

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I



**MECANISMOS DE NEUROPROTECCIÓN POR ÁCIDO
ACETILSALICÍLICO**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR**

Javier de Cristóbal Blanco

Bajo la dirección de los Doctores:

María Ángeles Moro
Juan Carlos Leza Cerro

Madrid, 2001

ISBN: 84-669-1819-1

Universidad Complutense de Madrid
Facultad de Ciencias Químicas
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I



“Mecanismos de neuroprotección por ácido acetilsalicílico”.

Javier de Cristóbal Blanco

2002

Universidad Complutense de Madrid
Facultad de Ciencias Químicas
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I



“Mecanismos de neuroprotección por ácido acetilsalicílico”.

Memoria que presenta el licenciado Javier de Cristóbal Blanco para aspirar al Grado de Doctor.

Directores:

Dra. María Ángeles Moro.

Dr. Juan Carlos Leza.

Tutor:

Dr. Antonio Tormo.

A mis padres y mi hermano,

Al resto de mi familia.

A Puy.

Agradecimientos

En primer lugar, quisiera expresar mi mas sincero agradecimiento al Doctor Pedro Lorenzo por hacerme tan fácil la estancia durante estos casi cinco años en su grupo de investigación.

Al departamento de Bioquímica y Biología Celular I de la Facultad de Ciencias Químicas, y en especial al Doctor Antonio Tormo, del que sólo he obtenido facilidades para la realización de esta Tesis.

Muchas gracias a la Doctora María Ángeles Moro, al Doctor Juan Carlos Leza y al Doctor Ignacio Lizasoain, porque realmente han sido tres los directores que han hecho posible este Trabajo de Investigación. Espero que el tiempo y vuestros conocimientos empleados en mi formación científica y personal se vea reflejado en el futuro. También dar las gracias a la Doctora Paz Fernández-Tomé, que tan amable y gustosamente me enseñó la técnica del cultivo celular de neuronas corticales. Muchas gracias.

Agradecerles a todos mis compañeros todo lo que han hecho por mí. Al primero que me gustaría citar es a Luis Menchén, con el que tengo la suerte de contar entre mis amigos desde que estábamos en el colegio (hace casi 15 años) y al que tengo que agradecer el haber podido realizar esta Tesis Doctoral. A mis compañeros actuales (Antonio, Olivia, Pepe y Cristina), por los buenos ratos que hemos compartido y de los que tanto he aprendido. A Arturo y Gustavo, con los que tan agradables momentos he pasado. También a los que han coincidido conmigo en este grupo y entre los que destaco al Doctor Jorge De Alba, que tanta paciencia tuvo al inicio de esta Tesis.

A los becarios (antiguos y actuales) del departamento de Farmacología (Jorge, Verónica, Esther, Mariu,..., sé que me dejo muchos), que siempre han estado ahí y con los que siempre he podido contar para todo. También al resto de los investigadores del departamento de los que tan buen trato he recibido.

A Q.F.Bayer España, y muy especialmente a la Doctora Gloria Pueyo, por haber hecho todo lo posible para la realización de este proyecto.

A los Doctores José Castillo y Antoni Dávalos, y al grupo de Bioinvestigación de los laboratorios Merck en Barcelona, que no pusieron ningún reparo en permitirme y enseñarme una técnica tan innovadora para nuestro grupo como era la oclusión de la arteria media cerebral. Al Doctor Lisardo Boscá, por sus certeros consejos científicos.

A M^a Elena por ayudarme a solucionar los problemas de la burocracia académica.

A María Luisa, Manolo, Fernando y Mari por el esfuerzo diario para que todo estuviese preparado al comenzar los experimentos. Al personal del ANUC, en especial a la Doctora Pilar Bringas, a Oscar y a Manolo, que siempre han hecho lo posible para que estuviesen disponibles todos los animales que han sido la parte insustituible de esta Tesis.

A todos los que de una forma u otra han hecho posible que yo haya llegado hasta aquí. En especial a mis amigos...

Muchas Gracias a todos.

Madrid, 27 de Noviembre de 2.001

Abreviaturas.

- ❖ AAE – Aminoácidos excitadores.
- ❖ ADAMs – Metaloproteasa y desintegrina (A desintegrin and metalloproteinase).
- ❖ ADP – Adenosina difosfato.
- ❖ AINEs – AntiInflamatorios no esteroideos.
- ❖ AMPA – Ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico.
- ❖ ASP – Aspartato.
- ❖ ATP – Adenosina trifosfato.
- ❖ BDNF – Factor neutrófico derivado del cerebro (Brain-Derived Neurotrophic Factor).
- ❖ COX-1 – Ciclooxigenasa tipo 1.
- ❖ COX-2 – Ciclooxigenasa tipo 2.
- ❖ DNA – Ácido desoxiribonucleico.
- ❖ EAAC – Transportador de aminoácidos excitadores (Excitatory aminoacid carrier).
- ❖ EAAT – Transportador de aminoácidos excitadores (Excitatory aminoacid transporter).
- ❖ EDTA – Ácido etilen-diamino-tetraacético.
- ❖ EGTA – Ácido etilenglicol *bis* (β -aminoetileter)-N,N'-tetraacético.
- ❖ ELAM-1 - Molécula de adhesión endotelial-1 (Endothelial cell adhesion molecule).
- ❖ FADH₂ – Dinucleótido reducido de flavina y adenina.
- ❖ FMN – Mononucleótido de flavina.
- ❖ GFAP – Proteína fibrilar glial ácida (Glial fibrillary acidic protein).
- ❖ GLAST – Transportador de glutamato y aspartato (Glutamate and Aspartic Transporter).
- ❖ GLT-1 – Transportador de glutamato (Glutamate transporter).
- ❖ GLU – Glutamato.
- ❖ HIF-1 - Factor-1 inducible por hipoxia (Hypoxia-inducible factor 1).
- ❖ HSP - Proteínas de choque térmico (Heat-shock proteins).
- ❖ ICAM-1 - (Molécula de adhesión intercelular-1 (Intercellular adhesion molecule-1).
- ❖ IL-1 β - Interleuquina 1 β .
- ❖ IL-6 – Interleuquina 6.
- ❖ iNOS – Oxído nítrico sintasa inducible.
- ❖ IRF1 - Factor-1 regulador del interferón (Interferon regulatory factor-1).
- ❖ LDH – Lactato deshidrogenasa.
- ❖ MCAO – Oclusión de la arteria media cerebral (Middle cerebral artery occlusion).
- ❖ MMP - Metaloproteasas de matriz.

- ❖ MTT - Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio.
- ❖ NAD⁺ - Dinucleótido oxidado de nicotina y adenina.
- ❖ NADH – Dinucleótido reducido de nicotina y adenina.
- ❖ NF-κB – Factor nuclear κB.
- ❖ NGF - Factor de crecimiento nervioso (Nerve growth factor).
- ❖ NMDA – N-metil-D-aspartato.
- ❖ NSE – Enolasa neuronal específica.
- ❖ PBS – Solución buffer fosfato.
- ❖ PDTTC – Pirrolidinditiocarbamato.
- ❖ PI – Ioduro de propidio (Propidium iodide).
- ❖ POG – Privación de oxígeno y glucosa.
- ❖ SNC – Sistema nervioso central.
- ❖ RNAm – Ácido ribonucleico mensajero.
- ❖ TACE/ADAM17 – Enzima convertidora de TNF-α (TNF-α converting enzyme).
- ❖ TGF-β - Factor transformante de crecimiento-β (Transforming growth factor).
- ❖ TIMP-1 – Inhibidor tisular de metaloproteasa-1 (Tissue inhibitor of metalloproteinase).
- ❖ TNF-α – Factor de necrosis tumoral.
- ❖ TTC – Cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolio (2,3,5-triphenyltetrazolium chloride).
- ❖ VEGF - Factor vascular de crecimiento endotelial (Vascular endothelial growth factor).

Introducción 1.

1. Enfermedad cerebro vascular. 2.

1.i. Definición y origen del término.

1.ii. Epidemiología y factores de riesgo.

1.iii. Clasificación.

1.iv. Síntomas clínicos.

1.v. Diagnóstico.

1. vi. Tratamiento.

2. Fisiopatogenia de la enfermedad cerebrovascular. 13.

2.1. Eventos celulares.

2.1.a. Fallo energético.

2.1.b. Liberación de aminoácidos excitadores. Excitotoxicidad inducida por glutamato.

2.1.c. Sobrecarga de calcio.

2.1.d. Acidosis.

2.1.e. Daño oxidativo.

2.2. Cambios moleculares.

2. 2. a. 1ª “onda”: genes de expresión temprana.

2. 2. b. 2ª “onda”: proteínas de choque térmico (-heat shock proteins- HSP).

2. 2. c. 3ª “onda”: mediadores pro-inflamatorios.

2. 2. d. 4ª “onda”: enzimas proteolíticas de matriz.

2. 2. e. 5ª “onda”: factores de remodelación.

3. Origen del ATP cerebral. 22.

Cadena respiratoria mitocondrial (fosforilación oxidativa).

4. Glutamato. 29.

4.i. Funcionamiento y tipo de transportadores de glutamato.

4.ii. Características del recaptador de glutamato sodio-dependiente.

