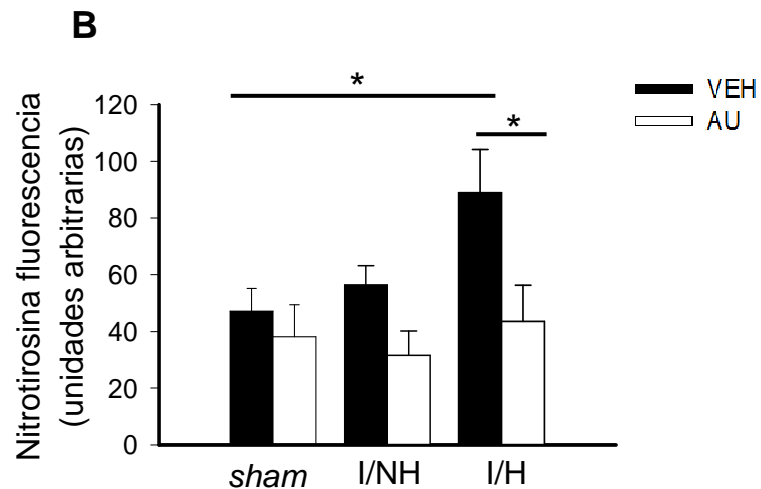
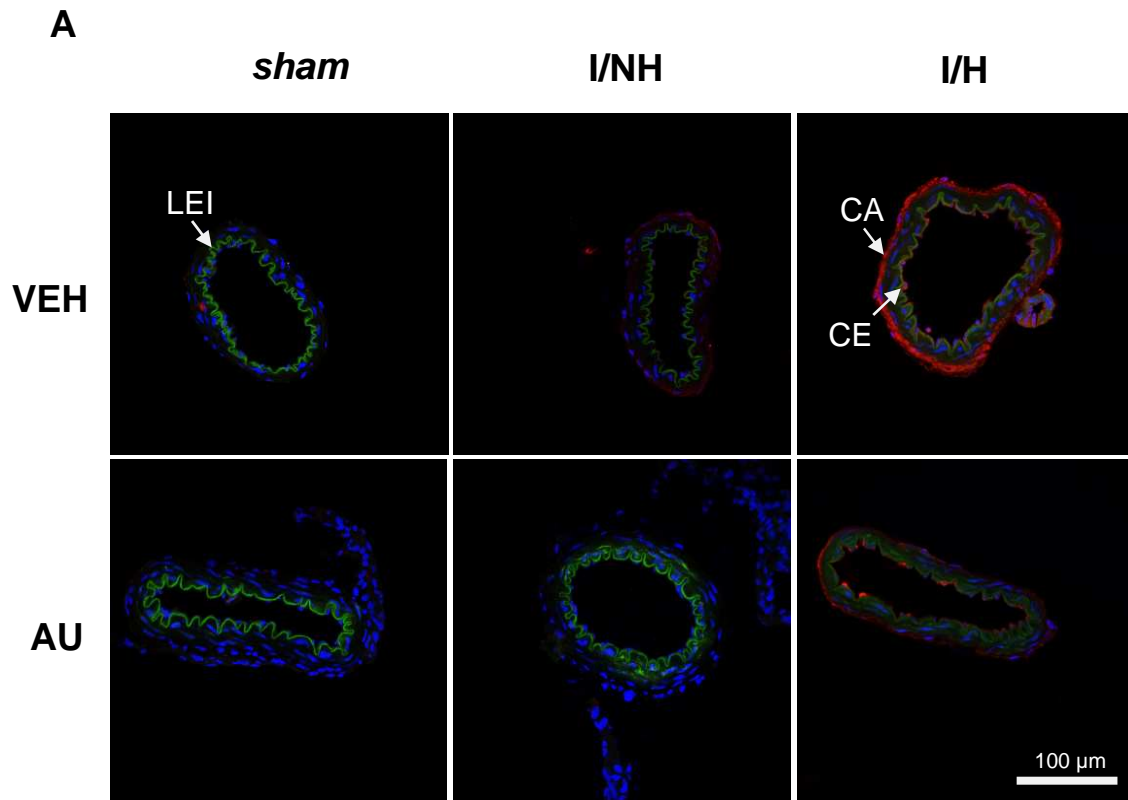


Figura 24. A: imágenes representativas y B: cuantificación de la señal fluorescente de nitrotirosina (rojo) en secciones transversales de ACM ipsilateral de ratas *sham*, I/NH e I/H tratadas con VEH y AU. CA: células adventicias; CE: células endoteliales; LEI: lámina elástica interna (autofluorescencia en verde); núcleos teñidos en azul. Dimensiones de la imagen 238 x 238 μ m. Los resultados están expresados como media \pm e.s.m. de animales *sham* (VEH: $n = 7$; AU: $n = 4$), I/NH (VEH: $n = 6$; AU: $n = 3$) e I/H (VEH: $n = 5$; AU: $n = 3$); * $P < 0.05$ mediante ANOVA de dos vías seguido del test de Bonferroni.

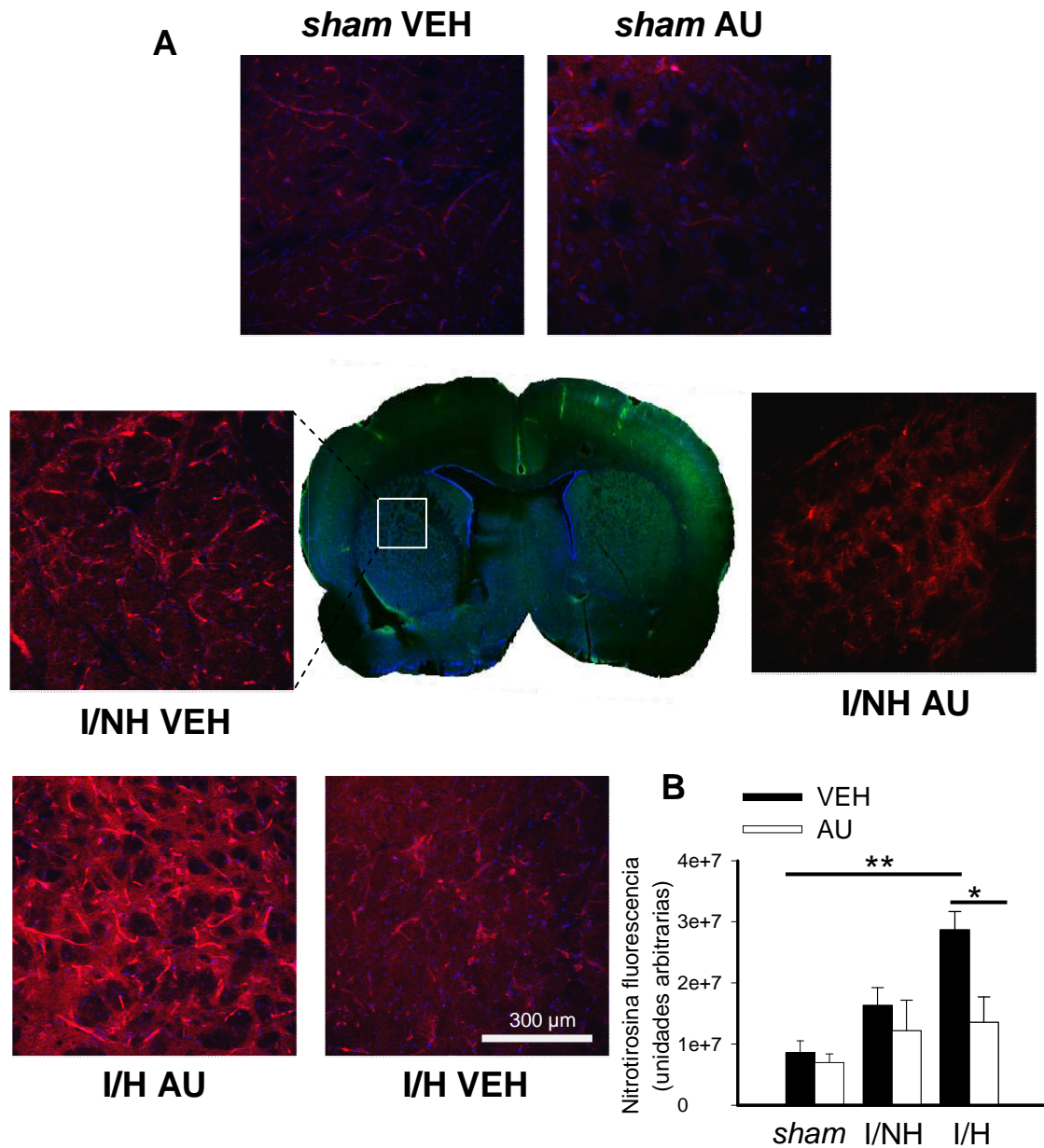


Figura 25. A: imágenes representativas y B: cuantificación de la señal fluorescente de nitrotirosina (rojo) localizada en la zona ipsilateral subcortical de secciones coronales anteriores de cerebro ratas *sham*, I/NH e I/H tratadas con VEH y AU. Núcleos teñidos en azul. Dimensiones de la imagen 238 x 238 µm. Los resultados están expresados como media ± e.s.m. de animales *sham* (VEH: $n = 3$; AU: $n = 3$), I/NH (VEH: $n = 3$; AU: $n = 3$) e I/H (VEH: $n = 3$; AU: $n = 3$); * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ mediante ANOVA de dos vías seguido del test de Bonferroni.

4. EFECTO DE LA I/R SOBRE LA PRODUCCIÓN VASCULAR DE NO

Para analizar si el aumento de ONOO⁻ observado en arterias de animales isquémicos hiperémicos podría ser debida, en parte, a un incremento en la producción de NO, evaluamos la expresión, por inmunofluorescencia, de las tres isoformas de la NOS en la ACM y los niveles plasmáticos de nitritos.

La expresión de eNOS (Figura 26), iNOS (Figura 27) y nNOS (Figura 28) no se modificó por la I/R. No obstante, los niveles plasmáticos de nitritos ($\mu\text{M/l}$) fueron mayores ($P < 0.05$) en las ratas hiperémicas que en las *sham* (*sham* + VEH: 11.62 ± 0.36 , $n = 6$; I/NH + VEH: 11.81 ± 0.97 , $n = 7$; I/H + VEH: 13.77 ± 0.68 , $n = 5$), disminuyendo ($P < 0.05$) en presencia de AU (*sham* + AU: 12.25 ± 0.36 , $n = 4$; I/NH + AU: 12.10 ± 0.72 , $n = 6$; I/H + AU: 10.87 ± 0.74 , $n = 7$).

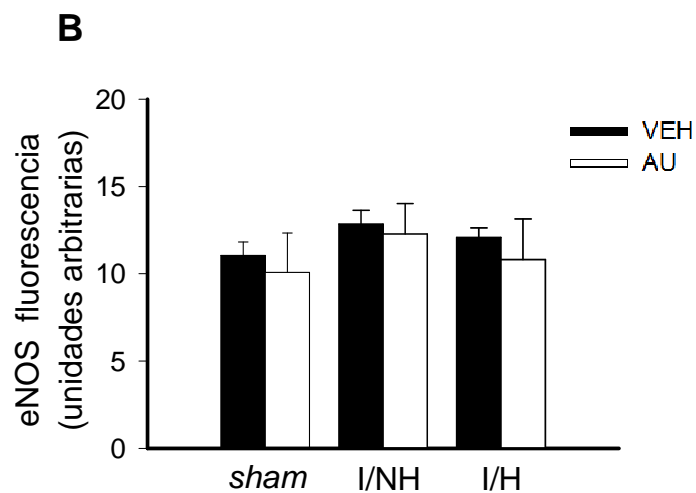
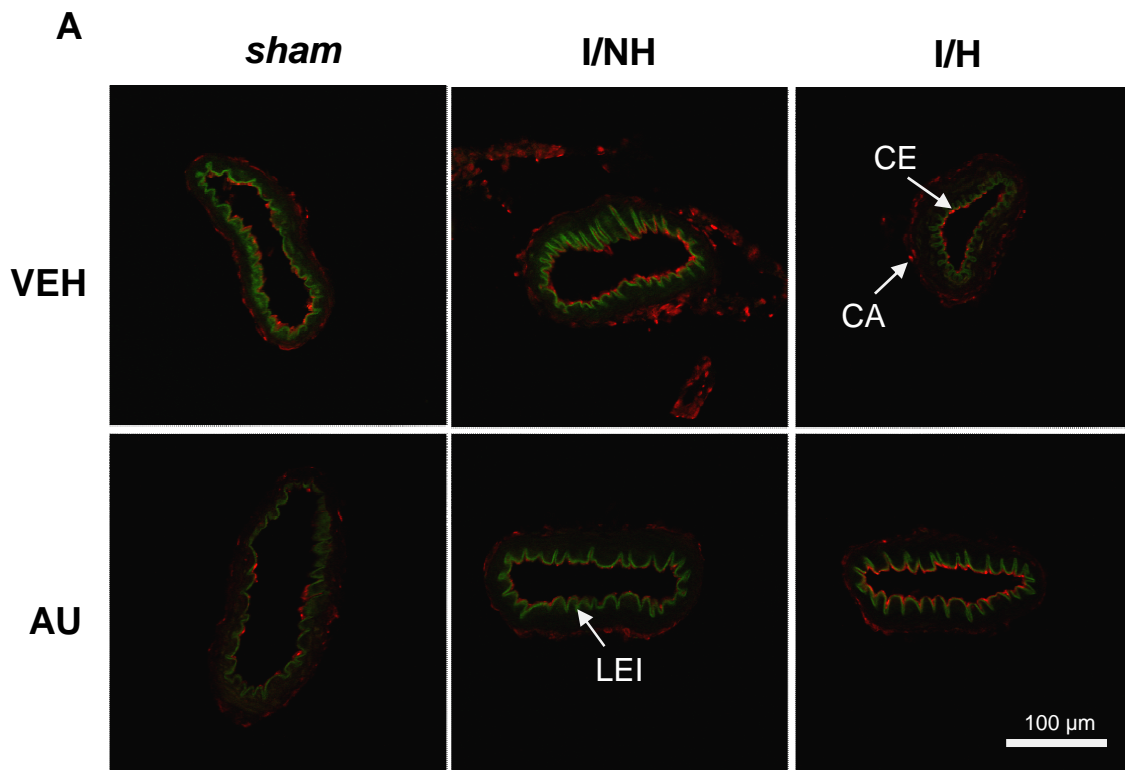


Figura 26. A: imágenes representativas y B: cuantificación de la señal fluorescente de eNOS (rojo) en secciones transversales de ACM ipsilateral de ratas *sham*, I/NH e I/H tratadas con VEH y AU. CA: células adventicias; CE: células endoteliales; LEI: lámina elástica interna (autofluorescencia en verde). Dimensiones de la imagen 238 x 238 µm. Los resultados están expresados como media ± e.s.m. de animales *sham* (VEH: $n = 7$; AU: $n = 4$), I/NH (VEH: $n = 8$; AU: $n = 4$) e I/H (VEH: $n = 7$; AU: $n = 4$).