4.iii. Liberación.

Hipótesis y objetivos. 36.

Material y métodos 39.

I. Preparaciones. 40.

I.1. Modelos de isquemia.

I.1.1. *In vitro*. Cultivos celulares sometidos a POG.

I.1.2. *In vivo*. Oclusión de la arteria media cerebral.

I.2. Otras preparaciones.

II. Determinaciones. 47.

II.1. Parámetros de viabilidad.

II.1.1 MCAO.

II.1.2. Cultivos celulares.

II.2. Medida de liberación y recaptación de glutamato.

II.3. Determinaciones mitocondriales.

II.4. Otras determinaciones.

III. Protocolo experimental. 53.

III.1. Cultivos celulares.

III.2. Mitocondrias y partículas submitocondriales.

III.3. Animal entero.

IV. Análisis estadístico. 62.

V. Fármacos empleados. 62.

Resultados. 66.

A. In vitro: cultivos celulares.

B. Mitocondrias y partículas submitocondriales.

C. Animal entero.

Discusión. 75.

Muerte celular y liberación de glutamato. Neuroprotección por aspirina *in vitro*.

Mecanismos implicados en la inhibición de la liberación de glutamato.

Muerte celular y liberación de glutamato. Neuroprotección por aspirina *in vivo*.

Conclusiones. 83.

Bibliografía. 85.

Introducción.

Material y métodos.

Resultados.

Discusión.

Conclusiones.

Bibliografía.

Introducción.

1. Enfermedad cerebrovascular (e.c.v.).

i) Definición y origen del término.

En el tejido cerebral, la isquemia se produce como consecuencia de un coágulo que interrumpe un vaso (infarto isquémico; i.i.), o cuando este se rompe (infarto hemorrágico; i.h.). En cualquier caso se va a producir la interrupción del flujo sanguíneo a una región del cerebro. Cuando esto sucede, las células de esa zona mueren en poco tiempo. Otro término que se empleará en esta Tesis es el de ictus, que representa de forma genérica un grupo de trastornos que incluyen el infarto isquémico, el infarto hemorrágico y la hemorragia subaracnoidea. Ictus proviene del latín *ictus-us* y significa golpe. Su sinónimo inglés es *stroke*.

La muerte celular induce la liberación de unos mediadores químicos que disparan lo que se llama cascada isquémica. Esta cascada puede afectar células que estén más allá del núcleo isquémico, en la penumbra, donde el flujo sanguíneo está comprometido pero no interrumpido. Sin tratamiento alguno, estas células de la región anexa al núcleo, mueren también.

Cuando se produce un infarto isquémico cerebral, con la consecuente muerte celular, se pierde el control de las habilidades que corresponden a esa región. Esto puede producir problemas en el habla, la memoria o el movimiento. La gravedad de las consecuencias dependerá de la zona afectada y del tamaño del infarto. Un pequeño i.i. puede ocasionar consecuencias menores como debilidad en una extremidad, mientras que un i.i. grave puede dejar a una persona con una ausencia total de movimientos o con pérdidas en el habla.

El término de *infarto isquémico* fue acuñado por primera vez por los neurólogos canadienses Vladimir C. Hachinski y John Norris. A principio de la década de los noventa, la NSA (Asociación Nacional de Ictus de Estados Unidos; National Stroke Association) empieza a utilizar este término, ya que es más descriptivo y realista que la palabra *stroke*. Con esto se trata de dar una verdadera dimensión a esta situación y así intentar concienciar a los especialistas y a los pacientes de que el tratamiento inmediato

de la e.c.v. es crucial. Cada minuto perdido hace que la ventana de actuación sea menor y que el daño sea cada vez mayor.

ii) Epidemiología y factores de riesgo.

Es la segunda causa, la primera en el caso concreto de las mujeres, de muerte en los países desarrollados tras el cáncer. El principal problema es la poca educación respecto a los síntomas y el tiempo que se pierde hasta que se actúa.

En el último estudio realizado, España se situaba a mediados de la década de los 90 en el tercio inferior de países con menor número de fallecimientos por ictus. En concreto se situaba entre Holanda y Reino Unido, con 71,5 por cada 1000 habitantes. Estados Unidos es el país con la menor tasa (47,3 por cada 1000 habitantes), aunque la desinformación sigue siendo el mayor problema. Un estudio realizado por la Universidad de Cincinnati determina que más de la mitad de los pacientes, en concreto el 52%, que sufrieron un ataque cerebral no fueron advertidos de ello. Según un estudio de la NSA en 1.996, un 17% de los adultos con más de 50 años no podían decir un solo síntoma de un ataque cerebral. Pero el factor más importante es el tiempo desde que ocurre el infarto hasta que se presenta el paciente en urgencias. En algunos estudios realizados (Alberts *et al.*, 1990), se determinó que el 58% de los pacientes que sufrían un ataque cerebral no acudían al médico hasta después de 24 horas o más desde que el comienzo del ictus. En concreto parece que el tiempo medio de asistencia a un paciente está en unas 13 horas desde el comienzo del ataque.

Los factores de riesgo se pueden clasificar en controlables o incontrolables. Tener un factor de riesgo incontrolable no implica que se vaya a sufrir un ictus irremediamente. Con una buena prevención sobre los controlables se reduce más que notablemente el impacto de los incontrolables. Dentro de los factores incontrolables podemos encontrar:

- *Edad.* La probabilidad de padecerlo aumenta con la edad. Dos terceras partes de los ictus ocurren a partir de los 65 años. Cada década de años desde los 55 aumenta al doble la probabilidad.
- *Sexo.* Los hombres tienen un riesgo mayor que las mujeres.
- *Raza.* Los afroamericanos son la etnia con más riesgo de padecerlo.
- *Antecedentes familiares.* El riesgo es algo mayor en los descendientes.

- *Diabetes.* Las personas diabéticas tienen mayor riesgo que las no diabéticas. Además el daño cerebral puede ser mayor si los niveles de glucosa están elevados.

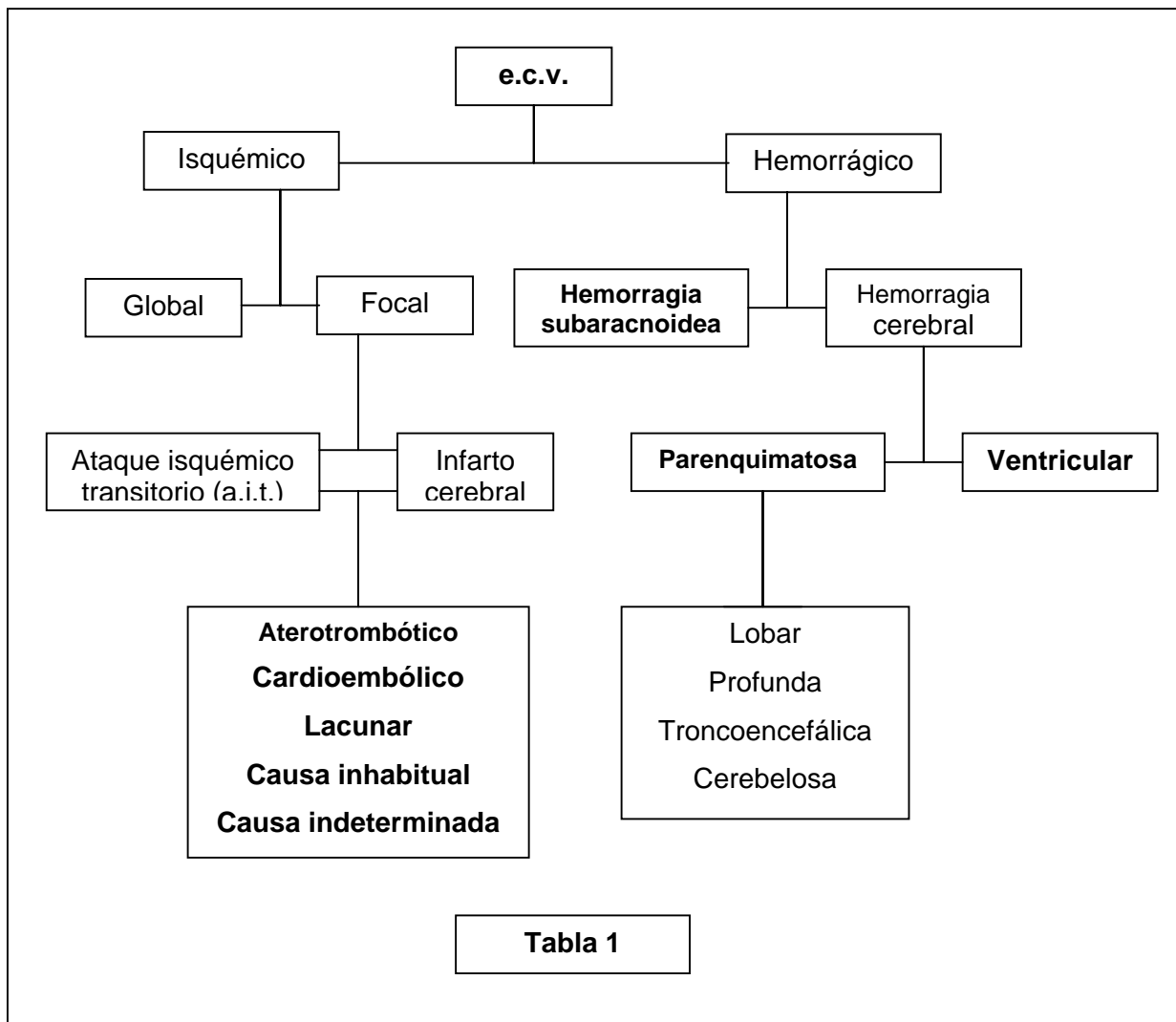
Como se ha dicho antes, hay también una serie de factores controlables que pueden hacer que la posibilidad de sufrir esta enfermedad disminuya mucho. Algunos de estos factores tienen que ver con el estilo de vida (dieta, tabaco, alcohol,...). Los más importantes son:

- *Presión sanguínea elevada.* La hipertensión incrementa de cuatro a seis veces el riesgo. Es el factor de riesgo controlable más importante y el problema es que es una condición relativamente común, que afecta a cerca de un tercio de la población adulta. Entre un 40 y un 90% de los pacientes tienen la presión sanguínea elevada (> 140/90).
- *Enfermedades cardíacas.* Dentro de ellas hay que destacar la fibrilación auricular. Puede aumentar el riesgo entre cuatro y seis veces. El latido arrítmico de la aurícula izquierda permite que se almacene sangre en el corazón que podrá formar coágulos que luego serán arrastrados hasta el cerebro. La prevalencia de fibrilación auricular se incrementa con la edad, y así, el 36% de las personas mayores de 80 años que padecieron un ictus fue provocado por fibrilación auricular.
- *Colesterol elevado.* El colesterol puede incrementar el riesgo de ictus, ya que puede producir la liberación de algunos coágulos por ocasionar aterosclerosis.
- *Alteraciones respiratorias en el sueño.* Se ha observado que la apnea en el sueño produce unos niveles de oxígeno muy bajos en la sangre, así como unos niveles de dióxido de carbono muy elevados que pueden ocasionar coágulos.
- *Antecedentes personales.* Personas que han sufrido un ictus tienen un riesgo más elevado de padecer otro. Un 42% de los hombres y un 24% de las mujeres que tuvieron un ictus tienen un porcentaje mayor de volverlo a sufrir en los siguientes cinco años.
- *Tabaco, alcohol y sobrepeso.* Estos tres factores hacen que el corazón y el sistema circulatorio estén más dañados, por lo que el riesgo es mayor. Sólo el tabaco puede hacer que el riesgo se duplique.

iii) Clasificación.

La e.c.v. se puede clasificar en dos grandes grupos, de origen isquémico y de origen hemorrágico (Tabla 1). La mayor parte de los infartos cerebrales se pueden considerar como isquémicos, en torno a un 85%, y sólo un 15% pertenecerían a los hemorrágicos.

Dentro de los isquémicos podemos hacer una subdivisión según la disminución del aporte sanguíneo cerebral total (isquemia global) o parcial (isquemia focal). Según la duración del proceso podrá ser ataque isquémico transitorio (a.i.t.) o infarto cerebral, si no remite a las 24 horas. Entre los infartos hemorrágicos se encuentran los que se producen en el parénquima o en el interior de los ventrículos (hemorragia cerebral) o en el espacio subaracnoideo (hemorragia subaracnoidea).



El infarto **aterotrombótico (25-30%)** es un infarto de tamaño grande o mediano, con localización cortical o subcortical. Se produce por una oclusión o estenosis de una arteria de mediano o gran calibre. El infarto **cardioembólico (20%)** se produce por la oclusión de una arteria por un émbolo de origen cardiaco. Tienen una localización cortical. El infarto **lacunar (15-20%)** es un infarto de pequeño tamaño, localizado en el territorio de distribución de las arterias perforantes cerebrales. Ocasiona un síndrome lacunar, hemiparesia motora pura, síndrome sensitivo puro, hemiparesia-ataxia o un síndrome sensitivo-motor. El infarto de **causa inusual (5-15%)** es aquel en el que, tras el diagnóstico, no se puede asignar a ningún grupo de los anteriores. El infarto de **causa indeterminada (15-35%)** se clasifica de esta forma tras descartarse el que se pueda incluir en otro grupo. Afectan al territorio carotídeo o vertebrobasilar.

El e.c.v. calificado como **hemorragia parenquimatosa** se produce por una rotura vascular espontánea, que se sitúa en el interior del parénquima encefálico. Se subclasifica como primaria cuando la rotura de la pared vascular es a consecuencia de arteriosclerosis o la hipertensión arterial.

La **hemorragia ventricular** se considera como tal al encontrar sangre en el interior de los ventrículos. Es primaria cuando sólo hay sangre en esta estructura y secundaria cuando se produce en el parénquima y se extiende hasta el sistema ventricular.

La **hemorragia subaracnoidea** es la extravasación de sangre al espacio subaracnoideo, bien directamente (primaria) o cuando el sangrado empieza en otro lugar (secundaria).

iv) Síntomas clínicos.

La enfermedad cerebrovascular siempre va a producir alteraciones en el intelecto, en la forma de percepción y en el movimiento del individuo que lo sufra. En definitiva, cambia la forma de interaccionar del paciente con su entorno. Las habilidades específicas que se pierdan o se afecten van a depender de la extensión del daño y, sobre todo, de la región cerebral donde se produzca. El cerebro es un órgano excepcionalmente complejo y cada área es responsable de unas funciones específicas. Así, podemos dividirlo en cuatro zonas primarias (hemisferio derecho, hemisferio izquierdo, cerebelo y tronco). Dependiendo de la zona afectada, los síntomas y consecuencias serán unos u otros.

- Afectación del hemisferio derecho: este hemisferio es responsable del control del movimiento del lado izquierdo del cuerpo. También controla las habilidades analíticas y perceptuales, como la distancia, el tamaño, la velocidad o la posición. Un infarto isquémico en este hemisferio puede producir parálisis del lado izquierdo (hemiplejía izquierda) o dificultades para habilidades espaciales. Puede ocasionar caídas por un mal cálculo de las distancias o que éste sea incapaz de guiar las manos para coger un objeto, abrocharse un botón o atarse los cordones de los zapatos. Además se pueden presentar problemas con la memoria a corto plazo (como recordar el desayuno de la mañana). A menudo, estos pacientes desarrollan un estilo de vida similar al que llevaban antes de padecer el infarto, sin tener en cuenta las secuelas, lo que hace que en algunas situaciones sea extremadamente peligroso.

- Afectación del hemisferio izquierdo: el hemisferio izquierdo rige el movimiento del lado derecho del organismo. También controla la capacidad del habla y del lenguaje. Un infarto isquémico en el hemisferio izquierdo puede producir una hemiplejía derecha. También puede aparecer afasia (dificultad para hablar o problemas con el lenguaje). A veces, esta afasia puede implicar la habilidad para mover los músculos relacionados con el habla, mientras que en otras ocasiones, el paciente puede tener dificultad para escribir, leer o entender una conversación. Pueden también desarrollar problemas para asimilar nueva información y nuevos conceptos. A diferencia de los supervivientes de enfermedad cerebrovascular en el hemisferio derecho, aquellos que lo sufren en el hemisferio izquierdo desarrollan un estilo de vida mucho más cauto y tranquilo. Muchas veces necesitan de otros para completar funciones elementales en su vida cotidiana.

- Afectación del cerebelo: el cerebelo controla muchas de nuestras funciones relacionadas con los reflejos, equilibrio y coordinación. Un infarto isquémico en esta zona del cerebro puede causar reflejos anormales en la cabeza y el torso, problemas de coordinación y equilibrio, mareos, náuseas y vómitos.

- Afectación del tronco cerebral: la enfermedad cerebrovascular en esta zona es especialmente devastadora para el que la padece. Este área controla funciones involuntarias de nuestro organismo, como la respiración, presión sanguínea o ritmo cardíaco. También otras funciones como el movimiento ocular, el oído, el habla o la deglución son reguladas en el tronco del cerebro. Otro agravante a destacar es que los impulsos generados por los hemisferios viajan a través del tronco cerebral, por lo que se pueden presentar hemiplejías en uno o en ambos lados del cuerpo.

Los síntomas clínicos más importantes de la e.c.v. se pueden resumir en:

- Debilidad, entumecimiento o insensibilidad de la cara, de un brazo o de una pierna, especialmente de un lado del cuerpo.
- Confusión, problemas en el habla o en el entendimiento.
- Problemas de visión en uno o en los dos ojos.
- Problemas de coordinación, al andar, mareos o pérdida de equilibrio.
- Fuertes dolores de cabeza sin causa conocida.
- Náuseas, fiebre y vómitos, que se distinguen de infecciones virales por la velocidad de comienzo.
- Pérdidas de conciencia o periodos de menor conciencia (desmayos, confusión, convulsiones o coma).

v) Diagnóstico.

Como norma general, cualquier paciente con sospecha de padecer un ictus debe ser remitido a un centro hospitalario urgentemente. La asistencia primaria debe ir encaminada a una actuación médica rápida. Hay que tener muy claro que la atención neurológica en las primeras horas está directamente relacionada a una mejoría en la evolución funcional del paciente.

Hay una serie de exploraciones que deben llevarse a cabo con todo paciente que ingresa en un centro hospitalario con un ictus. El objetivo es establecer la etiología y la terapia más adecuada. El orden de las pruebas diagnósticas dependerá del historial médico del paciente. Estas pruebas de urgencia son las siguientes:

1. Tomografía computerizada sin contraste.
2. Estudios de laboratorio. Sangre:
 - Velocidad de sedimentación.
 - Hemograma.
 - Pruebas de coagulación (tiempo de protrombrina y tiempo de tromboplastina parcial).
 - Ionograma.
 - Urea.
 - Creatinina.

- Glucemia.
 - Transaminasas.
 - Gases en sangre arterial (si hay sospecha de hipoxia).
3. Estudios de laboratorio. Líquido cefalorraquídeo: (si hay sospecha de hemorragia subaracnoidea o infección y la tomografía es negativa).
 4. Estudios cardiológicos.
 - Electrocardiograma.
 - Ecocardiograma (si hay sospecha de endocarditis).
 - Monitorización cardiaca.
 5. Radiografía de torax.
 6. Ecografía-Doppler.
 7. Electroencefalograma.

Las técnicas más comunes de diagnóstico son las pruebas carótidas no invasoras, la angiografía cerebral y técnicas de imagen cerebral. Los estudios Doppler transcraneales permiten determinar la gravedad y localización de la aterosclerosis carotídea. También son útiles para conocer los flujos de las arterias cerebrales anterior, media, posterior y vertebrobasilares. La angiografía cerebral es el método más fiable para la evaluación del sistema cerebrovascular, ya que permite detectar estenosis intensas, procesos aterotrombóticos, mostrar la circulación colateral en el polígono de Willis y en la región cortical, aunque se producen complicaciones en un 10-12% de los casos. Dados los riesgos de esta técnica cada vez se impone el desarrollo de técnicas de imagen. Son las pruebas más importantes en fase aguda. La tomografía computerizada permite descartar hemorragia como fuente del ictus, aunque no permite detectar infartos cerebrales en las primeras horas. La resonancia magnética permite localizar la magnitud y posición de los infartos aunque puede no ser útil en algunas estructuras. Por eso, además de combinar estas técnicas, se emplean cada vez más los estudios con flujo de xenón o la tomografía de emisión de positrones.

Todas estas pruebas van encaminadas a conocer una serie de datos que son cruciales en el inicio del tratamiento, como:

- Establecer que la causa del déficit neurológico es un ictus.
- Definir que el ictus es de naturaleza isquémica o hemorrágica.
- Determinar la posible reversibilidad del cuadro.
- Concretar la etiología más probable.
- Desarrollar el riesgo de posibles complicaciones.

Cuando se ha establecido la etiología del ictus hay una serie de exploraciones obligadas en el seguimiento del paciente según el origen de la enfermedad (Tabla 2):

<u>Causa del ictus</u>	<u>Tipo de exploración</u>
Embolia de origen cardiaco	Estudios cardiológicos Hematología
Ateromatosis de troncos supraópticos	Ecografía-Doppler Angio-RM Hematología
Ateromatosis intracraneal	Doppler transcraneal Hematología
Infartos lacunares	Doppler transcraneal Hematología
Infartos indeterminados	Hematología
Ictus con enfermedad no ateromatosa	Hematología Inmunología Angio-RM Ecografía-Doppler
Hemorragia cerebral	Angio-RM Doppler transcraneal Hematología. Biopsias.

Tabla 2

vi) Tratamiento.

El tratamiento más eficaz es la prevención. La mejor estrategia para reducir la prevalencia de la e.c.v. es el cuidado de los factores de riesgo cardiovasculares (hábitos de vida, alimentación, reducción de peso y ejercicio moderado). Una vez se ha producido, hay algunos tratamientos que podemos considerar específicos según al tipo de infarto:

vi.1.) Tratamiento de la e.c.v. de origen aterotrombótico.

Ácido acetilsalicílico. El uso de este fármaco es todavía polémico, aunque se considera el fármaco patrón. La mayor polémica surge de la dosis empleada. En Europa hay la tendencia a recomendar dosis medias o bajas (<325mg/día), mientras que en EE.UU. se recomiendan dosis medias o altas (>325mg/día). Las dosis pequeñas estarían justificadas según una menor incidencia de hemorragias, mientras que las dosis altas estarían de acuerdo con los datos que sugieren un comportamiento dosis-respuesta. Este debate seguirá manteniéndose hasta que no se haga un estudio directo comparando dosis muy bajas, bajas y altas.

Tienopiridinas. En diversos estudios comparativos entre la aspirina y la ticlopidina se ve el mayor efecto beneficioso de este último. De hecho es capaz de reducir un 33% el riesgo de nuevos eventos cerebrales, frente al 25% de la aspirina. Por el contrario, presenta una mayor incidencia de efectos secundarios (neutropenia, diarrea y erupción).

Tratamiento hipolemiante. Hasta hace poco no era muy recomendado el uso de hipolipomiantes, pero las estatinas han cambiado esta tendencia. A falta de un estudio directo, parece que hay una reducción en la incidencia de ictus.

Anticoagulantes. Se emplean más en embolias cerebrales, en prevención secundaria de infarto cerebral de origen aterotrombótico no están recomendados.

vi.2.) Infarto lacunar.

No existen estudios específicos y diferenciados para este tipo de infartos. Por eso, se recomienda un tratamiento igual que en el apartado de infarto cerebral de origen aterotrombótico.

vi.3.) Embolias cerebrales.

Se emplean los anticoagulantes orales (heparinas no fraccionadas, heparinoides y heparinas de bajo peso molecular, asociándolas con ácido acetilsalicílico).

vi.4.) Infarto cerebral de causa inusual o de etiología no determinada.

El principal problema es la poca incidencia de estos infartos, con lo que su estudio se hace complicado. Está recomendado el uso de heparina intravenosa y posteriormente anticoagulantes hasta la recanalización, aunque en el caso de los estados protrombóticos, la función de los anticoagulantes es discutida. Dependerá de cada caso particular.

En los infartos sin causa identificada, se recomienda la terapia antiagregante como primera medida y la anticoagulación oral si aparecen recurrencias.

vi.5.) Estrategias generales.

Actualmente se emplean muchos tipos de estrategias (en principio no excluyentes) y muchos otros fármacos están en fase clínica. Casi todos ellos van orientados a la mejora del flujo sanguíneo cerebral, con lo que se evita el daño que produce su interrupción. En este grupo estarían los antitrombóticos y los trombolíticos. Otros fármacos tienen como objeto la inhibición de la acción que ocasionan los mediadores liberados en la isquemia y en la reperfusión, es el caso de los neuroprotectores y citoprotectores. Otros tratamientos, más específicos, van encaminados a la neuroprotección o a la restauración del flujo sanguíneo cerebral.

Neuroprotectores. La restauración del flujo cerebral sanguíneo no lo es todo en el tratamiento del ictus cerebral. Dependiendo del tiempo de acción habrá una región más o menos grande del cerebro con un flujo sanguíneo menor de 20 ml/minuto, con lo que ya habrá algún trastorno funcional. Además en la reperfusión se producen muchos fenómenos nocivos que conviene ser reducidos al máximo. Entre los neuroprotectores hay distintos grupos según su mecanismo de acción, muchos de estos están en fase clínica, aunque ninguno ha mostrado totalmente su eficacia en clínica. Van encaminados a las distintas etapas de la e.c.v., como la depleción de ATP, la liberación de glutamato, la acumulación de ácido láctico, la entrada de calcio,...

Antagonistas del glutamato: se han estudiado varios fármacos antagonistas del subtipo de receptor de glutamato NMDA. Del dextroflano y del eliprodil no se pueden sacar conclusiones claras, mientras que el estudio con selfotel tuvo que abandonarse por un aumento de la mortalidad. Un fármaco que si ha funcionado, administrado dentro

de las seis primeras horas, es el lubeluzol, un bloqueante de canales de sodio que inhibe la liberación de glutamato.

Antagonistas de los canales de calcio: se han probado las dihidropiridinas (nimodipino) y se ha encontrado un efecto positivo sólo en el grupo que recibió el tratamiento en las doce primeras horas.

Citicolina: es un intermediario de la síntesis de fosfolípidos de membrana, estimula la síntesis de acetilcolina, reduce la acumulación de ácidos grasos y es antioxidante. Por todo esto, la citicolina ha demostrado un efecto neuroprotector, neurorreparador y neurocognitivo experimental y clínicamente. Además, hay que destacar su perfil de seguridad.

Trombolíticos. El fármaco más importante de este grupo es el rt-PA (activador tisular de plasminógeno recombinante). Se obtienen resultados buenos en la administración de rt-PA intravenoso en las tres primeras horas o intraarterial, administrada con un microcatéter situado cerca de la oclusión, en las seis horas iniciales (Brott *et al.*, 2000). A pesar de esta mejoría, es eficaz sólo en un estrecho margen de tiempo, y la mayoría de los pacientes llegan al hospital tarde para poder actuar.