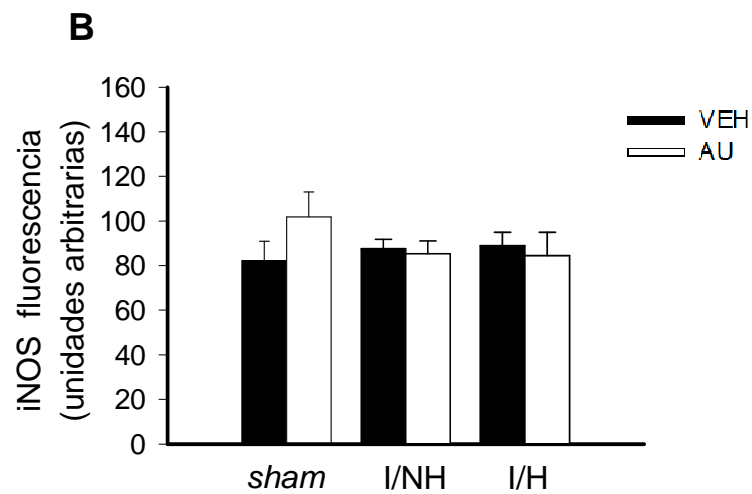
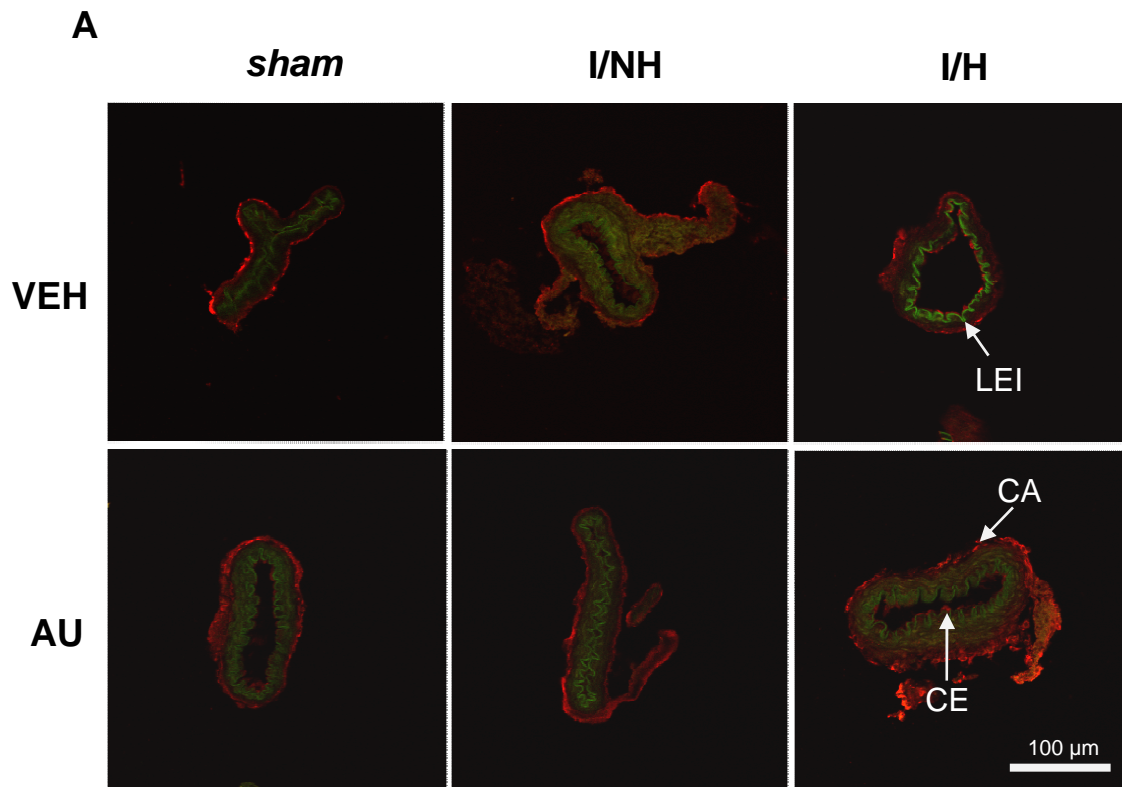


Figura 27. A: imágenes representativas y B: cuantificación de la señal fluorescente de iNOS (rojo) en secciones transversales de ACM ipsilateral de ratas *sham*, I/NH e I/H tratadas con VEH y AU. CA: células adventicias; CE: células endoteliales; LEI: lámina elástica interna (autofluorescencia en verde). Dimensiones de la imagen 238 x 238 μm . Los resultados están expresados como media \pm e.s.m. de animales *sham* (VEH: $n = 10$; AU: $n = 4$), I/NH (VEH: $n = 8$; AU: $n = 5$) e I/H (VEH: $n = 10$; AU: $n = 4$).

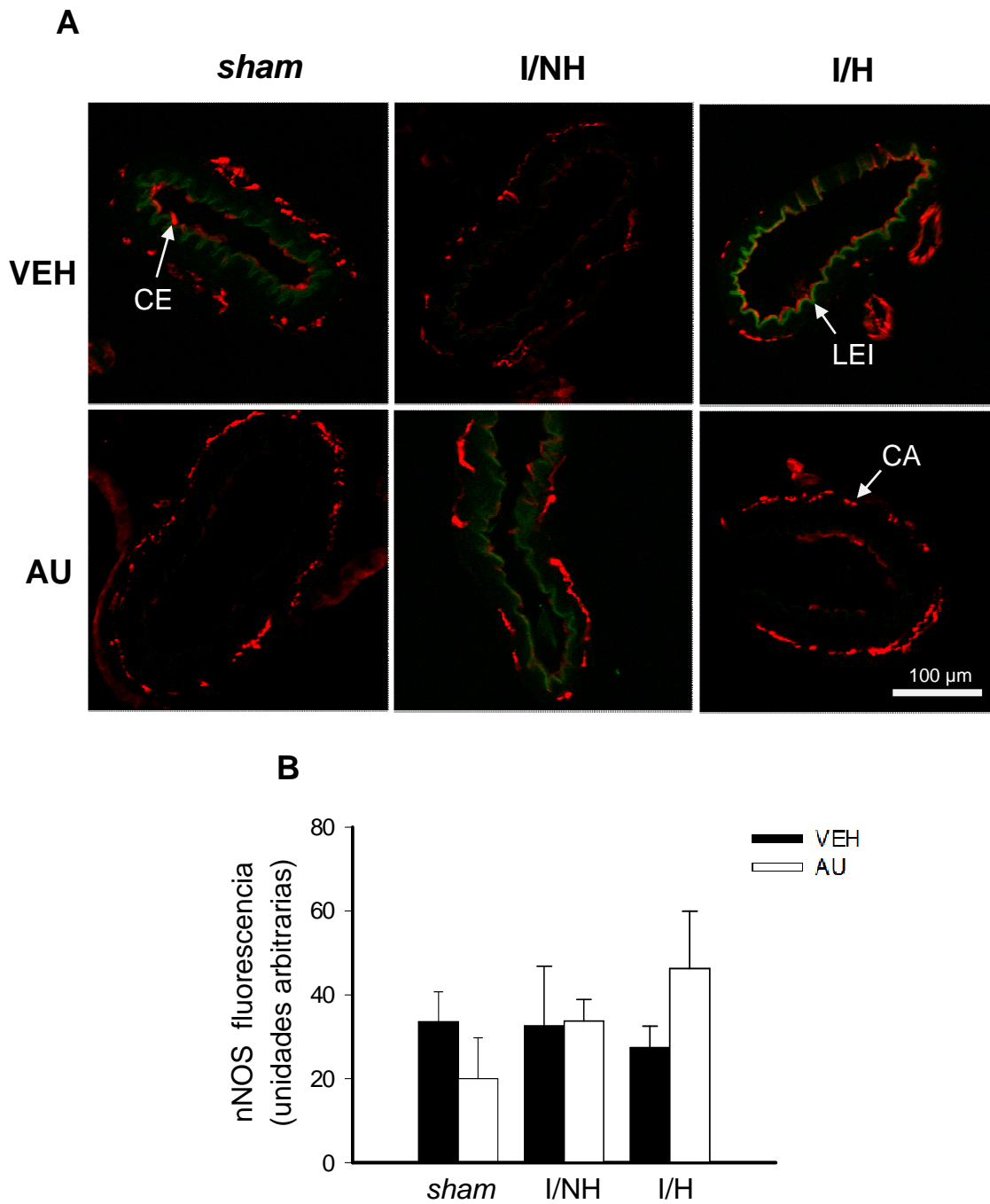


Figura 28. A: imágenes representativas y B: cuantificación de la señal fluorescente de nNOS (rojo) en secciones transversales de ACM ipsilateral de ratas *sham*, I/NH e I/H tratadas con VEH y AU. CA: células adventicias; CE: células endoteliales; LEI: lámina elástica interna (autofluorescencia en verde). Dimensiones de la imagen 238 x 238 μm . Los resultados están expresados como media \pm e.s.m. de animales *sham* (VEH: $n = 4$; AU: $n = 3$), I/NH (VEH: $n = 4$; AU: $n = 4$) e I/H (VEH: $n = 4$; AU: $n = 4$).

5. EFECTO DE LA I/R SOBRE LA PRODUCCIÓN VASCULAR DE $O_2^{\cdot-}$

La producción *in situ* de $O_2^{\cdot-}$ se evaluó mediante el uso de la sonda fluorescente HE, para determinar si cambios en la producción de este radical libre podrían relacionarse con las diferencias observadas en la producción de $ONOO^-$ (Figura 24).

En la Figura 29A se muestran imágenes representativas de secciones transversales de ACM ipsilateral de ratas *sham*, isquémicas hiperémicas e isquémicas no hiperémicas tratadas con vehículo o con AU, en presencia de HE. En estas imágenes puede observarse que la formación de $O_2^{\cdot-}$ tuvo lugar en las tres tunicas arteriales. La cuantificación de la señal fluorescente (Figura 29B) nos muestra que la I/R incrementó ($P < 0.05$) la fluorescencia a HE en la pared de la ACM, tanto en presencia como en ausencia de hiperemia. El tratamiento con AU disminuyó ligeramente el incremento de fluorescencia a HE en ratas no hiperémicas y lo redujo de manera significativa ($P < 0.001$) en animales hiperémicos, confirmando el efecto antioxidante de dicho compuesto.

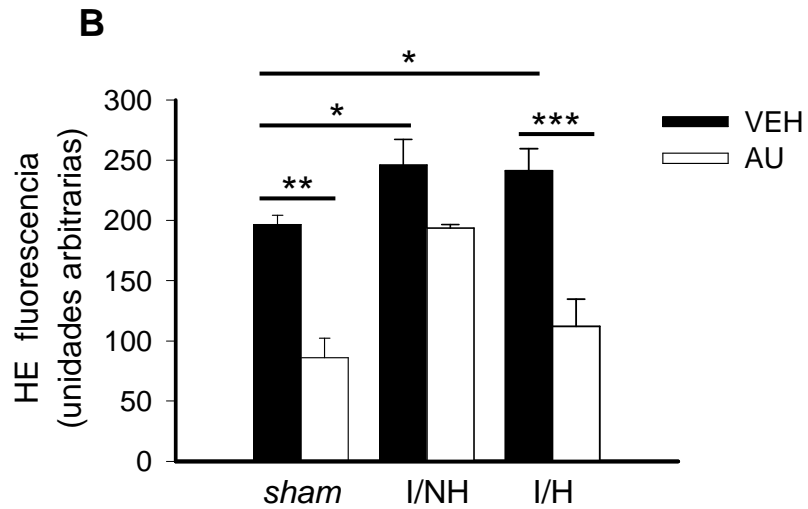
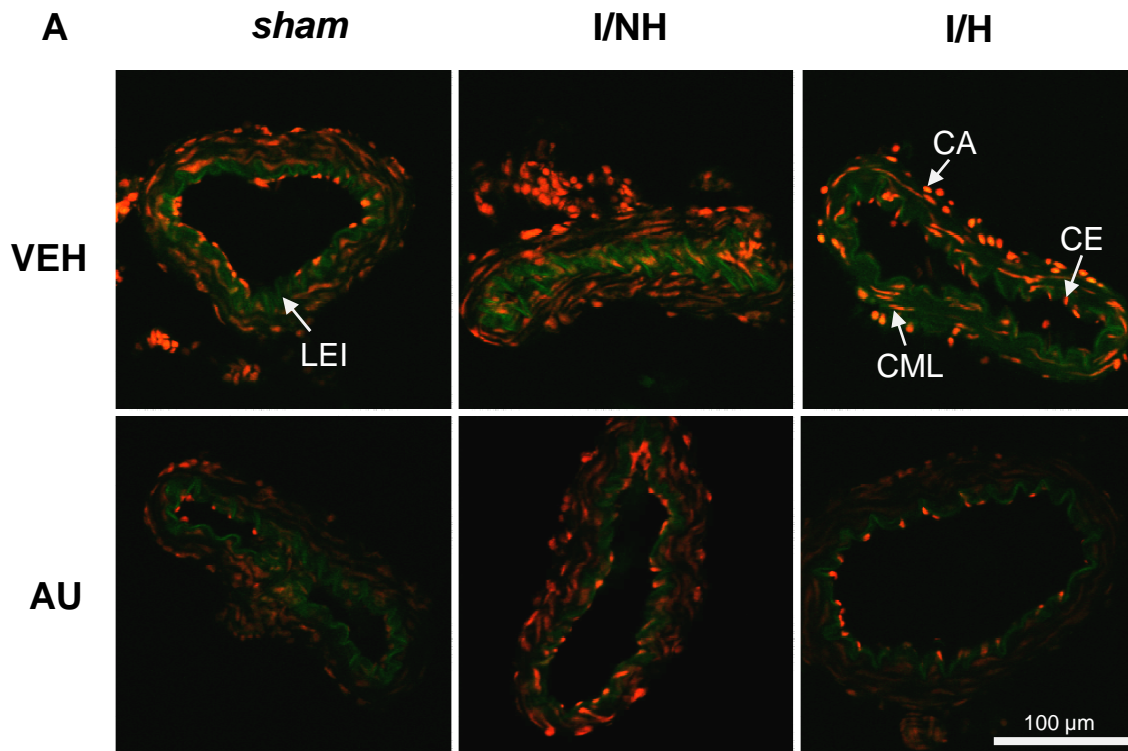


Figura 29. A: imágenes representativas y B: cuantificación de la señal fluorescente de secciones transversales de ACM ipsilateral de ratas *sham*, I/NH e I/H marcadas con HE (fluorescencia en rojo), tratadas con VEH y AU. CA, células adventicias; CE: células endoteliales; CML: células musculares lisas; LEI: lámina elástica interna (autofluorescencia en verde). Dimensiones de la imagen 238 x 238 µm. Los resultados están expresados como media ± e.s.m. de animales *sham* (VEH: $n = 10$; AU: $n = 5$), I/NH (VEH: $n = 12$; AU: $n = 5$) e I/H (VEH: $n = 8$; AU: $n = 7$); * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ mediante ANOVA de dos vías seguido del test de Bonferroni.

6. CAMBIOS INDUCIDOS POR I/R EN LOS NIVELES DE ARNm Y EN LA EXPRESIÓN VASCULAR DE gp91^{phox} Y p22^{phox}

Con el fin de analizar la participación de la enzima NADPH oxidasa, principal fuente vascular de $O_2^{\cdot-}$, en el incremento de la producción de $O_2^{\cdot-}$ observado en arterias cerebrales de animales isquémicos estudiamos la expresión fluorescente y los niveles de ARNm de las subunidades gp91^{phox} y p22^{phox}.

En las Figuras 30A y 31A puede observarse una ligera señal inmunofluorescente de ambas subunidades a lo largo de la pared de la ACM ipsilateral, indicando que se expresan a nivel arterial. En presencia de HR se observó una tendencia, que no alcanzó niveles de significación estadística, a incrementar la expresión de gp91^{phox} (Figura 30B), y un aumento, estadísticamente significativo ($P < 0.01$), de la expresión fluorescente de p22^{phox} (Figura 31B). La señal fluorescente fue especialmente elevada en la capa adventicia de las ratas hiperémicas en relación al resto de grupos. El tratamiento con AU disminuyó ($P < 0.05$) la expresión de ambas subunidades en las arterias de los animales hiperémicos.

El análisis cuantitativo de los niveles de ARNm de las dos subunidades de la NADPH oxidasa mostró un incremento ($P < 0.05$), tanto en los niveles de gp91^{phox} (Figura 30C) como de p22^{phox} (Figura 31C), en los animales hiperémicos respecto a los observados en las ratas *sham*, que desapareció ($P < 0.05$) con la administración de AU. No obstante, en ratas no hiperémicas el tratamiento con el fármaco dio lugar a un aumento ($P < 0.05$) inesperado en los niveles de ARNm de p22^{phox} (Figura 31C).

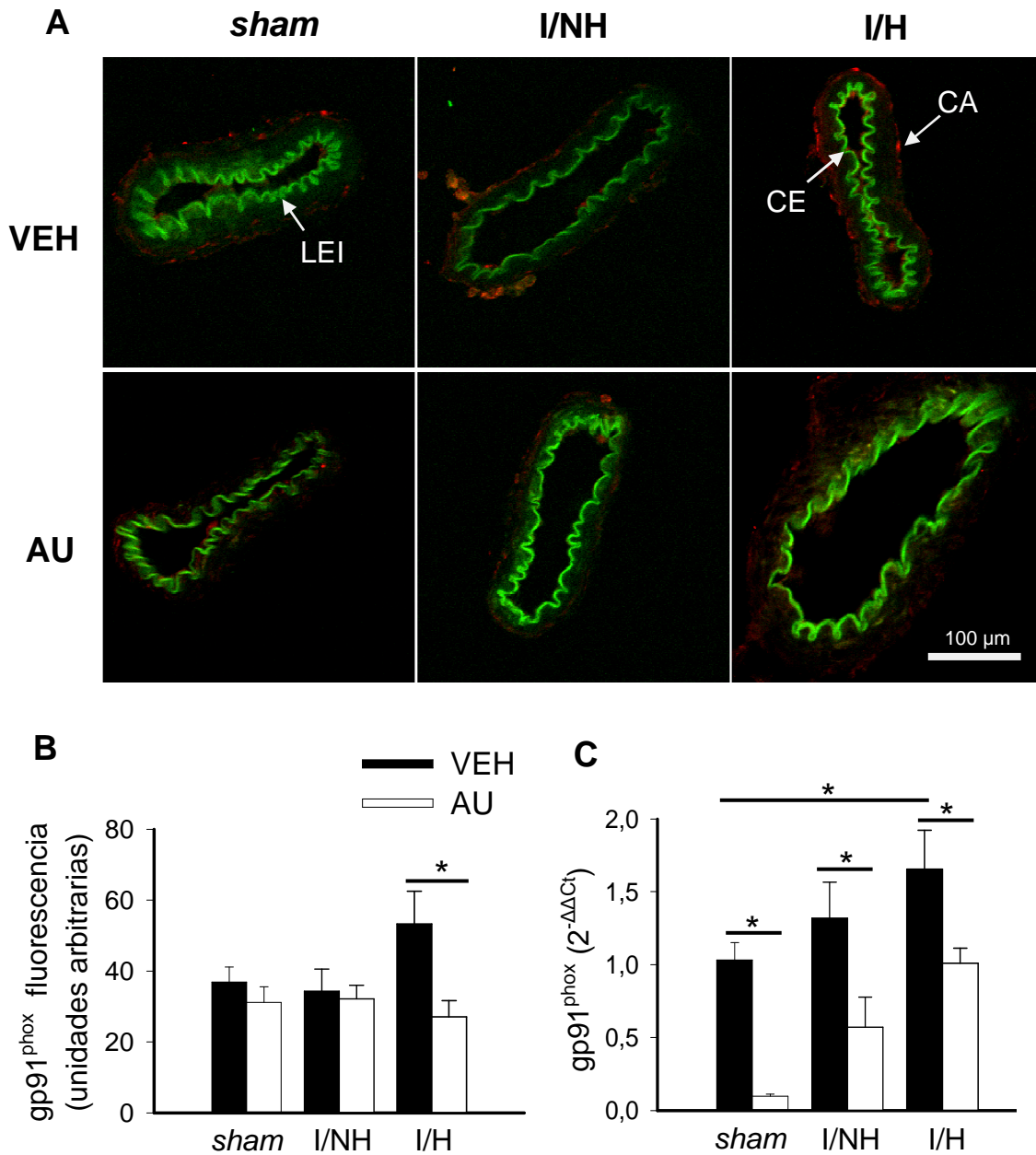


Figura 30. A: imágenes representativas. B: cuantificación de la señal fluorescente (rojo) de la subunidad gp91^{phox} de la enzima NADPH oxidasa en secciones transversales de ACM ipsilateral de ratas *sham*, *I/NH* e *I/H*, tratadas con VEH y AU. CA: células adventicias; CE: células endoteliales; LEI: lámina elástica interna (autofluorescencia en verde). C: análisis comparativo de los niveles de ARNm de la subunidad gp91^{phox}. Los niveles de ARNm se expresaron con $2^{-\Delta\Delta Ct}$ utilizando la subunidad ribosomal 18S como control interno. Dimensiones de la imagen 238 x 238 μ m. Los resultados están expresados como media \pm e.s.m. de animales *sham* (VEH: $n = 6-7$; AU: $n = 4-2$), *I/NH* (VEH: $n = 5-6$; AU: $n = 3-4$) e *I/H* (VEH: $n = 5-6$; AU: $n = 5$); * $P < 0.05$ mediante ANOVA de dos vías seguido del test de Bonferroni.

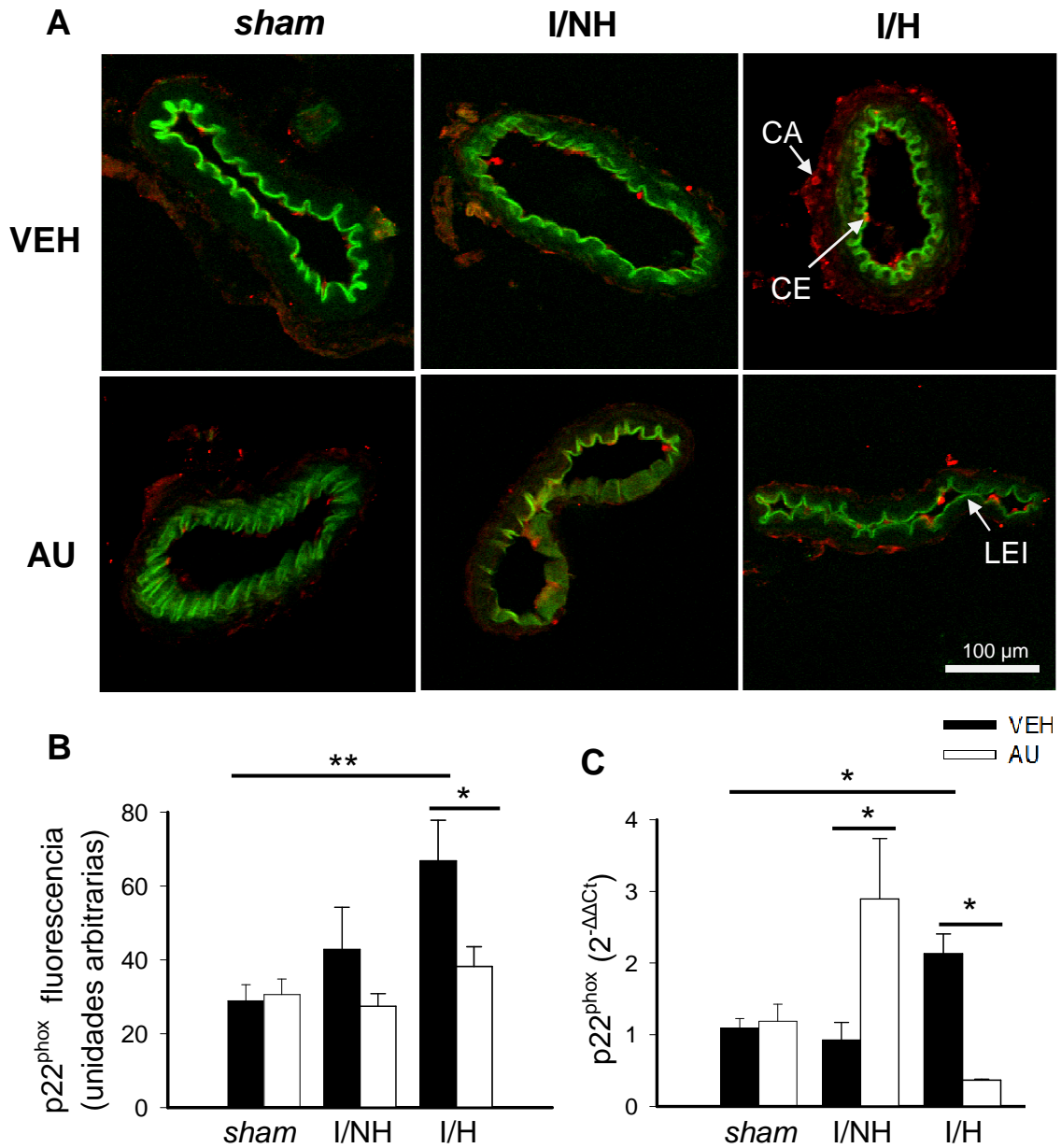


Figura 31. A: imágenes representativas. B: cuantificación de la señal fluorescente (rojo) de la subunidad p22^{phox} de la enzima NADPH oxidasa en secciones transversales de ACM ipsilateral de ratas *sham*, *I/NH* e *I/H*, tratadas con VEH y AU. CA: células adventicias; CE: células endoteliales; LEI: lámina elástica interna (autofluorescencia en verde). C: análisis comparativo de los niveles de ARNm de la subunidad p22^{phox}. Los niveles de ARNm se expresaron con 2^{- $\Delta\Delta$ Ct}, utilizando la subunidad ribosomal 18S como control interno. Dimensiones de la imagen 238 x 238 μ m. Los resultados están expresados como media \pm e.s.m. de animales *sham* (VEH: *n* = 6-7; AU: *n* = 4-5), *I/NH* (VEH: *n* = 5-6; AU: *n* = 3-4) e *I/H* (VEH: *n* = 5-6; AU: *n* = 5-6); **P* < 0.05, ***P* < 0.01 mediante ANOVA de dos vías seguido del test de Bonferroni.

7. CAMBIOS INDUCIDOS POR I/R EN LA ESTRUCTURA DE LA ACM

Para el análisis de las propiedades estructurales arteriales se midió, en condiciones pasivas (KH-0 Ca^{2+}), el diámetro interno y externo de la ACM ipsilateral sometida a presiones intraluminales crecientes (de 3 a 120 mmHg), y se estudió la influencia de la hiperemia y del tratamiento con AU sobre dichos parámetros.

La Figura 32 muestra el efecto del aumento de la presión intraluminal sobre el diámetro externo (Figura 32A) e interno (Figura 32B) en ACM de ratas *sham*, I/NH e I/H tratadas con VEH o AU. Los animales no hiperémicos no mostraron alteraciones en los diámetros, mientras que la HR se asoció a valores de diámetro externo mayores ($P < 0.05$) en comparación con los obtenidos en las ratas *sham* (Figura 32A). El tratamiento con AU no modificó significativamente los diámetros externos; en cambio, provocó un incremento ($P < 0.05$) del diámetro interno en presencia de HR y una tendencia ($P = 0.06$) a aumentarlo en ausencia de hiperemia, respecto al grupo *sham* (Figura 32B).

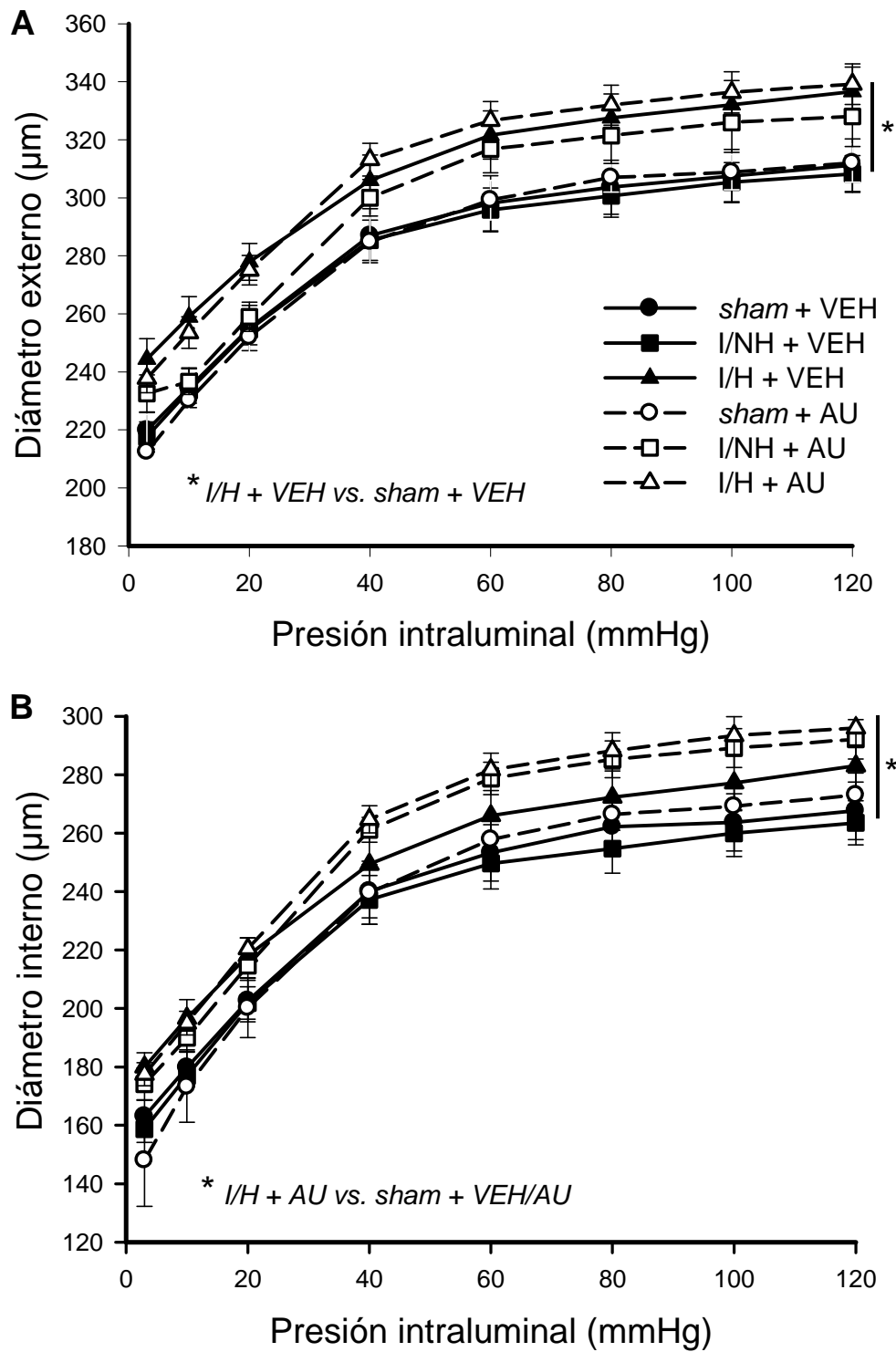


Figura 32. Cambios en el diámetro externo e interno inducidos por I/R en ACM ipsilateral, en condiciones pasivas (KH-0 Ca^{2+}). A: diámetro externo-presión intraluminal. B: diámetro interno-presión intraluminal. Cada punto representa la media \pm e.s.m de animales sham (VEH: $n = 13$; AU: $n = 5$), I/NH (VEH: $n = 11$; AU: $n = 8$) e I/H (VEH: $n = 12$; AU: $n = 12$); * $P < 0.05$ mediante ANOVA de dos vías con medidas repetidas en el factor presión.