La situación actual refleja cierta incertidumbre sobre el tratamiento más adecuado. Afortunadamente se ha avanzado mucho, ya que hace unos años no existía un tratamiento específico. Cada vez se sabe más sobre el desarrollo de esta enfermedad y como consecuencia se va avanzando más en su tratamiento. Además cada día se cuentan con más Unidades de Ictus en los hospitales, por lo que se lleva a cabo una vigilancia más estrecha del paciente. El problema mayor ahora es decidir entre todos los tratamientos el más adecuado, eficaz y seguro. Para responder esa pregunta hay muchos ensayos clínicos en marcha. Muchos de ellos se abandonan por no suponer ninguna mejora significativa respecto al grupo no tratado, pero muchos otros parece que apuntan una mejora en el desarrollo del tratamiento de la enfermedad cerebrovascular.

2. Fisiopatogenia de la enfermedad cerebrovascular.

La primera consecuencia que se observa es la reducción del flujo sanguíneo de una zona cerebral determinada. La interrupción del flujo sanguíneo va a ser grave en lo

que se denomina núcleo de la lesión (core). A medida que se separa del núcleo isquémico (penumbra isquémica), la lesión es menor ya que el flujo colateral que llega del territorio no isquémico es mayor. Por lo que se verá mas adelante, es en esta región donde es prioritario actuar para evitar un desarrollo posterior de la lesión (Hakim, 1987). La técnica experimental que más información ha dado sobre este proceso es la oclusión de la arteria media cerebral (MCAO) en ratas (Tamura *et al.*, 1981), una de las que se ha empleado en esta Tesis.

El impacto que la isquemia cerebral tiene en el cerebro va a depender, además de la región donde ocurra, de la duración y de la gravedad con que se produzca. Se ha observado que una disminución del 20% del flujo normal tiene como consecuencia la reducción de la síntesis de proteínas (Jacewicz *et al.*, 1986), quizá por la disgregación que sufre el ribosoma en la isquemia (Hossmann, 1994). Cuando la reducción del flujo alcanza el 80%, se altera la producción de ATP, se pierde el gradiente iónico y se despolariza la célula. A partir de aquí se producen unos hechos ya incompatibles con la viabilidad celular (Hossmann, 1994). A continuación exponremos los distintos procesos que ocurren en el curso de un infarto isquémico cerebral (Iadecola 1999. Cerebral ischemia: molecular and cellular pathophysiology).

2. 1. Eventos celulares.

2. 1. a. Fallo energético.

La interrupción de flujo va a producir un fallo energético, con una caída de los niveles de ATP, que traerá como consecuencia que las ATPasas y otras bombas iónicas no funcionen (Astrup *et al.*, 1977). Como consecuencia de esto, se empieza a acumular sodio en el interior de la célula y potasio en el exterior (despolarización anóxica), lo que ocasiona la pérdida de los gradientes iónicos de membrana. Dependiendo de la intensidad y la duración de este proceso, la célula puede tener distintas respuestas. En el caso del core de la lesión, la depleción total de ATP es la principal responsable de la muerte celular. (Astrup *et al.*, 1977). En la penumbra, donde el fallo energético no es total, son otras las causas del daño celular (liberación masiva de aminoácidos excitadores, excitotoxicidad inducida por glutamato, sobrecarga de calcio, daños por radicales libres,...).

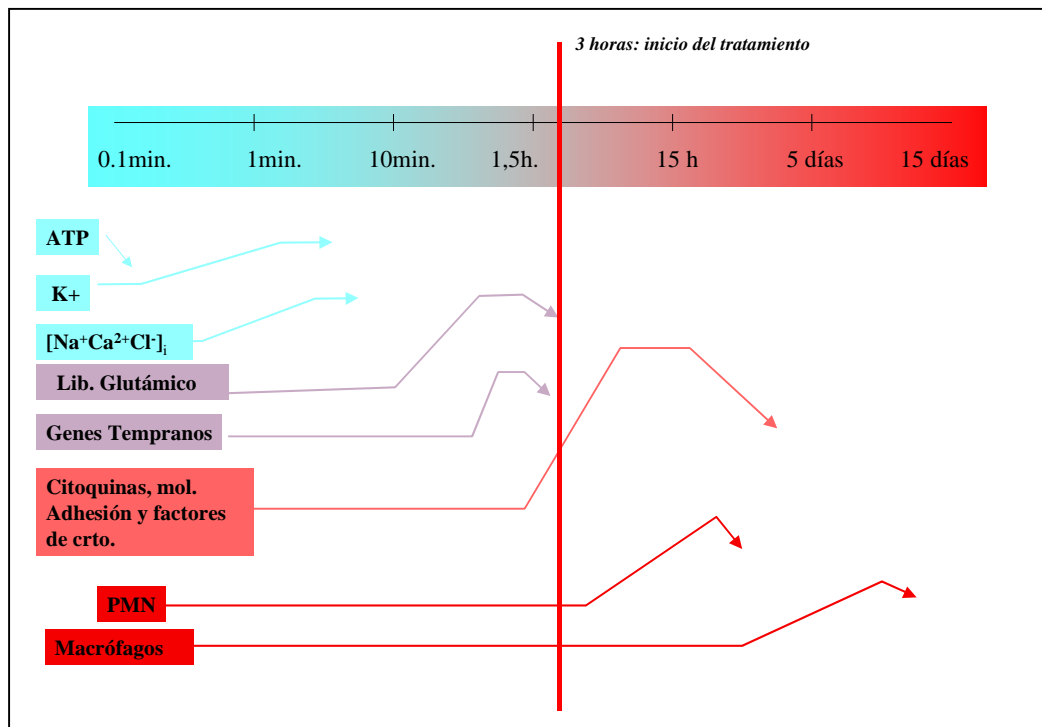


Figura 1. Curso temporal de los fenómenos bioquímicos y celulares en la enfermedad cerebrovascular

2. 1. b. Liberación de aminoácidos excitadores. Excitotoxicidad inducida por glutamato.

Se sabe desde hace años que el glutamato liberado en la isquemia alcanza niveles neurotóxicos en el cerebro (Olney *et al.*, 1969; Benveniste *et al.*, 1984). Los efectos derivados de esto se deben a la sobreactivación de los receptores de membrana de glutamato (Choi, 1988; Lee *et al.*, 2000) metabotrópicos e ionotrópicos, nombrados según sus agonistas farmacológicos. NMDA (N-metil-D-aspartato), AMPA (ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico) y kainato. Los tres tipos de receptores están asociados a canales iónicos y permiten al sobreestimularse la entrada de sodio y la salida de potasio. Pero además, el receptor NMDA va a ser el responsable de la entrada masiva y sobrecarga de calcio en el interior celular. Es la consecuencia de la excitotoxicidad inducida por glutamato. Estas células morirán, liberarán su contenido y provocarán que el tejido tenga que reequilibrar el gradiente iónico a costa de gastar ATP (Nedergaard *et al.*, 1986). Este proceso es el responsable de que se vaya extendiendo una *ola despolarizante* o *despolarizaciones peri-infarto* desde el core hasta la penumbra. Esta *ola* aumenta la demanda metabólica y el fallo energético, con lo que se potencia de nuevo la liberación de glutamato (Lee *et al.*, 2000). Se ha visto en modelos *in vitro* que antagonistas de este receptor, como el MK-801, reducen el daño neuronal. El problema

de estas estrategias neuroprotectoras son los efectos secundarios que tiene este fármaco o la poca eficacia que han mostrado en la clínica.

2. 1. c. Sobrecarga de calcio.

La concentración fisiológica de calcio intracelular es del orden de milimolar, si bien, en su forma libre no sobrepasa 10^{-7} - 10^{-6} M. Se mantiene en estos márgenes tan estrechos gracias a un eficaz control llevado a cabo por la célula (Miller, 1991) gracias a la Ca^{2+} -ATPasa, el intercambiador Na^{+} - Ca^{2+} , los depósitos de calcio intracelulares (el retículo endoplasmático y la mitocondria) y las proteínas que unen calcio (calmodulina,...).

Durante la isquemia hay una serie de cambios que conducen a la célula a aumentar su concentración de calcio en varios órdenes de magnitud y este aumento produce un efecto letal (Orrenius *et al.*, 1989). La entrada de calcio se debe no sólo a la activación del receptor NMDA, también a los canales de calcio voltaje dependiente activados por la despolarización y a la reversión del intercambiador sodio-calcio (Lee, *et al.* 2000).

Por una parte se pueden activar proteasas como la calpaína-I (Choi, 1990), que puede degradar proteínas estructurales como la tubulina, proteínas asociadas a microtúbulos o la espectrina o aumentar la producción de radicales libres (Hossmann y Kleihues, 1973). El calcio induce la activación de fosfolipasa A2 y fosfolipasa C que liberan ácido araquidónico (Bazan, 1989). El metabolismo de los ácidos grasos incluye enzimas como la ciclooxigenasa y la lipoxigenasa, que contribuyen al daño producido por radicales libres (Chan, 1996). Otra enzima activada por el aumento de la concentración de calcio es la isozima neuronal de la sintasa de óxido nítrico (nNOS). El óxido nítrico es altamente tóxico cuando se combina con el radical superóxido para producir peroxinitrito (Beckman *et al.*, 1990). Pero el aumento de la concentración intracelular de calcio también va a provocar la liberación de zinc, metal de transición involucrado en la muerte neuronal (Choi y Koh, 1998; Weiss *et al.*, 2000). Normalmente está unido a proteínas (metaloenzimas y factores de transcripción), pero en el cerebro hay depósitos de este metal en las neuronas glutamatérgicas (Frederickson, 1989; Palmiter *et al.*, 1996), que se libera después de procesos isquémicos (Tonder *et al.*, 1990). El zinc puede ejercer su neurotoxicidad por radicales libres o por activación de caspasas (Kim *et al.*, 1999; Lobner *et al.*, 2000).