La I/R no modificó la estructura de la pared de la ACM en ratas no hiperémicas (Figura 33). En cambio, en aquellos animales que sufrieron HR se observó un incremento en el grosor de la pared ($P < 0.01$; Figura 33A) y en el AST ($P < 0.001$; Figura 33B), aunque la relación pared/luz no experimentó cambios estadísticamente significativos (Figura 33C). El tratamiento con AU previno (grosor de la pared: $P < 0.01$; AST: $P < 0.05$) los cambios estructurales observados en animales hiperémicos, sin afectar la estructura de la ACM en ratas *sham* (Figura 33, A y B).

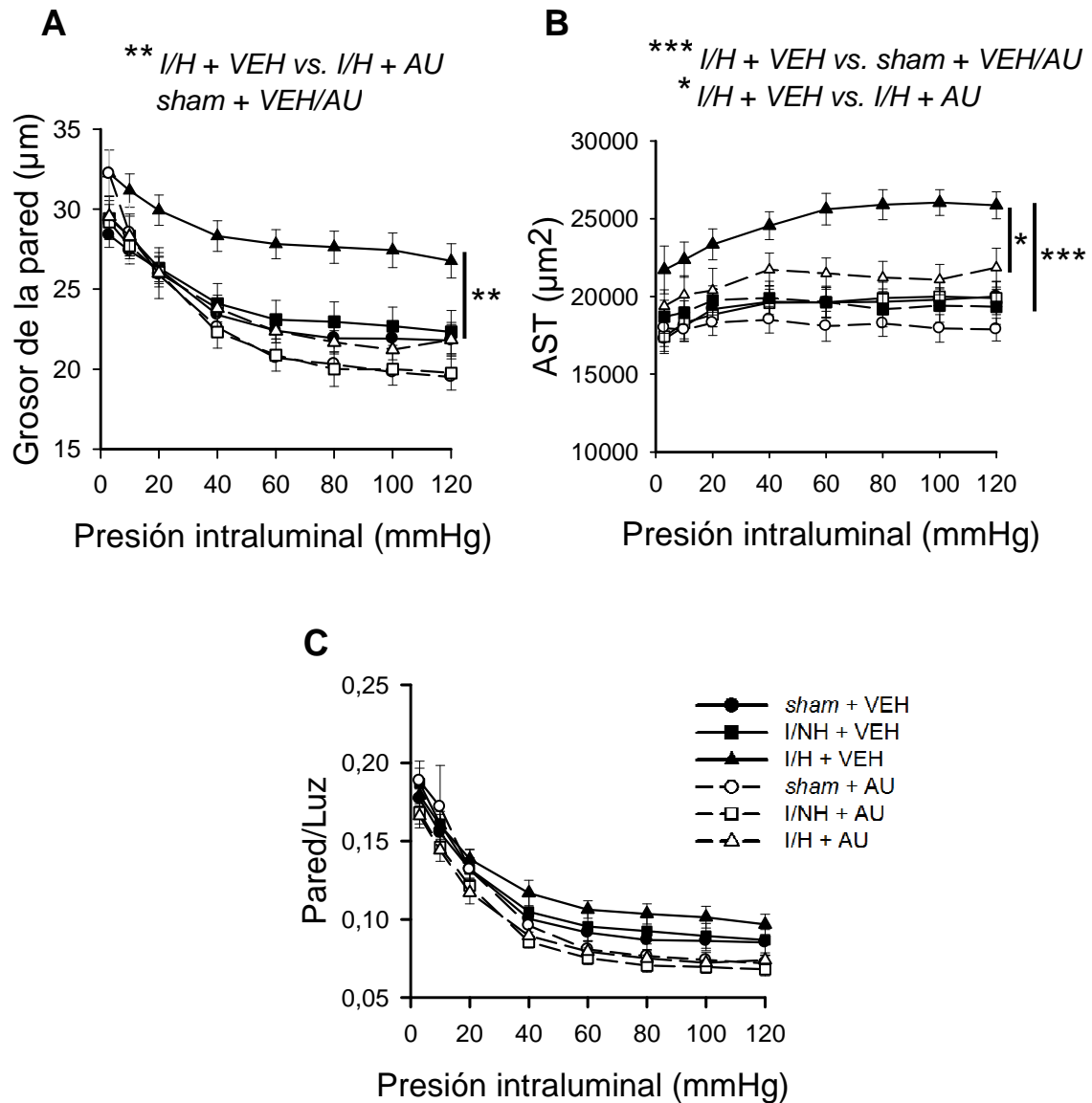


Figura 33. Cambios en los parámetros estructurales inducidos por I/R en ACM ipsilateral, en condiciones pasivas (KH-0 Ca^{2+}). A: grosor de la pared-presión intraluminal. B: área de la sección transversal (AST)-presión intraluminal. C: relación pared/luz-presión intraluminal. Cada punto representa la media \pm e.s.m de animales sham (VEH: $n = 13$; AU: $n = 5$), I/NH (VEH: $n = 11$; AU: $n = 8$) e I/H (VEH: $n = 12$; AU: $n = 12$); * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ mediante ANOVA de dos vías con medidas repetidas en el factor presión.

8. CAMBIOS INDUCIDOS POR I/R EN LA MECÁNICA DE LA ACM

Los parámetros mecánicos de la ACM ipsilateral de ratas *sham*, I/NH e I/H en ausencia y en presencia de AU, se muestran en la Figura 34. En ausencia de tratamiento, las ratas hiperémicas mostraron valores de estrés de la pared arterial inferiores ($P < 0.05$) a los observados en las arterias de ratas *sham* (Figura 34A). La administración de AU previno ($P < 0.001$) la disminución del estrés experimentado por la pared arterial e inducido por I/R (Figura 34A).

La relación estrés-tensión y los valores del parámetro β de la relación estrés-tensión fueron similares en todos los grupos (Figura 34B), independientemente de la presencia o ausencia de la I/R (*sham* + VEH: 6.9 ± 0.3 , $n = 13$; I/NH + VEH: 6.7 ± 0.2 , $n = 11$; I/H + VEH: 7.5 ± 0.5 , $n = 12$) y del tratamiento (*sham* + AU: 6.5 ± 0.1 , $n = 5$; I/NH + AU: 5.8 ± 0.4 , $n = 8$; I/H + AU: 6.5 ± 0.3 , $n = 12$), indicando que ni la I/R ni el tratamiento con AU modificaron significativamente la rigidez de las arterias.

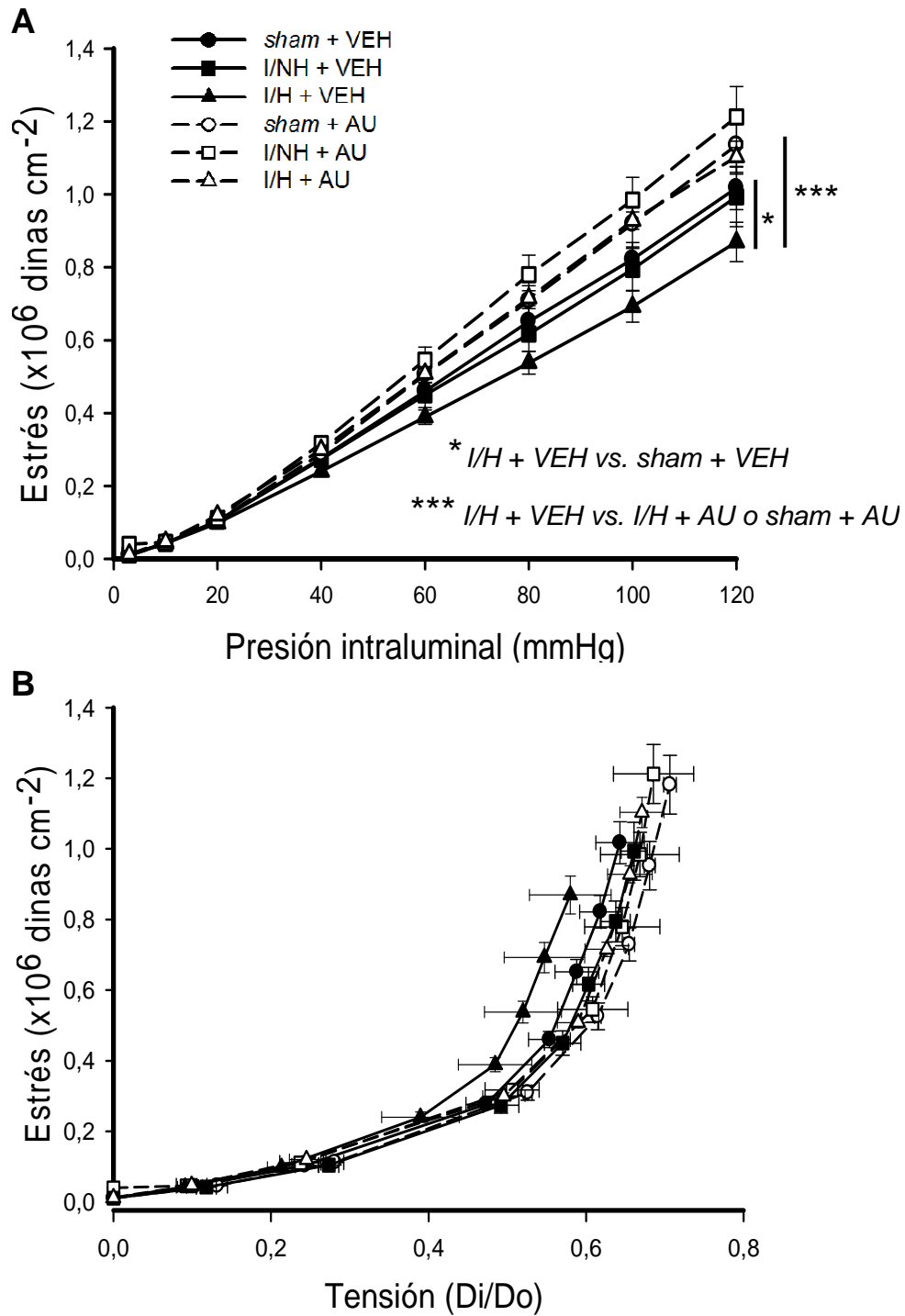


Figura 34. Cambios en las propiedades mecánicas inducidos por I/R en ACM ipsilateral, en condiciones pasivas (KH-0 Ca^{2+}). A: relación estrés-presión intraluminal. B: relación estrés-tensión (Di/Do). Di: diámetro interno observado para una presión determinada; Do: diámetro externo a 3 mmHg. Cada punto representa la media \pm e.s.m. de de animales sham (VEH: $n = 13$; AU: $n = 4-5$), I/NH (VEH: $n = 11$; AU: $n = 8$) e I/H (VEH: $n = 12$; AU: $n = 12$); * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$ mediante ANOVA de dos vías con medidas repetidas en el factor presión.

9. CAMBIOS INDUCIDOS POR I/R EN LAS PROPIEDADES MIOGÉNICAS DE LA ACM

La I/R, independientemente de la presencia o ausencia de HR, aumentó ($P < 0.05$) el diámetro interno de la ACM ipsilateral en condiciones activas (KH-2.5 mM Ca^{2+}) en todo el rango de presiones estudiado, sin que este cambio fuera prevenido por el tratamiento con AU (Figura 35A).

En la Figura 35B se representa el diámetro normalizado en función de los cambios de presión intraluminal, que refleja la capacidad intrínseca de contracción de la ACM a medida que se incrementa la presión intraluminal (tono miogénico). Este parámetro, que se calcula a partir de la relación entre el diámetro interno en condiciones activas respecto al mismo diámetro en condiciones pasivas, fue menor ($P < 0.05$) en arterias de ratas isquémicas, tanto hiperémicas como no hiperémicas, comparado con vasos de animales *sham*, y el tratamiento con AU fue incapaz de prevenir esta respuesta. No obstante, el análisis de la pendiente de las curvas de diámetro normalizado-presión (reactividad miogénica) evidencia que ni la I/R (*sham* + VEH: 0.05 ± 0.05 , $n = 13$; I/NH + VEH: -0.01 ± 0.3 , $n = 11$; I/H + VEH: 0.05 ± 0.04 , $n = 12$) ni el tratamiento (*sham* + AU: 0.02 ± 0.06 , $n = 5$; I/NH + AU: 0.01 ± 0.05 , $n = 8$; I/H + AU: 0.01 ± 0.03 , $n = 12$) modifican este último parámetro.

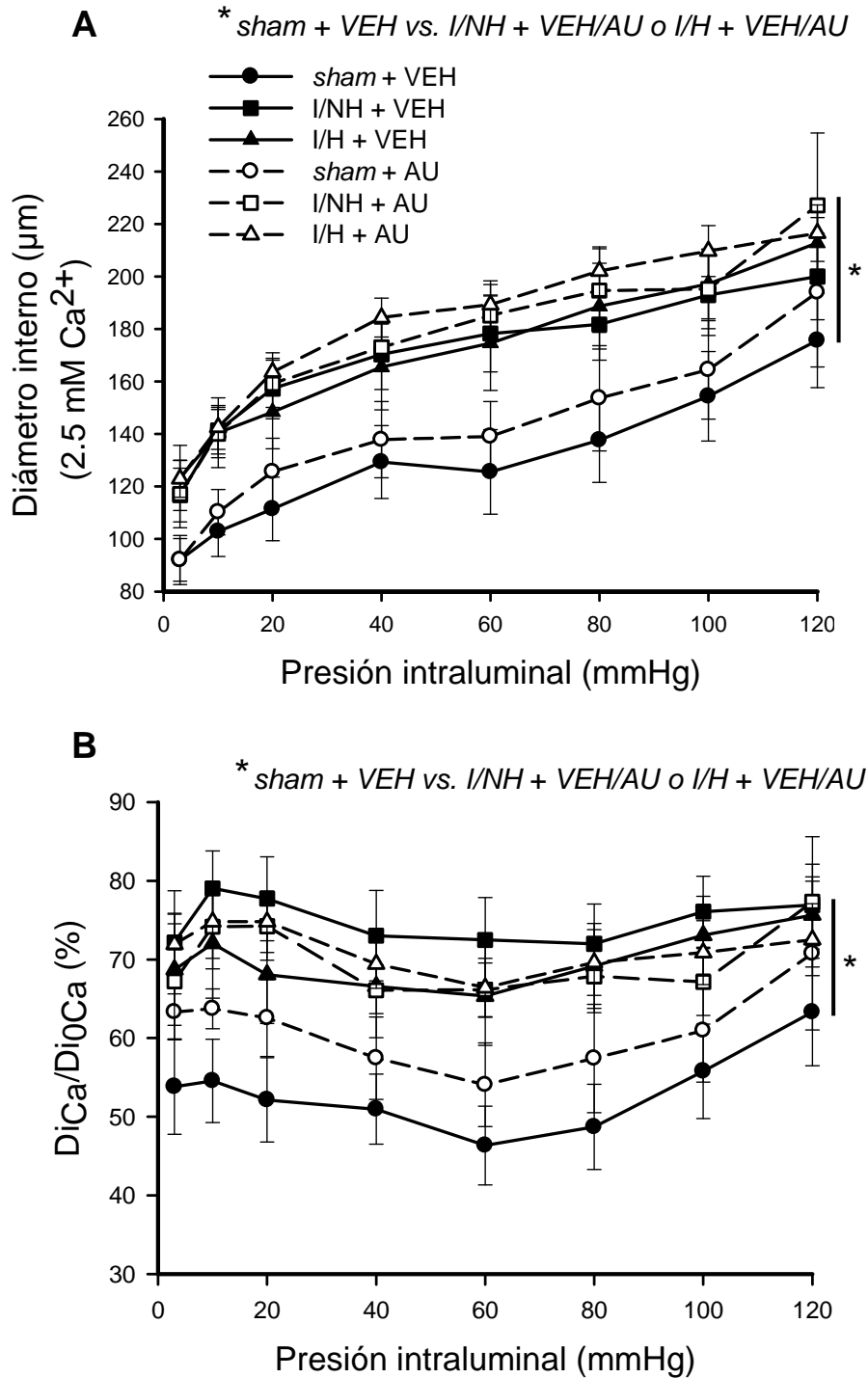


Figura 35. Cambios en las propiedades miogénicas tras la I/R en ACM, en condiciones activas (KH-2.5 mM Ca^{2+}). A: diámetro interno-presión intraluminal. B: diámetro normalizado ($100 \times \text{Di}_{\text{Ca}}/\text{Di}_{0\text{Ca}}$)-presión intraluminal. Di_{Ca} y $\text{Di}_{0\text{Ca}}$: diámetros internos medidos en condiciones activas y pasivas, respectivamente. Cada punto representa la media \pm e.s.m. de animales *sham* (VEH: $n = 13$; AU: $n = 4-5$), I/NH (VEH: $n = 11$; AU: $n = 8$) e I/H (VEH: $n = 12$; AU: $n = 12$); * $P < 0.05$ mediante ANOVA de dos vías con medidas repetidas en el factor presión.

10. CAMBIOS INDUCIDOS POR I/R EN LA DISTRIBUCIÓN CELULAR TRIDIMENSIONAL DE LA ACM

Las medidas morfométricas de la ACM ipsilateral de ratas *sham*, isquémicas no hiperémicas e isquémicas hiperémicas, tratadas con VEH y AU, se muestran en la Figura 36. La presencia de hiperemia se asoció a un incremento del volumen total de la pared ($P < 0.001$) y de la capa adventicia ($P < 0.001$), en comparación con los datos obtenidos de los animales *sham*, junto a un mayor número de células adventicias y musculares ($P < 0.01$), sin que se observaran cambios en el volumen de la túnica media. Estos cambios morfométricos no se observaron en los animales isquémicos no hiperémicos. El tratamiento con AU en ratas hiperémicas previno ($P < 0.001$) el incremento del volumen de la pared y de la capa adventicia y el aumento de CA, sin afectar de manera significativa al número de CML.

En la Figura 37 se muestran imágenes representativas, obtenidas con microscopía láser confocal, de los núcleos de la capa adventicia en ACM presurizada de ratas *sham*, isquémicas no hiperémicas e isquémicas hiperémicas tratadas con VEH, teñidos con el colorante nuclear Hoechst 33342 (10 $\mu\text{g/ml}$).

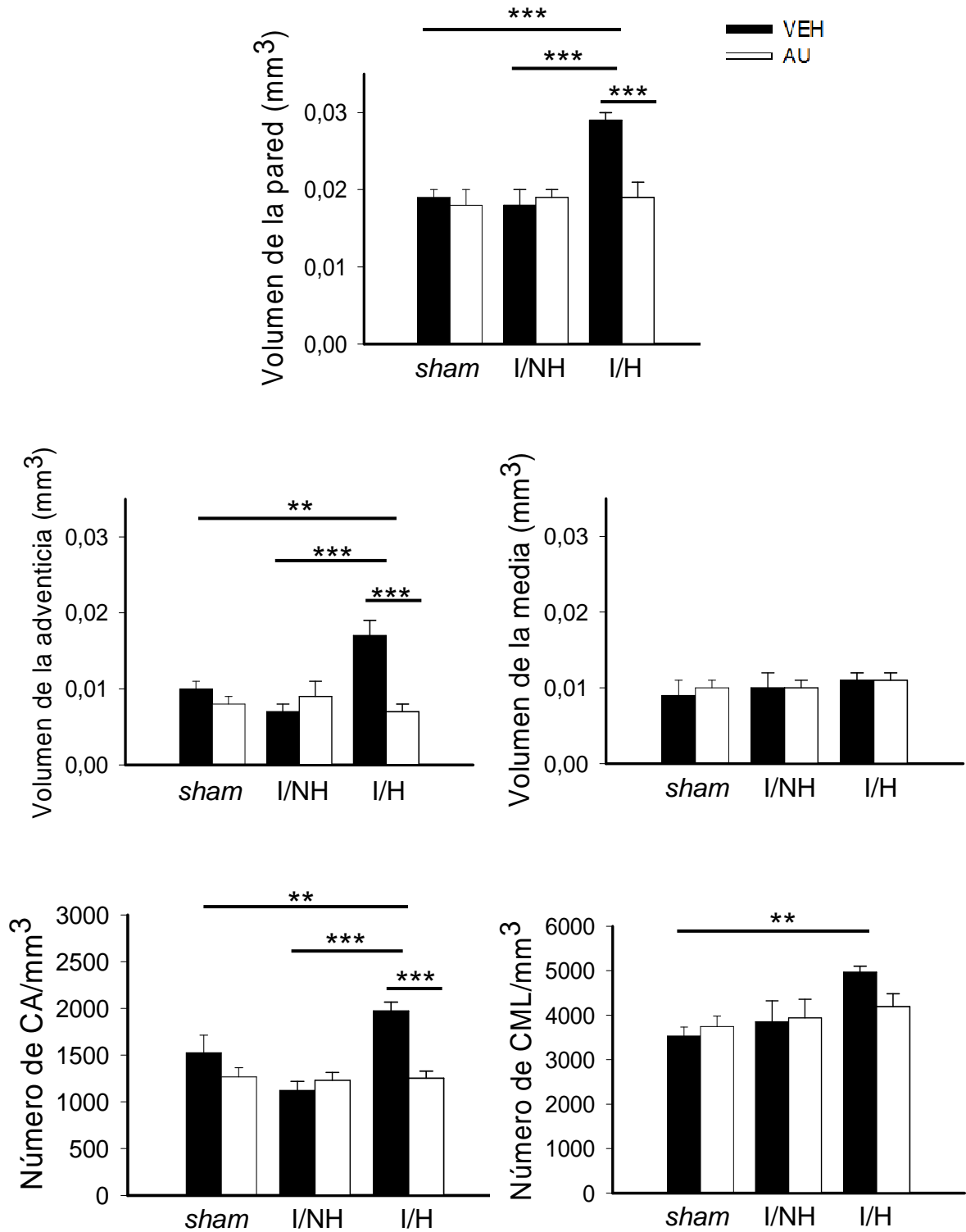


Figura 36. Comparación de la distribución celular en segmentos presurizados de ACM tras la I/R. Cada punto representa la media \pm e.s.m. de animales sham (VEH: $n = 4$; AU: $n = 3$), I/NH (VEH: $n = 5$; AU: $n = 4$) e I/H (VEH: $n = 4$; AU: $n = 5$); $**P < 0.01$, $***P < 0.001$ mediante ANOVA de dos vías seguido del test de Bonferroni.

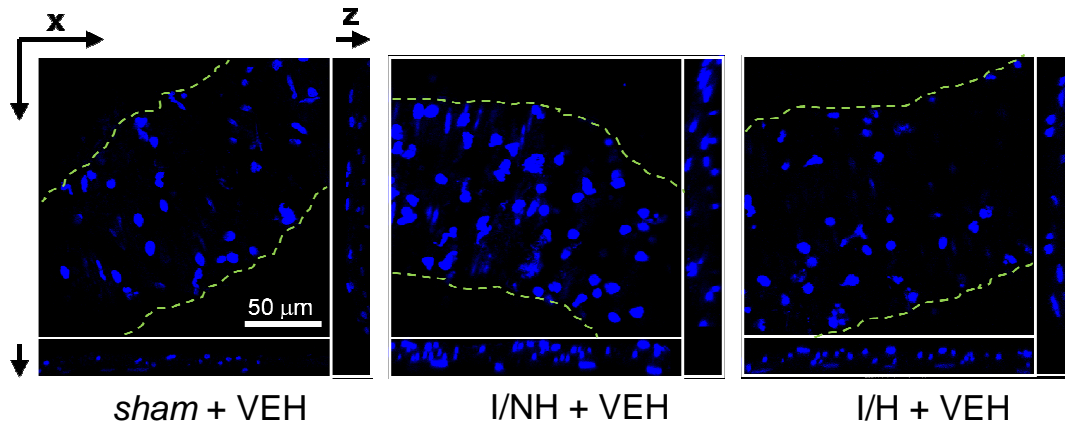


Figura 37. Reconstrucciones ortogonales representativas a nivel de capa adventicia obtenidas con microscopia confocal de fluorescencia. Las arterias se incubaron con Hoechst 33342 para teñir los núcleos (azul).

11. INFLUENCIA DE LA I/R Y DEL AU EN LA EXPRESIÓN VASCULAR DE ERK1/2 FOSFORILADA

Las quinasas reguladas por señales extracelulares y activadas por fosforilación (pERK1/2) intervienen, entre otros procesos, en la inducción de la proliferación celular (Meloche y Pouyssegur, 2007). El aumento de células adventicias observado en la pared de la ACM ipsilateral en presencia de HR (Figura 36) quedó respaldado por el incremento ($P < 0.05$) de la señal fluorescente de pERK1/2 a lo largo de la pared de la ACM de ratas hiperémicas, principalmente en la capa adventicia (Figura 38). El tratamiento con AU redujo ($P < 0.05$) el incremento en la expresión de dicha proteína.

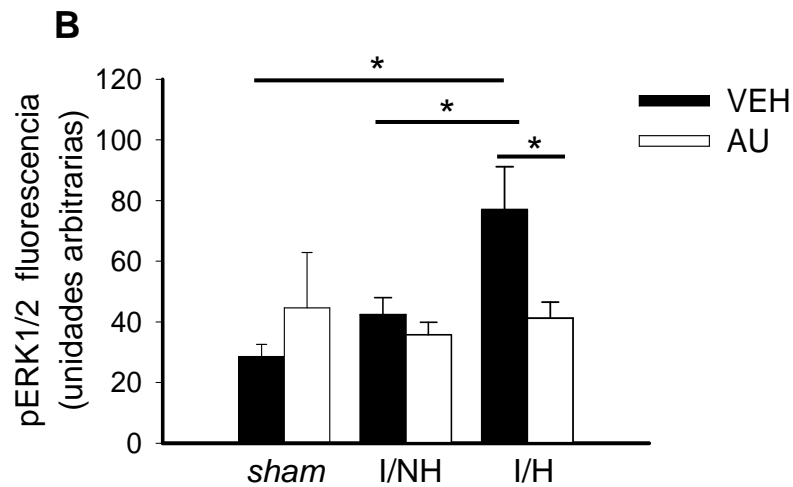
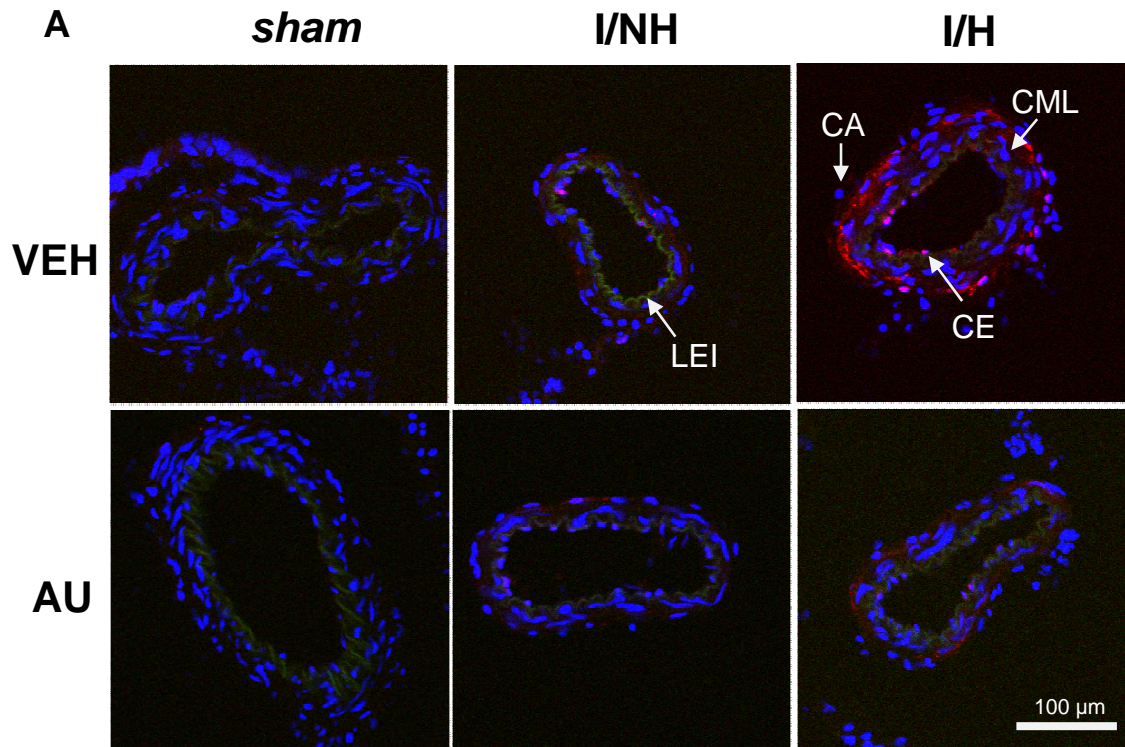


Figura 38. A: imágenes representativas y B: cuantificación de la señal fluorescente de pERK1/2 (rojo) en secciones transversales de ACM ipsilateral de ratas *sham*, I/NH e I/H, tratadas con VEH y AU. CA: células adventicias; CE: células endoteliales; CML: células musculares lisas; LEI: lámina elástica interna (autofluorescencia en verde); núcleos teñidos en azul. Dimensiones de la imagen 238 x 238 µm. Los resultados están expresados como media ± e.s.m. de animales *sham* (VEH: $n = 4$; AU: $n = 3$), I/NH (VEH: $n = 4$; AU: $n = 4$) e I/H (VEH: $n = 4$; AU: $n = 4$); * $P < 0.05$ mediante ANOVA de dos vías seguido del test de Bonferroni.

12. EFECTO DE LA I/R EN LA PRODUCCIÓN PLASMÁTICA DE CITOQUINAS/QUIMIOQUINAS

En un primer análisis exploratorio para identificar los posibles mecanismos moleculares responsables del remodelado vascular observado en arterias ipsilaterales de animales hiperémicos, se midieron los niveles de un total de 27 citoquinas/quimioquinas en el plasma de ratas *sham* y de ratas sometidas a I/R (Tabla 5). Únicamente se observó un incremento en las citoquinas IL-1 β ($P < 0.05$; Figura 39A) e IL-18 ($P < 0.01$; Figura 39B) de ratas hiperémicas. Ninguna de las otras citoquinas estudiadas se vio alterada tras la I/R. El tratamiento con AU previno (IL-1 β : $P < 0.05$; IL-18: $P < 0.01$) el aumento en los niveles circulantes de ambas citoquinas observado en los animales hiperémicos.