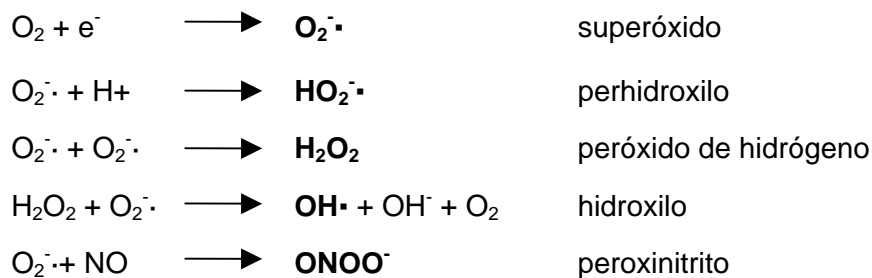
2. 1. d. Acidosis.

Después de un proceso isquémico se produce una reducción en el pH intracelular a 6,4-6,7 (Hakim y Shoubridge, 1989; Kagansky *et al.*, 2001). La acidosis se debe principalmente a la producción de ácido láctico por la glucólisis anaeróbica y se ha visto que esta acidosis incrementa el daño isquémico in vivo (Lascola y Kraig, 1997).

El aumento del daño puede deberse a que el pH ácido produce la deslocalización del hierro intracelular (Oubidar *et al.*, 1994) que actúa como catalizador en algunas reacciones oxidativas, como la reacción de Fenton (Olanow, 1993). Otra de las causas del daño producido por la acidosis es su influencia sobre la homeostasis del calcio ya que modifica la capacidad de algunas proteínas para unirse a él (Siesjö, 1988).

2. 1. e. Daño oxidativo.

Las especies reactivas de oxígeno están presentes en el desarrollo de muchos procesos neurodegenerativos (Kontos, 1985). La principal implicación está en la reperfusión tras la isquemia, donde hay un aporte de oxígeno que puede ser sustrato de numerosas reacciones de oxidación y fuente de especies reactivas de oxígeno. Además, en esta etapa, las defensas antioxidantes (SOD, glutatión, catalasa, ácido ascórbico o tocoferol) están desequilibrados por la gran cantidad de radicales producidos durante la isquemia.



La mayoría de las especies reactivas de oxígeno responden a la definición de radical, aunque hay excepciones (el peroxinitrito no es un radical, aunque es muy oxidante). Un radical se define como una especie capaz de existir independientemente teniendo 1 ó 2 electrones desapareados, son paramagnéticas y muy activas (hay excepciones como se verá). Algunos de ellas se producen en procesos fisiológicos (metabolismo de la xantina oxidasa, metabolismo de aminoácidos aromáticos,

respiración mitocondrial,...), pero durante un proceso isquémico, como se ha explicado antes, se producen en mucha mayor medida.

2. 2. Cambios moleculares.

En la isquemia cerebral se producen diversos estímulos capaces de desencadenar la expresión de genes, como son el aumento de Ca^{2+} intracelular, de las especies reactivas de oxígeno (ERO), así como la propia hipoxia. Así, tras una isquemia focal realizada en ratas mediante la oclusión de la arteria cerebral media (-MCAO- método experimental más utilizado y que más se asemeja a lo ocurrido en el humano), pueden detectarse cinco ondas temporales de expresión génica (ver figura 2). En realidad, ahora sabemos que las diferentes ondas se entremezclan y podemos encontrar expresión de genes en diferentes momentos. Es interesante destacar el hecho de que muchos de los mediadores que a continuación vamos a exponer, pueden participar con propiedades neuroprotectoras o neurotóxicas en los procesos secundarios al daño isquémico.

2. 2. a. 1ª “onda”: genes de expresión temprana₁ (GET).

Entre ellos se encuentran c-fos, c-jun, zif 268, jun-B, NF- κ B (Factor nuclear- κ B), HIF-1 (Factor-1 inducible por hipoxia) y IRF1 (Factor-1 regulador del interferón) (Hsu *et al.*, 1993; Nowak *et al.*, 1990; Uemura *et al.*, 1991). Su expresión es temporal y transitoria y participan en muchos procesos que iremos describiendo.

Por ejemplo, NF- κ B posee un doble papel, bien neuroprotector favoreciendo la supervivencia neuronal bien neurotóxico como mediador de la muerte a través de mecanismos directos o indirectos. Las manipulaciones farmacológicas o genéticas de NF- κ B pueden ser útiles en el tratamiento de muchas enfermedades del SNC en donde existe un aumento de la expresión de este gen (para revisión ver Mattson *et al.*, 2000).

Es interesante el hecho de que algunos de estos genes (por ejemplo, NF- κ B) codifican factores de transcripción necesarios para la posterior expresión de enzimas inflamatorios, como la iNOS (sintasa del óxido nítrico inducible) y la COX-2 (ciclooxigenasa tipo 2), cuya expresión está aumentada tras la isquemia cerebral y en la que participan en el daño neuronal asociado a esta condición. Existen numerosos trabajos en donde se demuestra que la inhibición farmacológica de la actividad de

iNOS/COX-2 confiere protección frente al daño isquémico. Además, la utilización de animales deficientes genéticamente en estos genes han demostrado este papel neurotóxico (para revisión ver Iadecola 1997; Lipton 1999).

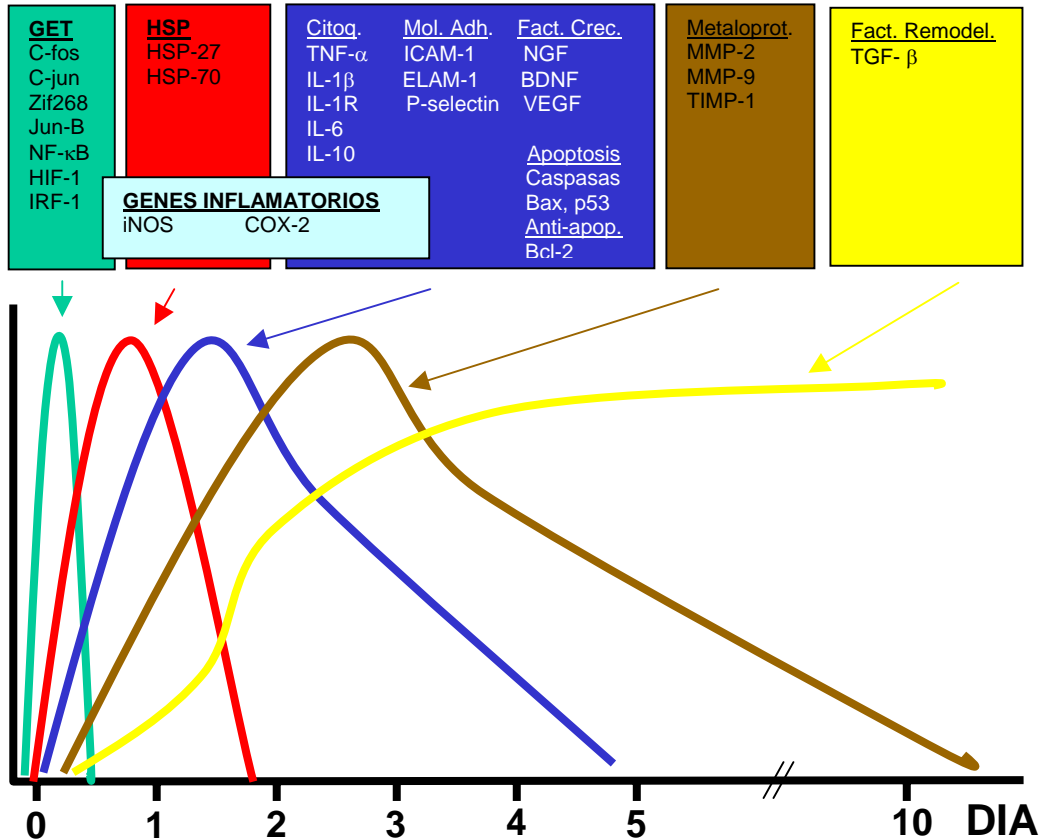


Figura 2. Representación de las cinco ondas temporales de expresión génica.

2. 2. b. 2ª “onda”: Proteínas de choque térmico (-heat shock proteins- HSP).

Su RNAm se expresa entre 1 ó 2 horas tras la isquemia y desaparece en 1 ó 2 días (Welsh *et al.*, 1992). Las proteínas de choque térmico han sido implicadas en procesos de remodelación de proteínas desnaturalizadas y la expresión de sus genes parece que está limitada a zonas cuyo flujo sanguíneo está disminuido en más de un 50%. Se ha descrito aumento de expresión de HSP-27 y HSP-70 tras isquemia focal (Bates *et al.*, 2001). Y de nuevo pueden tener un papel protector (para revisión ver Sharp *et al.*, 1999).