	<i>sham</i>		I/NH		I/H	
	vehicle	uric acid	vehicle	uric acid	vehicle	uric acid
G-CSF	12,90 ± 1,28	9,10 ± 0,06	10,63 ± 1,06	13,63 ± 2,74	14,82 ± 2,61	10,30 ± 0,88
Eotaxi- na	29,77 ± 2,46	20,39 ± 4,28	26,18 ± 1,27	26,53 ± 3,40	25,14 ± 1,77	22,99 ± 1,04
GM- CSF	115,23 ± 8,23	66,06 ± 3,08 [#]	121,77 ± 13,41	110,09 ± 4,81	118,99 ± 12,30	96,97 ± 4,26
IL-1 α	54,72 ± 6,28	47,51 ± 0,78	52,89 ± 6,53	46,41 ± 4,82	58,39 ± 9,32	47,24 ± 4,62
Leptina	59769,17 ± 9392,23	43527,67 ± 15679,64	49214,86 ± 5475,74	41925,60 ± 6737,38	43412,29 ± 8777,76	33404,86 ± 7874,74
MIP-1 α	15,59 ± 2,35	10,37 ± 0,50	12,59 ± 1,05	11,51 ± 0,87	17,17 ± 3,02	13,56 ± 1,52
IL-4	44,22 ± 4,30	34,35 ± 3,67	53,80 ± 5,68	35,11 ± 4,28 ^{###}	40,45 ± 3,02	34,09 ± 2,87
IL-1 β	87,03 ± 20,71	57,05 ± 4,82	136,18 ± 50,86	108,55 ± 25,18	174,84 ± 34,22*	57,89 ± 5,31[#]
IL-2	78,29 ± 15,39	43,57 ± 0,59	68,21 ± 8,73	62,79 ± 5,38	66,91 ± 9,76	59,11 ± 4,53
IL-6	347,92 ± 38,13	120,14 ± 59,14	183,41 ± 43,03	298,67 ± 65,41	394,07 ± 89,06	269,15 ± 45,41
EGF	0,17 ± 0,17	0,15 ± 0,15	1,96 ± 1,83	1,73 ± 1,73	0,57 ± 0,40	3,76 ± 2,43
IL-13	31,15 ± 3,31	13,7 ± 0,01	23,93 ± 4,07	33,96 ± 9,64	28,81 ± 3,65	23,23 ± 3,06
IL-10	144,45 ± 29,08	69,80 ± 6,66	220,86 ± 69,85	117,03 ± 27,79	150,51 ± 32,81	83,82 ± 7,63
IL- 12p70	254,76 ± 47,40	96,54 ± 17,15 ^{###}	272,89 ± 29,23	181,47 ± 16,15	202,05 ± 14,65	177,91 ± 11,65
IFN γ	178,67 ± 33,29	144,56 ± 31,32	171,30 ± 20,80	129,14 ± 15,57	178,60 ± 34,15	131,06 ± 14,23
IL-5	144,52 ± 9,06	101,69 ± 3,52 [#]	120,97 ± 8,28	117,52 ± 6,04	126,49 ± 8,67	109,08 ± 6,72
IL-17A	63,59 ± 12,21	54,83 ± 6,71	61,09 ± 7,27	49,50 ± 5,79	50,49 ± 5,18	39,66 ± 3,77
IL-18	194,80 ± 22,85	224,03 ± 110,29	307,93 ± 30,21	233,24 ± 25,08	500,55 ± 109,27^{***}	190,82 ± 20,08^{##}
MCP-1	1389,03 ± 128,80	1351,34 ± 26,03	1193,24 ± 134,87	1468,00 ± 79,80	1423,81 ± 123,83	1255,67 ± 147,85
IP-10	359,33 ± 49,68	208,34 ± 3,09	495,35 ± 106,46	386,67 ± 61,37	314,11 ± 32,19	331,01 ± 38,61
GRO/ KC	705,60 ± 84,16	607,78 ± 42,24	605,69 ± 85,49	855,43 ± 173,03	907,96 ± 152,49	690,90 ± 102,56
VEGF	89,26 ± 7,22	71,12 ± 8,79	88,71 ± 9,01	75,09 ± 6,16	83,64 ± 7,40	82,49 ± 4,98
Fractal- quina	121,04 ± 10,30	116,23 ± 2,11	124,30 ± 11,04	128,34 ± 12,05	128,60 ± 13,52	127,78 ± 15,05
LIX	523,86 ± 87,30	723,96 ± 75,03	609,98 ± 102,19	607,01 ± 145,57	488,83 ± 90,31	828,99 ± 214,70
MIP-2	218,47 ± 13,04	175,62 ± 5,95	215,11 ± 17,96	201,74 ± 9,66	214,99 ± 12,38	192,12 ± 5,24
TNF α	10,91 ± 0,94	8,24 ± 0,83	10,24 ± 1,34	9,36 ± 0,91	10,53 ± 0,80	8,63 ± 0,86
RAN- TES	326,21 ± 24,69	461,82 ± 17,01	398,41 ± 63,31	360,74 ± 89,67	373,90 ± 40,05	456,65 ± 51,23

Tabla 5. Citoquinas/quimioquinas plasmáticas (pg/ml) tras la I/R e influencia del AU. Los resultados están expresados como media \pm e.s.m. de animales *sham* (VEH: $n = 7$; AU: $n = 3$), I/NH (VEH: $n = 7$; AU: $n = 7$) e I/H (VEH: $n = 7$; AU: $n = 7$); * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ I/H + VEH vs. *sham* + VEH; + $P < 0.05$ I/H + VEH vs. I/NH + VEH; # $P < 0.05$, ### $P < 0.01$ VEH vs. AU mediante ANOVA de dos vías seguido del test de Bonferroni.

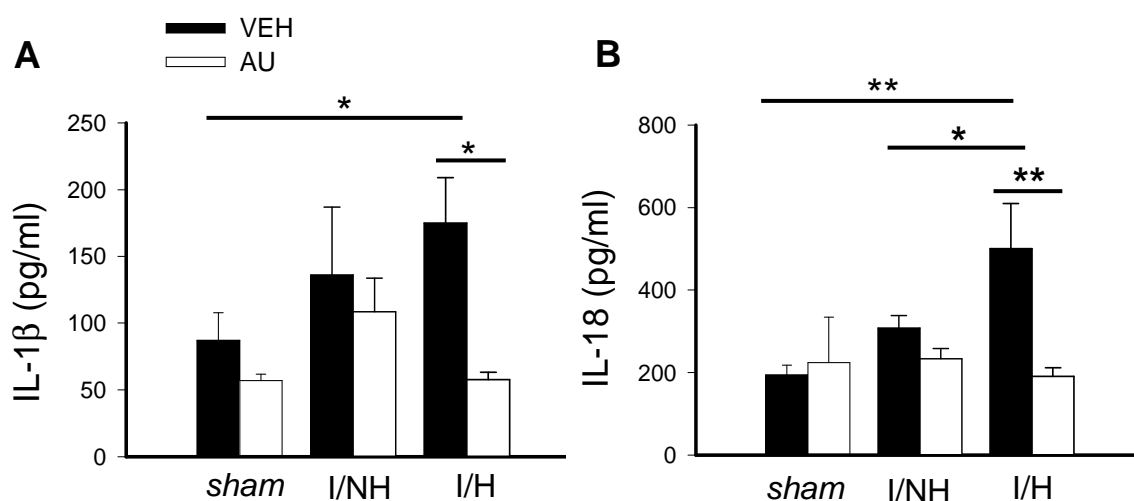


Figura 39. Niveles plasmáticos (pg/ml) de IL-1 β (A) e IL-18 (B) tras la I/R e influencia del AU. IL: interleuquina. Los resultados están expresados como media \pm e.s.m. de animales *sham* (VEH: $n = 7$; AU: $n = 3$), I/NH (VEH: $n = 7$; AU: $n = 7$) e I/H (VEH: $n = 7$; AU: $n = 7$); * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ mediante ANOVA de dos vías seguida del test de Bonferroni.

13. CAMBIOS INDUCIDOS POR I/R EN LA RESPUESTA INFLAMATORIA VASCULAR

Aunque no se detectaron cambios significativos en los niveles de ARNm de la proteína que actúa como molécula de adhesión vascular (VCAM-1) en ACM (Figura 40C) a las 24h del inicio de la I/R, sí se observó un incremento ($P < 0.05$) en la fluorescencia de dicha proteína, especialmente en la capa adventicia de la ACM ipsilateral de ratas isquémicas, independientemente de la presencia de hiperemia o del tratamiento con AU (Figura 40, A y B).

Las células CD68⁺ (monocitos y macrófagos) se detectaron en el endotelio y en la capa adventicia de la ACM, siendo especialmente abundantes en esta última (Figura 41). Los animales hiperémicos mostraron un incremento ($P <$

0.05) en el número de células CD68⁺ totales respecto al grupo *sham*, que no se modificó con la administración de AU (Figura 42A).

La expresión proteica de IL-18, detectada por inmunofluorescencia, se incrementó ($P < 0.01$) especialmente en el endotelio y en la capa adventicia de la ACM ipsilateral de los animales hiperémicos, y se previno ($P < 0.05$) con AU (Figura 41 y 42C). En presencia de HR, la ACM también mostró un incremento ($P < 0.05$) en los niveles de ARNm de IL-18 que, de nuevo, se previno ($P < 0.05$) con la administración del fármaco. En los animales no hiperémicos se observó una disminución ($P < 0.05$) de los niveles de ARNm respecto al grupo *sham*, así como un aumento ($P < 0.05$) de éstos después del tratamiento con AU (Figura 43A). Tanto los niveles de ARNm de la proteína de unión a IL-18 (IL-18 BP), neutralizante de dicha citoquina, como los de IL-1 β no se modificaron ni con la HR ni con el AU (Figura 43, B y C).

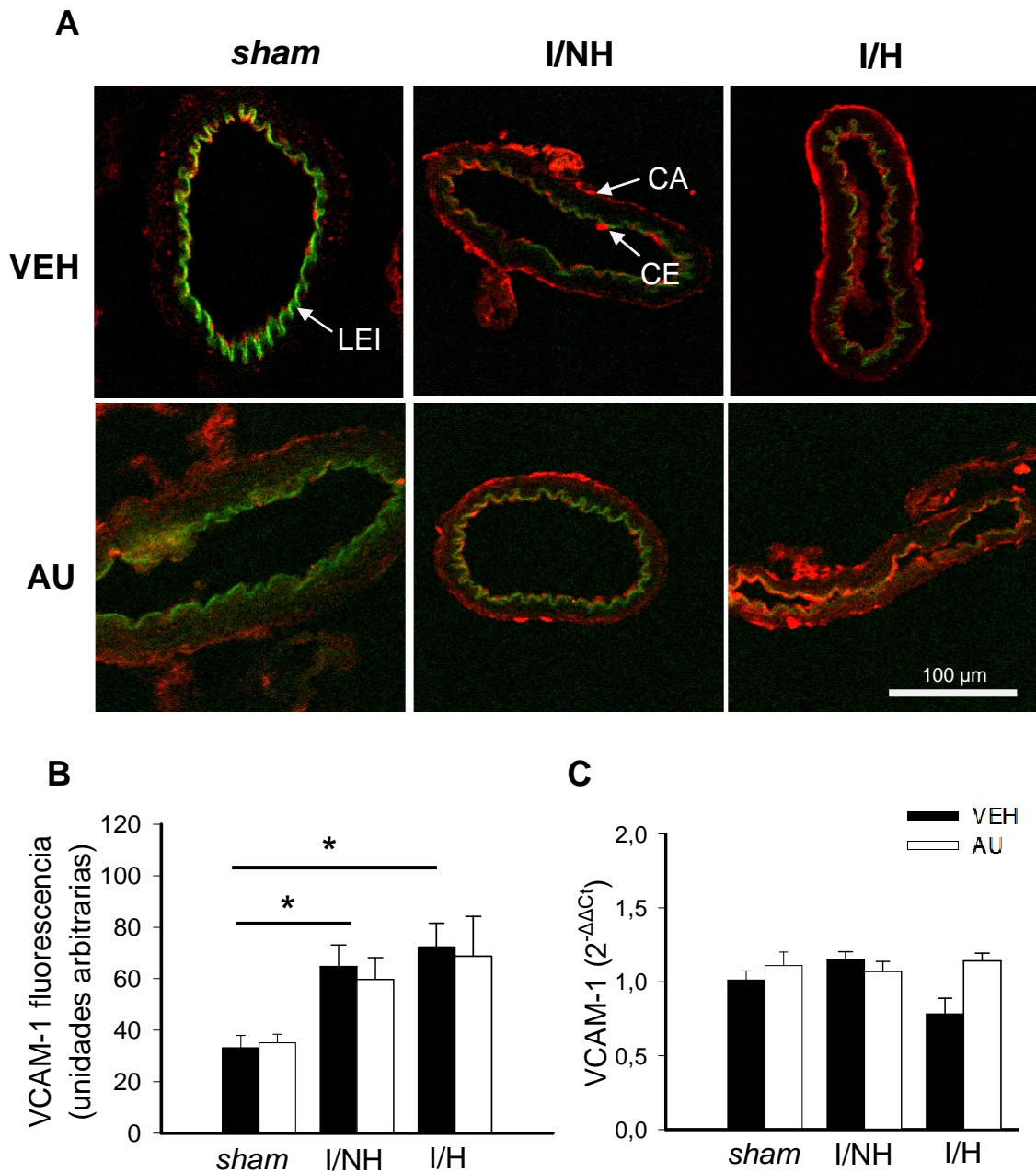


Figura 40. A: imágenes representativas, B: cuantificación de la señal fluorescente (rojo) de la molécula de adhesión vascular (VCAM-1) en secciones transversales de ACM de ratas *sham*, *I/NH* e *I/H*, tratadas con VEH y AU. CA: células adventicias; CE: células endoteliales; LEI: lámina elástica interna (autofluorescencia en verde) y C: análisis comparativo de los niveles de ARNm de VCAM-1. Los niveles de ARNm se expresaron con $2^{-\Delta\Delta Ct}$ utilizando la subunidad ribosomal 18S como control interno. Dimensiones de la imagen 238 x 238 μ m. Los resultados están expresados como media \pm e.s.m. de animales *sham* (VEH: $n = 4-7$; AU: $n = 4-5$), *I/NH* (VEH: $n = 4-6$; AU: $n = 3-4$) e *I/H* (VEH: $n = 4-5$; AU: $n = 4-5$); * $P < 0.05$ mediante ANOVA de dos vías seguido del test de Bonferroni.

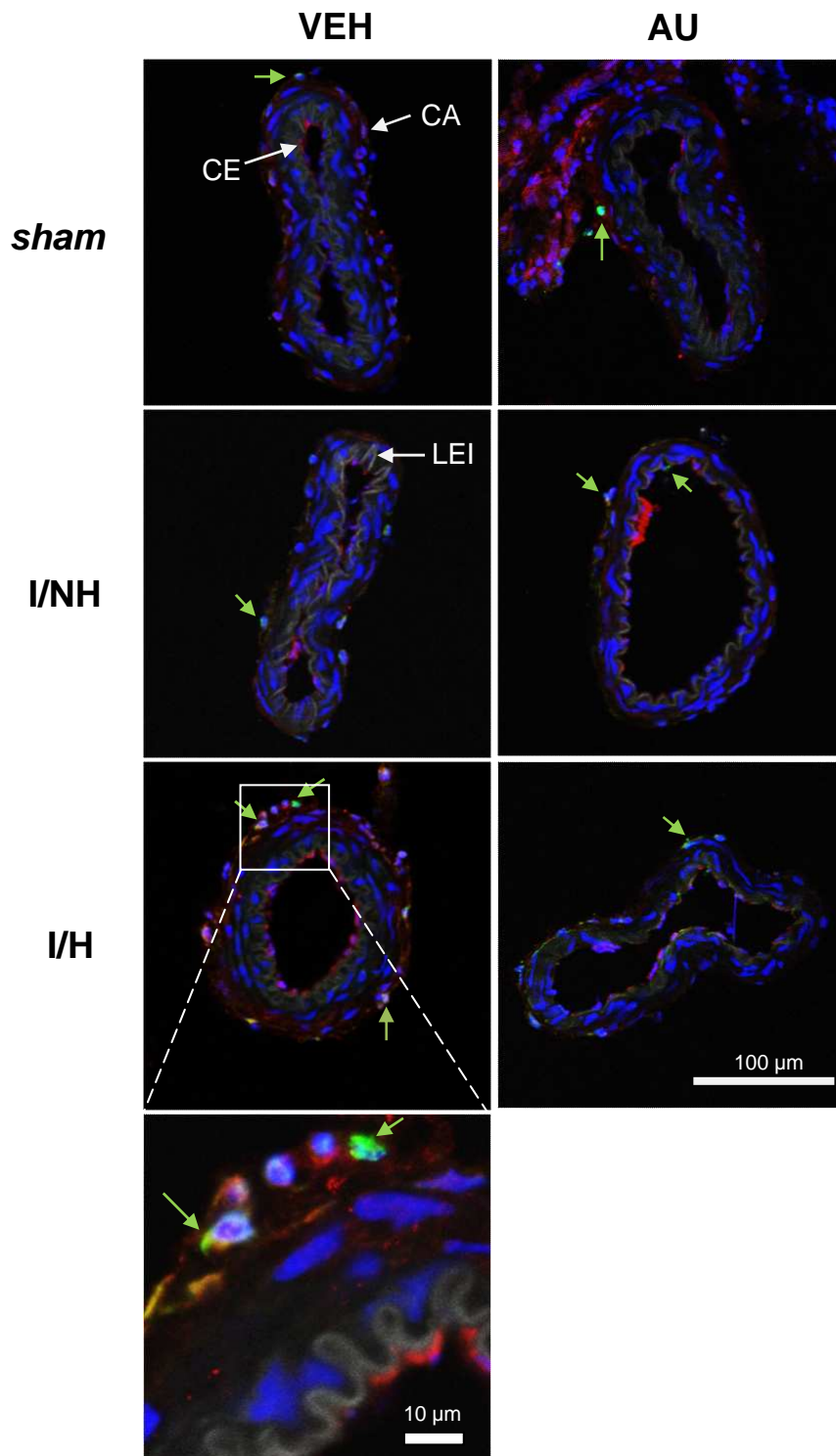


Figura 41. Imágenes representativas de la señal fluorescente de IL-18 (rojo) y del número de células CD68 positivas (CD68⁺; verde) en secciones transversales de ACM de ratas *sham*, I/NH e I/H, tratadas con VEH y AU. CA: células adventicias; CE: células endoteliales; LEI: lámina elástica interna (autofluorescencia en gris); núcleos teñidos en azul. Las flechas en verde señalan células CD68⁺. Dimensiones de la imagen 238 x 238 μm.

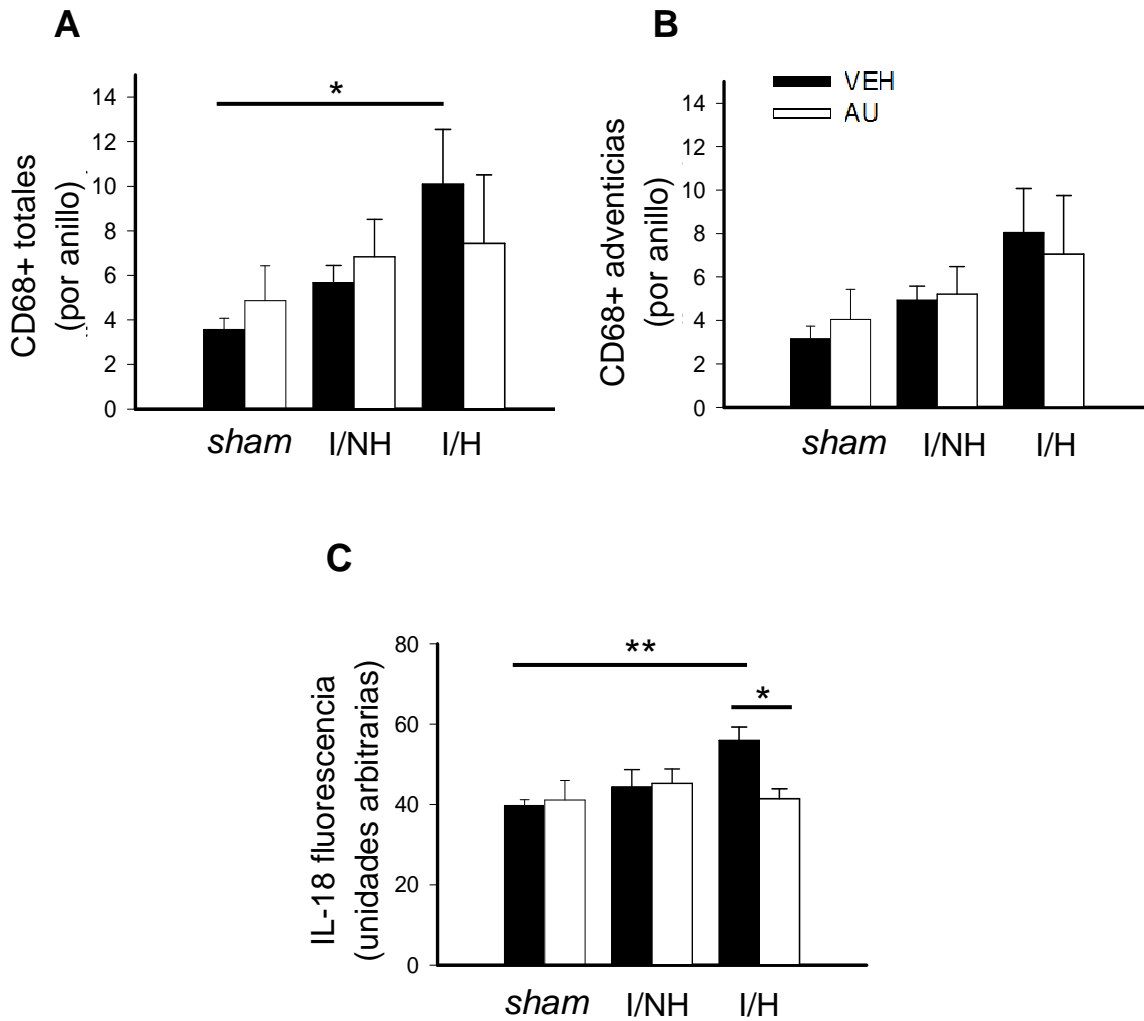


Figura 42. A y B: cuantificación del número de células CD68 positivas (CD68⁺; verde) y C: cuantificación de la señal fluorescente de IL-18 (rojo) en secciones transversales de ACM ipsilateral de ratas *sham*, *I/NH* e *I/H*, tratadas con VEH y AU. Los resultados están expresados como media \pm e.s.m. de animales *sham* (VEH: $n = 6-5$; AU: $n = 4-5$), *I/NH* (VEH: $n = 4-6$; AU: $n = 3-5$) e *I/H* (VEH: $n = 5$; AU: $n = 3-6$); * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ mediante ANOVA de dos vías seguido del test de Bonferroni.

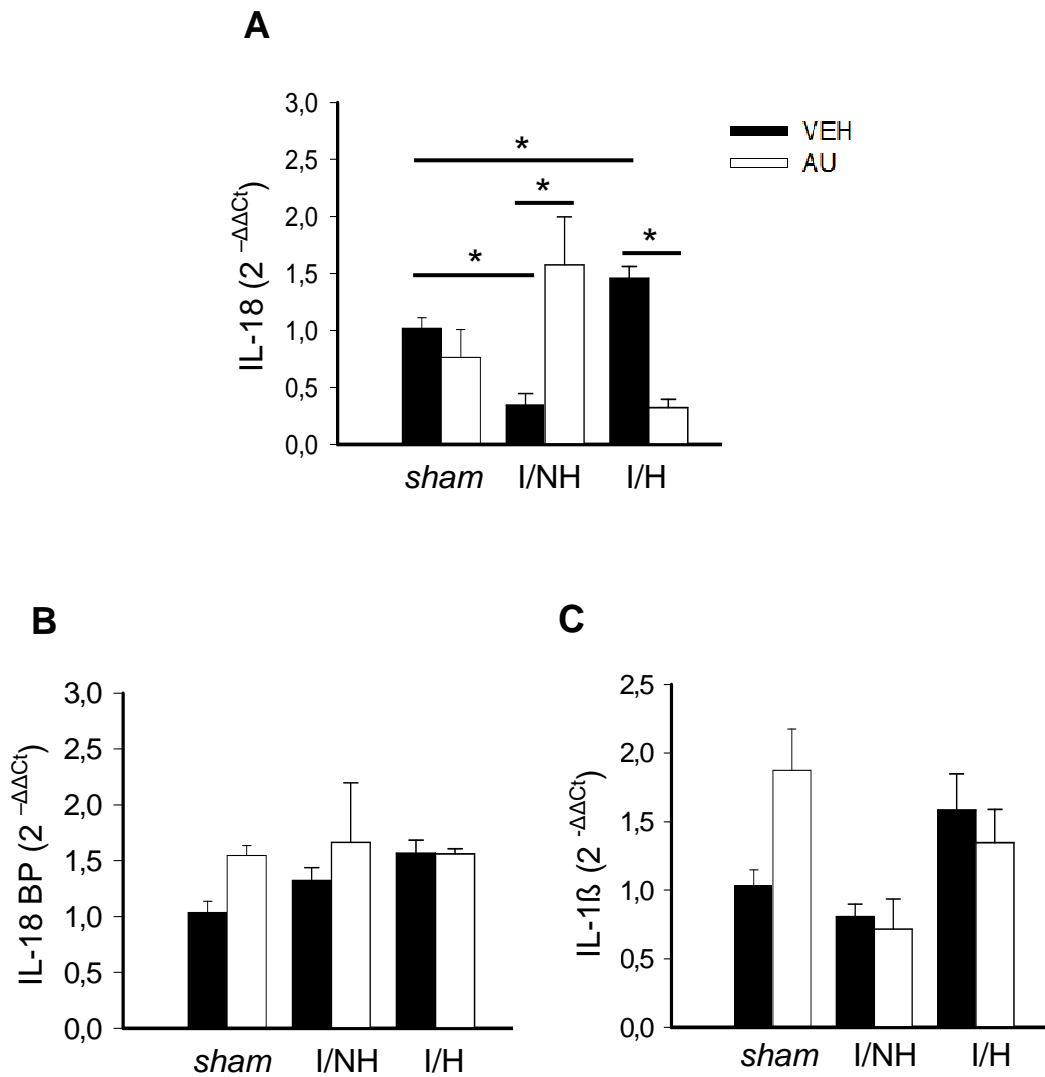


Figura 43. Análisis comparativo de los niveles de ARNm de IL-18 (A), proteína de unión a IL-18 (IL-18 BP; B) e IL-1β (C). Los niveles de ARNm se expresaron con $2^{-\Delta\Delta C_t}$ utilizando la subunidad ribosomal 18S como control interno. Los resultados están expresados como media \pm e.s.m. de animales *sham* (VEH: $n = 6-5$; AU: $n = 4-5$), I/NH (VEH: $n = 4-6$; AU: $n = 3-5$) e I/H (VEH: $n = 5$; AU: $n = 3-6$); * $P < 0.05$ mediante ANOVA de dos vías seguido del test de Bonferroni.

14. PERMEABILIDAD DEL AU EN EL PARÉNQUIMA CEREBRAL

El ensayo PAMPA-BBB es una técnica que permite evaluar *in vitro* la capacidad de distintos compuestos para atravesar, por mecanismos pasivos, la BHE. La Tabla 6 muestra la permeabilidad de la membrana lipídica artificial a diferentes compuestos comerciales y al AU, obtenida mediante esta técnica. Los catorce compuestos problema consiguieron valores de permeabilidad parecidos a los descritos en la literatura, y algunos de ellos manifestaron una penetración predictiva positiva en el sistema nervioso central. No obstante, la permeabilidad al AU fue muy baja comparada con las otras sustancias, sugiriendo que carece de capacidad para atravesar la BHE por transporte pasivo.

Para determinar si el AU es o no capaz de atravesar la BHE *in vivo*, ya sea por mecanismos pasivos y/o activos, se midieron, mediante HPLC, los niveles de AU en plasma y cerebro de ratas *sham* e isquémicas, en condiciones control y tras la I/R (Figura 44). Tanto en plasma (Figura 44B) como en cerebro (Figura 44C), los niveles endógenos de AU fueron similares en ambos grupos de animales. En cambio, los niveles plasmáticos del fármaco aumentaron ($P < 0.01$) a los 10 minutos de su administración intravenosa, retornando a los valores basales ($P < 0.05$) a los 30 minutos (Figura 44B). Sin embargo, los niveles de AU en tejido cerebral no se modificaron después de su administración (Figura 44C), sugiriendo que el AU es incapaz de penetrar hacia el parénquima cerebral.

Componente	Valor bibliográfico (10 ⁻⁶ cm/s)	Valores experimentales (10 ⁻⁶ cm/s)	Predicción SNC
Verapamilo	16.0	27.9 ± 0.94	SNC ⁺
Testosterona	17.0	24.2 ± 0.79	SNC ⁺
Costicosterona	5.1	6.7 ± 0.22	SNC ⁺
Clonidina	5.3	6.5 ± 0.22	SNC ⁺
Ofloxacina	0.8	1.0 ± 0.03	SNC ⁻
Lomefloxacina	0.0	0.8 ± 0.02	SNC ⁻
Progesterona	9.3	16.8 ± 0.56	SNC ⁺
Promazina	8.8	13.8 ± 0.46	SNC ⁺
Imipramina	13.0	12.3 ± 0.45	SNC ⁺
Hidrocortisona	1.9	1.4 ± 0.05	SNC ⁻
Piroxicam	2.5	1.9 ± 0.06	SNC ⁻
Desipramina	12.0	17.8 ± 0.50	SNC ⁺
Cimetidina	0.0	0.7 ± 0.02	SNC ⁻
Norfloxacina	0.1	0.9 ± 0.06	SNC ⁻
AU		0.2 ± 0.01	SNC⁻

Tabla 6. Valores de permeabilidad *in vitro* (10⁻⁶ cm/s) y penetración predictiva de diferentes compuestos comerciales y del AU en el sistema nervioso central (SNC) mediante el ensayo de permeabilidad con membranas artificiales que simulan la barrera hematoencefálica (PAMPA-BBB). Los resultados están expresados como media ± e.s.m. de *n* = 3 experimentos.