2. 2. c. 3ª “onda”: Mediadores pro-inflamatorios.

Citoquinas, como TNF- α (Factor de necrosis tumoral- α) e IL-1 β (Interleuquina-1) que, a su vez, inducen la expresión de moléculas de adhesión, inician la reacción inflamatoria y activan la expresión de genes relacionados con la inflamación como los de iNOS y COX-2.

Las citoquinas pro-inflamatorias (TNF- α , IL-1 β) han sido implicadas fundamentalmente en el daño isquémico y existen trabajos en donde la administración de anticuerpos anticitoquinas confiere protección. Sin embargo, también se han detallado para algunas de estas citoquinas acciones protectoras (que en el caso de TNF- α se detallarán posteriormente).

Moléculas de adhesión, como ICAM-1 (Molécula de adhesión intercelular-1), ELAM-1 (Molécula de adhesión endotelial-1) y P-selectina, que establecen la adhesión endotelial de leucocitos previa a su infiltración (Wang *et al.*, 1994, 1995; Okada *et al.*, 1994). En este sentido, el uso de moléculas anti-adhesión produce una disminución del tamaño de los infartos (para revisión ver Barone y Feuerstein 1999).

Factores de crecimiento, como NGF (Factor de crecimiento nervioso), BDNF (Factor neurotrófico derivado del cerebro) y VEGF (Factor vascular de crecimiento endotelial), y *genes* pro-apoptóticos (Bax, caspasas y p53) o anti-apoptóticos (Bcl-2).

Existe abundante bibliografía acerca del papel neuroprotector de la administración de factores de crecimiento en los modelos de isquemia (ver Lipton 1999) y, de hecho, actualmente se está trabajando intensamente en manipulaciones farmacocinéticas para aumentar la eficacia de estos factores ya que, al ser de naturaleza peptídica, por una parte no atraviesan la barrera hematoencefálica y por otra son metabolizados rápidamente por el hígado.

Esta tercera onda aparece entre 1-3 horas tras la isquemia con un pico máximo a las 12-24 horas, para desaparecer a los 2-3 días.

2. 2. d. 4ª “onda”: enzimas proteolíticas de matriz.

Dentro de la familia de las metaloproteasas, las metaloproteasas de matriz (MMP) han sido implicadas en el daño de la matriz extracelular. Se ha descrito aumento de expresión de MMP-9 y MMP-2 y sus inhibidores tisulares TIMP-1 (Rosenberg *et al.*, 1996). Existen algunos trabajos sobre el papel neuroprotector de inhibidores selectivos de MMPs (Rosenberg *et al.*, 1998) y recientemente se han desarrollado animales genéticamente deficientes en MMP-9 en los que se ha evidenciado que presentan infartos cerebrales de menor tamaño que los animales nativos (Asahi *et al.*, 2000).

Otras metaloproteasas cuya expresión parece variar tras la isquemia son las ADAMs (*a* disintegrin and metalloproteinase) en concreto la TACE/ADAM17 (TNF- α converting enzyme) que contribuye al aumento de la liberación de TNF- α . (Hurtado *et al.*, 2001).

2. 2. e. 5ª “onda”: factores de remodelación.

Como TGF- β (Factor transformante de crecimiento- β) (Wang *et al.*, 1995) que está implicado en procesos de remodelación. En el proceso inflamatorio cerebral asociado a la isquemia, se produce adhesión e infiltración de neutrófilos, seguidos por monocitos y macrófagos (Clark *et al.*, 1993). Por otro lado se produce la activación, proliferación e hipertrofia de la microglía residente, dando todo ello lugar al fenómeno conocido como “gliosis”. La gliosis es inducida por citoquinas como TNF- α , IL-1 β y IFN- α (Balasingam *et al.*, 1994) y moléculas de adhesión como CD11/CD18 integrinas, ICAM-1, ELAM-1 y P-selectina (Pober y Cotran, 1990). Las citoquinas pueden ser sintetizadas por células de la microglía, astrocitos y neuronas, pero además por células periféricas como fagocitos mononucleares y polimorfonucleares que pueden atravesar la barrera hematoencefálica, ya que ésta se encuentra alterada en la isquemia cerebral (García *et al.*, 1974). La activación de los astrocitos tiene la función de reparar el tejido dañado, mediante la restauración del aporte sanguíneo y el restablecimiento de la integridad de la barrera hematoencefálica (Norton *et al.*, 1992). Pero también produce daño tisular, porque contribuye a la peroxidación lipídica y existe liberación de enzimas citolíticas (Kochanek *et al.*, 1992).

3. Origen del ATP cerebral.

La falta de riego sanguíneo en el cerebro va a provocar el que no haya aporte ninguno o mínimo de sustratos con los que la célula pueda sintetizar ATP. Como se ha visto en el apartado 2.1.a., este es el primer eslabón de la cadena de acontecimientos que produce el infarto isquémico. Aunque cuenta con varios recursos para obtenerla, (Figura 3) las neuronas producen la mayor parte de la energía que emplea en la fosforilación oxidativa (de cada ciclo que se realiza en la glucólisis se obtienen 2 moléculas de ATP, mientras que la fosforilación oxidativa produce 36 ó 38).

La forma de obtener esa energía es sintetizando moléculas de ATP y almacenando esa energía en forma de enlace fosfato. La fosforilación oxidativa transcurre íntegramente en la mitocondria.

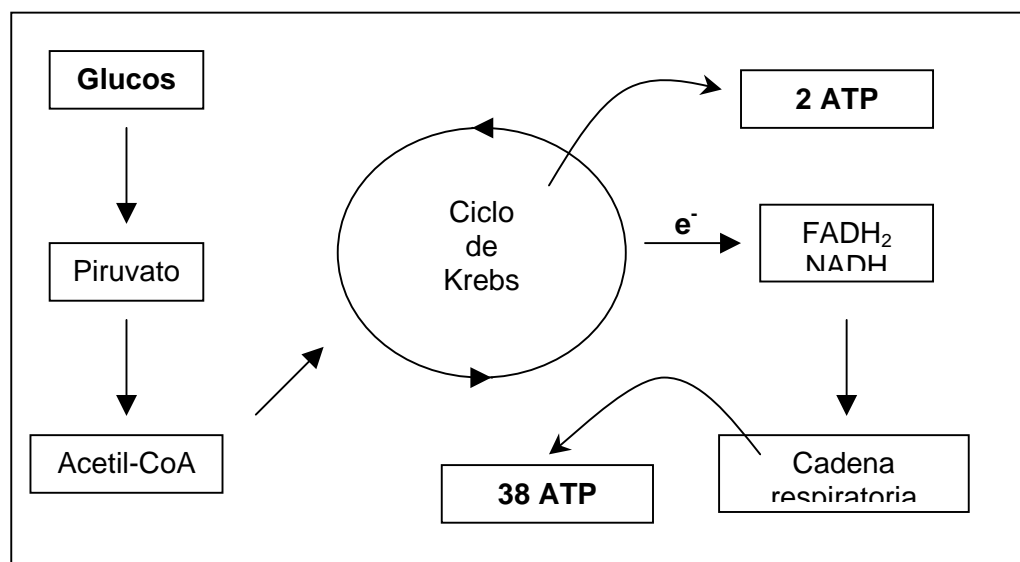
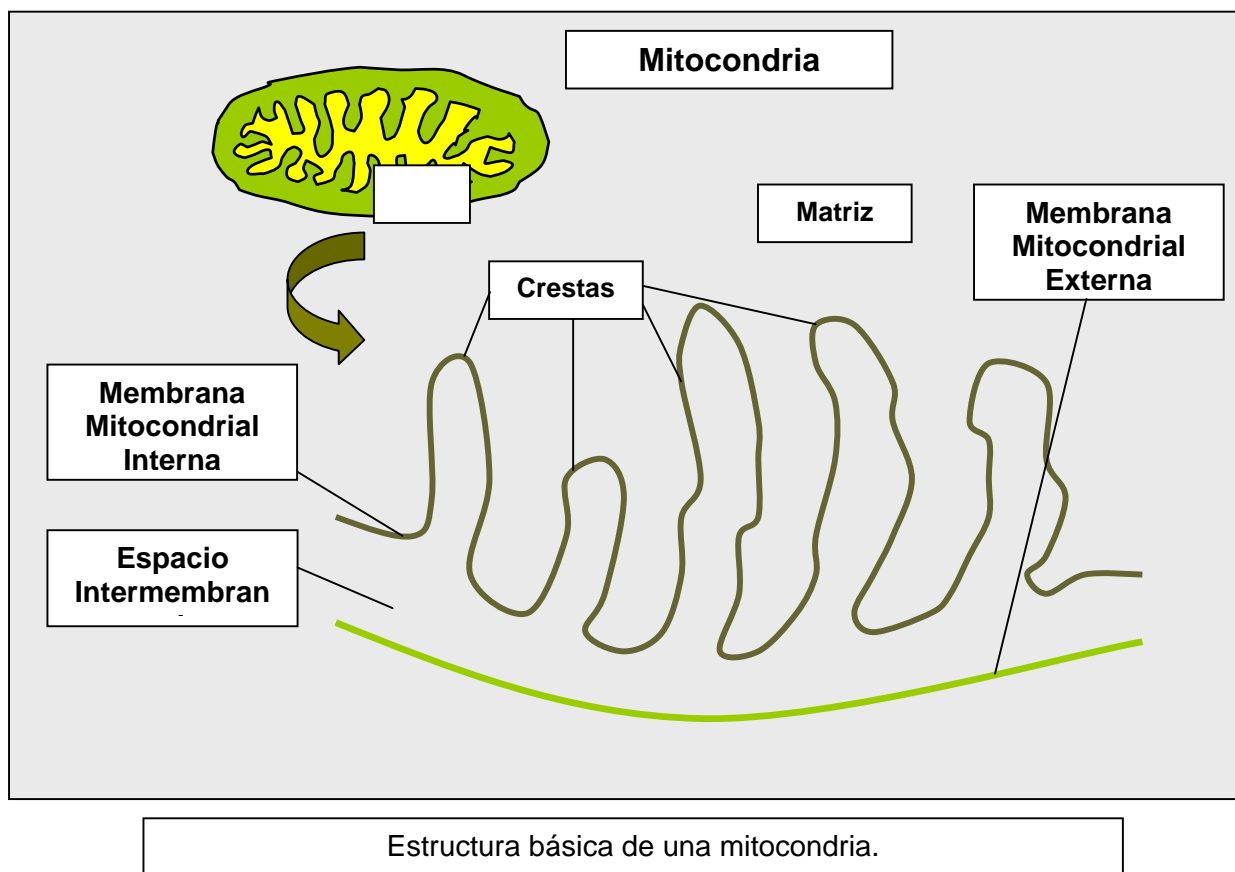