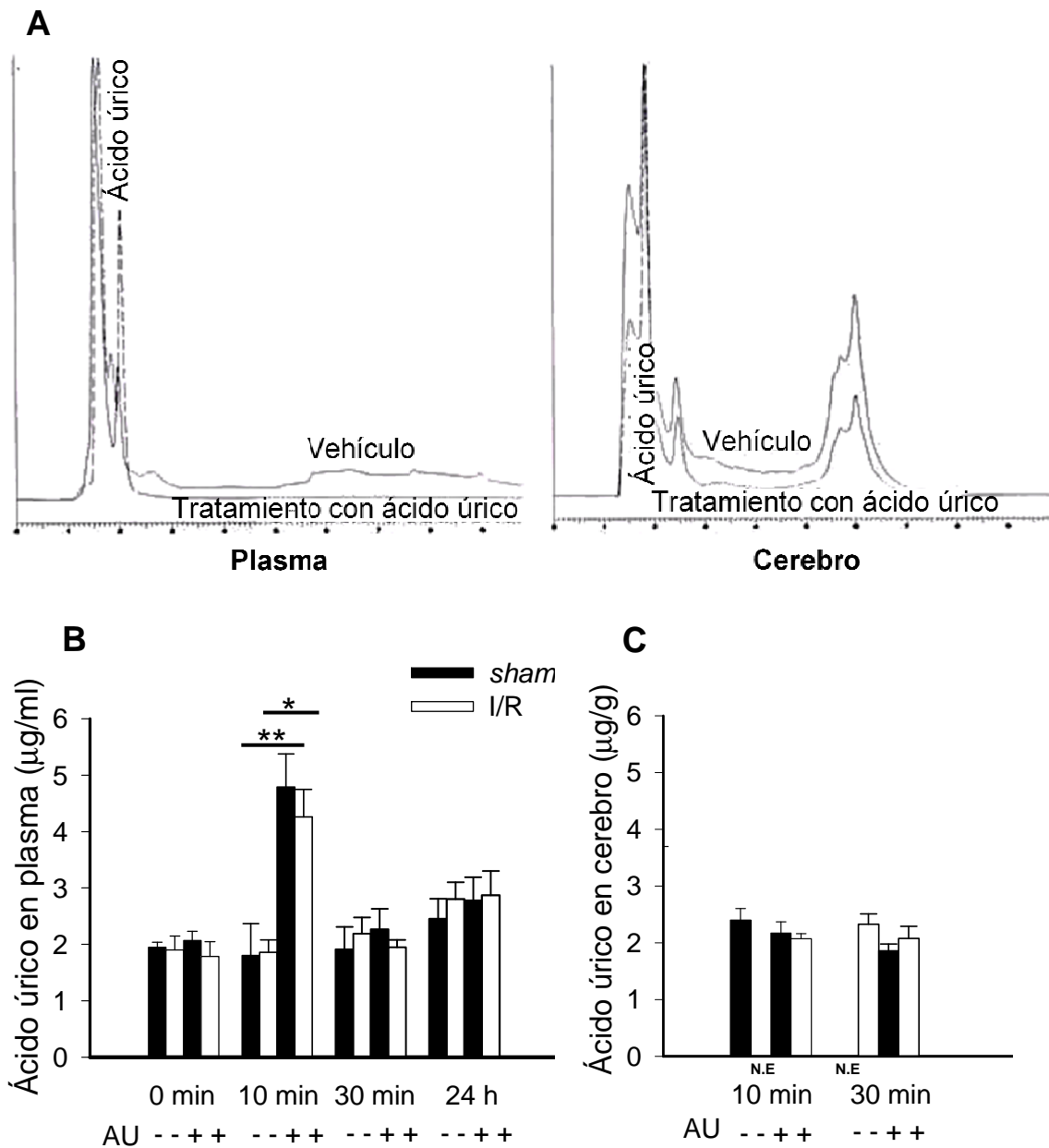


Figura 44. Detección del AU en plasma (µg/ml) y en cerebro (µg/g) de ratas *sham* e isquémicas. La concentración de AU se cuantificó por HPLC utilizando la detección ultravioleta. A: El AU eluye de la columna con un tiempo de retención de 2 minutos. El límite de detección de AU en plasma y cerebro fue de 10 ng/ml y 25 ng/g, respectivamente. B: El plasma se estudió a los 0 min (después del tratamiento), 10 min, 30 min ($n = 3-4$) y 24 h ($n = 4-5$) después de la administración intravenosa del AU. C: El cerebro se estudió a los 10 min ($n = 3-4$) y a los 30 min ($n = 4-5$). N.E, no evaluado. Los resultados se expresan como media \pm e.s.m. de animales *sham* (VEH: $n = 3-4$; AU: $n = 3-7$) e I/R (VEH: $n = 4$; AU: $n = 3-7$); * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ mediante ANOVA de dos vías seguida del test de Bonferroni.

DISCUSIÓN

El AU es un potente antioxidante endógeno que supone las dos terceras partes del poder antioxidante del plasma en humanos (Becker, 1993), y que tras su administración exógena ha mostrado efectos protectores alentadores en la isquemia cerebral (Yu y cols., 1998; Romanos y cols., 2007; Chamorro y cols., 2010). Sin embargo, hasta la fecha, únicamente un estudio ha mostrado una reducción del volumen de infarto cerebral y del daño neurológico después del tratamiento con AU administrado en un plazo clínicamente relevante (180 min después de la oclusión de la ACM; Yu y cols., 1998). Por otro lado, en estudios previos, el desarrollo de hiperemia reactiva durante el periodo de reperfusión después de un episodio de isquemia cerebral se asoció a un mayor volumen de infarto y déficit neurológico (Pérez-Asensio y cols., 2010). En este estudio confirmamos que las ratas hiperémicas sufrían infartos más severos que las que no presentaron hiperemia, y que el AU administrado a los 135 min después de la oclusión de la ACM era capaz de atenuar dicho infarto y el daño neurológico asociado. Por lo tanto, demostramos que el AU administrado exógenamente es altamente efectivo en ratas que presentan signos de HR durante la reperfusión, es decir, en aquellas ratas que padecen un mayor daño cerebral.

Varios estudios han establecido que la oclusión transitoria de la ACM aumenta el tamaño de su pared (Cipolla y cols., 1997; Jiménez-Altayó y cols., 2007; Jiménez-Altayó y cols., 2009) y, además, en uno de ellos (Cipolla y cols., 1997) se demostró que las alteraciones estructurales dependían de la presencia de reperfusión. Los resultados del presente estudio refuerzan estas

observaciones y demuestran, por primera vez, que sólo aquellos animales que experimentan HR al inicio de la reperfusión padecen un crecimiento o hipertrofia de la pared de la ACM, que a su vez se asocia con un mayor volumen de infarto y empeoramiento neurológico. Basado en dichas observaciones, proponemos que el grosor de la pared de la ACM después de la I/R se puede considerar como un indicador subrogado de la magnitud de la lesión cerebral. Asimismo, el AU previno la respuesta hipertrófica de la ACM asociada a la HR, lo que sugiere que el efecto protector del AU sobre la estructura vascular podría constituir uno de los posibles mecanismos por los cuales este fármaco consigue reducir el infarto cerebral. Además, observamos que dicho antioxidante es incapaz de penetrar al cerebro, lo que parecería indicar que gran parte de sus efectos beneficiosos pueden provenir de su acción sobre la vasculatura cerebral.

La reducción del FSC cortical durante la isquemia fue similar en todos los grupos estudiados, de manera que la HR no fue atribuible a una caída más severa del FSC durante el periodo isquémico, como también se observó en estudios previos (Pérez-Asensio y cols., 2010). No obstante, en animales hiperémicos, además de un mayor infarto cortical, también observamos un incremento del volumen de infarto subcortical, de manera que no podemos descartar que la HR esté relacionada con una mayor reducción de FSC en el núcleo del infarto durante la isquemia, a pesar de que el láser Doppler utilizado sólo registrase medidas del FSC en una zona cortical superficial. En estudios previos, se ha propuesto que la HR está relacionada con una mayor producción de NO (Humphreys y Koss, 1998; Jiang y cols., 2014). En el presente estudio, no encontramos cambios en la expresión proteica de la NOS en ACM. Aun así,

no podemos excluir un aumento en la activación de la NOS asociado a la hiperemia, ya que los niveles de nitritos circulantes fueron más elevados en ratas hiperémicas, sugiriendo un incremento en la producción de NO circulante. Además de inducir vasorrelajación, el NO puede ejercer su actividad protectora barriendo los O_2^- . Sin embargo, el producto de la reacción entre el NO y el O_2^- da lugar a $ONOO^-$, una molécula altamente reactiva que provoca la oxidación y nitrosilación de las proteínas (Pacher y cols., 2007). La mayor nitrosilación proteica que se observó en la pared de la ACM y en el tejido cerebral de ratas hiperémicas concuerda con el estudio de Pérez-Asensio y cols. (2010), que sugirió una asociación entre la presencia de HR y una mayor nitrosilación de las proteínas del parénquima cerebral.

Tras un episodio de I/R, el empeoramiento de la respuesta miogénica de las arterias cerebrales se considera un factor muy importante implicado en la desregulación funcional del FSC (Coucha y cols., 2013), ya que puede desencadenar la aparición de hemorragias y de edema cerebral. Estudios anteriores en ACM de rata describieron la existencia de un umbral en la duración de la oclusión (Cipolla y cols., 2001) y de la reperusión (Cipolla y Curry, 2002), a partir del cual las respuestas miogénicas empeoraban. De acuerdo con estas evidencias, en el presente estudio mostramos que las alteraciones miogénicas no dependen del grado en que aumenta el FSC en la reperusión, ya que tanto en presencia como en ausencia de hiperemia se observó una alteración del tono miogénico comparado con el grupo *sham*. Se ha propuesto que uno de los mecanismos implicados en la pérdida del tono miogénico en arterias cerebrales es la pérdida de filamentos de actina de las CML, que podría ser debida, entre otros factores, a alteraciones durante la

isquemia en la disponibilidad de ATP, nucleótido necesario para la polimerización de la actina (Carrier, 1991), o a la inducción de la nitrosilación de proteínas mediada por el ONOO^- , que conduce a la pérdida posterior de F-actina de las CML (Cipolla y cols., 2001; Cipolla y Curry, 2002; Maneen y cols., 2006; Manen y Cipolla 2007; Coucha y cols., 2013; Palomares y Cipolla, 2014). No obstante, en el presente estudio el tono miogénico de la ACM se encontraba empeorado a las 24 h del inicio de la reperfusión, independientemente del grado de nitrosilación proteica que presentara la arteria o el tejido cerebral. Además, y de manera similar a los resultados obtenidos en ratas isquémicas tratadas con otro antioxidante de origen sintético (Jiménez-Altayó y cols., 2009), la administración de AU en ratas hiperémicas consiguió reducir la nitrosilación sin restaurar el empeoramiento miogénico. Dichos resultados difieren de los obtenidos por Coucha y cols. (2013), en los que el tratamiento con FeTPPS, catalizador de la descomposición de ONOO^- , o con epicatequina, inhibidor de la oxidación/nitrosilación, administrados a los 75 min tras la oclusión, fue capaz de prevenir el empeoramiento del tono miogénico. Por lo tanto, podemos sugerir que el tono miogénico de la ACM podría sufrir un deterioro duradero o irreversible debido a la producción temprana de ONOO^- que no podría combatirse con tratamientos administrados después de 2 horas de haberse iniciado la isquemia.

La mejora de la perfusión cerebral es esencial para prevenir la muerte neuronal después de un ictus isquémico. La administración de AU se asoció a una expansión, en condiciones pasivas tras 24 h de reperfusión, del diámetro interno de la ACM de ratas hiperémicas. Se ha descrito que la nitrosilación del AU por parte del ONOO^- puede formar un producto capaz de liberar NO

(Skinner y cols., 1998). A pesar de que en ratas hiperémicas tratadas con AU los niveles circulantes de nitritos, eran bajos, no podemos descartar que durante la reperfusión la nitrosilación del AU forme un derivado con capacidad de aumentar el flujo sanguíneo cerebral, lo que podría contribuir a explicar la expansión del diámetro interno por un fenómeno de tensión tangencial (Vessières y cols., 2012). Asimismo, es posible que la expansión luminal de la ACM inducida por el AU contribuyera a evitar la hipoperfusión secundaria que podría acontecer después de la HR (Traupe H y cols., 1982).

En respuesta a estímulos de estrés biológico, como pudiera ser un exceso en la distensión del vaso sanguíneo o una situación de hipoxia, las células vasculares adventicias experimentan, entre otros, un incremento en la expresión de proteínas de adhesión, la secreción de citoquinas/quimiocinas, y proliferación celular (Stenmark y cols., 2013). Estudios anteriores han descrito aumentos en el número de CA (hiperplasia) en la ACM de ratas sometidas a I/R (Jiménez-Altayó y cols., 2007), mecanismo que podría explicar el aumento del diámetro externo y, en consecuencia, del grosor de la pared. En el presente estudio confirmamos esos resultados y demostramos que dicho incremento en el número de CA, a la vez asociado al aumento del diámetro externo de la ACM, está ligado a la presencia de HR. La capa adventicia de las arterias está considerada una fuente importante de RONS, principalmente a través de la vía de la NADPH oxidasa (Stenmark y cols., 2013). En estudios previos, se ha sugerido una relación entre la presencia de hipertrofia de la pared arterial y la mayor producción de RONS en ACM de rata (Baumbach y cols., 2006; Jiménez-Altayó y cols., 2009). En el presente estudio, aunque detectamos aumentos similares en la formación de $O_2^{\cdot -}$ inducidos por la I/R, las ratas

hiperémicas mostraron niveles más elevados de ARNm para las subunidades p22^{phox} y gp91^{phox} de la NADPH oxidasa y mayor nitrosilación de proteínas, en comparación con las ratas no hiperémicas, lo que sugiere que la HR está asociada a niveles más altos de estrés oxidativo/nitrosativo en la pared de la ACM. El tratamiento con AU disminuyó la producción de ONOO⁻, la activación de ERK1/2, y la proliferación de CA asociada a la hiperemia, sugiriendo así un papel fundamental del estrés oxidativo/nitrosativo en dichos procesos. Es bien conocido que la producción de RONS por parte de los fibroblastos de la capa adventicia puede promover el reclutamiento de células inflamatorias (Pires y cols., 2013; Stenmark y cols., 2013), que a su vez pueden generar más RONS, magnificando así el impacto del estrés oxidativo/nitrosativo (Stenmark y cols., 2013). La HR se asoció a una mayor presencia de células CD68⁺ (monocitos/macrófagos) principalmente en la adventicia de la ACM, sugiriendo que el aumento de estrés oxidativo/nitrosativo localizado en la adventicia de las arterias hiperémicas podría estar implicado en el reclutamiento de monocitos/macrófagos o viceversa.

La I/R cerebral desencadena una respuesta inflamatoria que contribuye a exacerbar el daño cerebral. El inicio de dicha respuesta podría implicar la activación del complejo multiproteico llamado “inflammasoma”, que permite la liberación de distintas citoquinas inflamatorias (Walsh y cols., 2014). En el presente trabajo detectamos que en presencia de HR se incrementaban los niveles circulantes de IL-1 β e IL-18 a las 24 h de reperusión, en comparación con el grupo *sham*, que volvieron a los niveles basales tras la administración de AU. La expresión de IL-18 también se vio aumentada en la pared de la ACM y el tratamiento con AU, de nuevo, previno éste aumento. En conjunto, estos

resultados relacionan la HR con una acumulación de IL-18 a nivel cerebrovascular, lo que apuntaría a un posible papel de esta citoquina en la inflamación temprana de la vasculatura cerebral. No obstante, y a diferencia de lo obtenido en el presente estudio, se ha descrito un incremento de los niveles plasmáticos de IL-8, IL-6, IL-10, TNF- α y TGF- β asociado a la I/R, lo que sugeriría que estas otras citoquinas también podrían jugar un papel relevante en isquemia cerebral (Emsley y cols., 2008; Pérez-Asensio y cols., 2010).