Figura 3. Esquema comparativo de la producción de ATP en el ciclo de Krebs y en la fosforilación oxidativa.

Las mitocondrias fueron descritas por primera vez en 1886 por Robert Altmann, quien las visualizó como bastones y gránulos pequeños dentro del citoplasma. Hay que recordar el origen endosimbiótico y eubacterial (Margulis, 1970) de la mitocondria. El estudio del DNA mitocondrial ha hecho relacionar la mitocondria como pariente cercano de la α -división de las Proteobacterias (Yang *et al.*, 1985). En concreto se ha encuadrado dentro de la subdivisión rickettsial, un grupo de parásitos intracelulares entre los que se encuentran géneros como el *Rickettsial*, *Anaplasma* y *Ehrlichia*. La

teoría más admitida es que se produjo una fusión entre una arqueobacteria con una proteobacteria, de forma que surgió una célula eucariota amitocondrial (Shoffner *et al.*, 1993). Posteriormente se adquirieron las mitocondrias por endosimbiosis con una α -Proteobacteria (Gray *et al.*, 1999).

La mitocondria es un orgánulo con forma ovalada, de unas $2\mu\text{m}$ de largo por $0,5$ de ancho. Fueron E. Kennedy y A. Lehninger los que descubrieron que aquí era donde se localizaban los enzimas encargadas de la fosforilación oxidativa (Kennedy EP *et al.*, 1949). Posteriores estudios por microscopía electrónica, realizadas por G. Palade y F. Sjöstrand (Sjöstrand *et al.*, 1978) revelaron que la mitocondria tenía dos membranas, una externa y una interna. En esta última se encuentran muchos plegamientos llamados crestas. Entre las dos membranas se encuentra lo que se llama espacio intermembranal y el espacio interior de la mitocondria se conoce como matriz.



En la matriz se encuentran los enzimas de la oxidación de ácidos grasos y de aminoácidos, del ciclo de Krebs, DNA, ribosomas, ATP, ADP, fosfato, Mg^{2+} , Ca^{2+} , K^+ e intermedios metabólicos solubles. Aquí suceden las reacciones del ciclo del ácido cítrico o la β -oxidación de los ácidos grasos. La membrana externa es permeable a la mayoría

de los iones y moléculas pequeñas, gracias a una proteína de membrana como la porina. Por el contrario la membrana interna es altamente impermeable a casi todas las moléculas, excepto a las que tienen transportadores específicos de membrana (ADP, ácidos grasos,...). En esta zona están localizados los transportadores de electrones de la respiración mitocondrial.

No hay un número conocido exacto de mitocondrias en cada célula, eso va a depender del tejido. Una célula de hígado de rata tiene unas 800 mitocondrias y las células musculares pueden tener un número aún mayor. Pueden llegar a suponer el 50% del volumen citoplasmático. Otra característica importante de estos orgánulos es su ubicación. Suelen estar localizados cerca de donde haga falta su producto final, así se evita la difusión del ATP por la célula (cerca de las miofibrillas de forma que se pueda contraer el músculo inmediatamente). También se encuentran cerca de sus combustibles, como gotas de lípidos.

Cadena respiratoria mitocondrial (fosforilación oxidativa).

La cadena respiratoria consta de cinco complejos enzimáticos distribuidos por la membrana mitocondrial interna. El paso de electrones a lo largo de esta cadena produce energía que es almacenada en forma de gradiente de protones, que posteriormente es empleada por otra enzima, la ATP sintasa, para obtener ATP a partir de ADP y fosfato. En 1961, Peter Mitchell propuso el mecanismo general de la fosforilación oxidativa, que explicaba el acoplamiento entre la respiración mitocondrial y la producción de ATP. Esta teoría estuvo en duda muchos años, pero hoy en día se acepta como uno de los principios elementales de la bioenergética.

En la cadena respiratoria funcionan una serie de grupos transportadores de electrones, la mayoría son complejos proteicos con grupos prostéticos capaces de aceptar o donar electrones, ya que tienen una gran cantidad de núcleos redox (grupos hemo, iones cobre, núcleos Fe-S,...), con lo que pueden transferirse los electrones con gran facilidad. Además, el NADH tiene un potencial de reducción negativo (tiene poca afinidad por los electrones), mientras que el oxígeno tiene un potencial de reducción positivo (alta afinidad). Esto significa que la reacción está favorecida termodinámicamente (Figura 4).

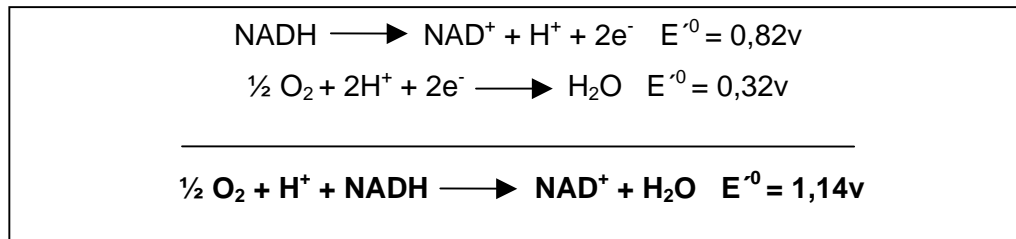


Figura 4

La mayor parte de los electrones que entran en la cadena respiratoria lo hacen por las deshidrogenasas que captan electrones en las reacciones oxidativas de las distintas rutas metabólicas de las que son parte. Normalmente estas deshidrogenasas emplean los nucleótidos de piridina (NADH y NADPH) y flavina (FMN y FAD) como aceptores electrónicos. Muchas reacciones emplean indistintamente un nucleótido de piridina, mientras que otras son específicas de alguno de los dos. El NADH es más específico de reacciones catabólicas y lleva los electrones a uno de los complejos de la cadena respiratoria. Por su parte, el NADPH es más propio de reacciones anabólicas. Los nucleótidos de flavina tienen la ventaja de poder aceptar dos electrones, pero su capacidad redox va a depender de la proteína con la que se asocien.

La ubiquinona o coenzima Q es una benzoquinona liposoluble con una cadena lateral isoprenoide. También tiene la ventaja de poder aceptar uno (semiquinona) o dos electrones (ubiquinol). Además es una molécula pequeña lo que permite difundir con facilidad entre las membranas. Los citocromos son proteínas capaces de transferir electrones por poseer un grupo hemo en su centro activo. El hierro del grupo hemo se podrá reducir u oxidar según haga falta.

La maquinaria que sintetiza ATP está compuesta de unas bombas de protones asociadas a la cadena de transporte electrónico y a una ATPasa final. El principio que explica todo este proceso es el de fuerza protón-motriz (se explicará más adelante). El transporte de electrones de un complejo a otro va a hacer que se acumulen protones en el espacio intermembranal.

Los electrones son transferidos desde una molécula como el NADH hasta el oxígeno a través de una cadena de complejos protéicos situados en la membrana interna de la mitocondria. Estos complejos proteicos son conocidos como NADH-citocromo c reductasa o complejo I-III, succinato-citocromo c reductasa o complejo II-III y citocromo c oxidasa o complejo IV (Figura 5). Como consecuencia de este transporte habrá una acumulación de protones en el espacio intermembranal. Este gradiente de

protones es lo que va a hacer que se sintetice ATP gracias al enzima ATP sintetasa, situado también en la membrana interna. Vamos a explicar más detenidamente cómo se produce ese transporte a lo largo de esta cadena de complejos proteicos.

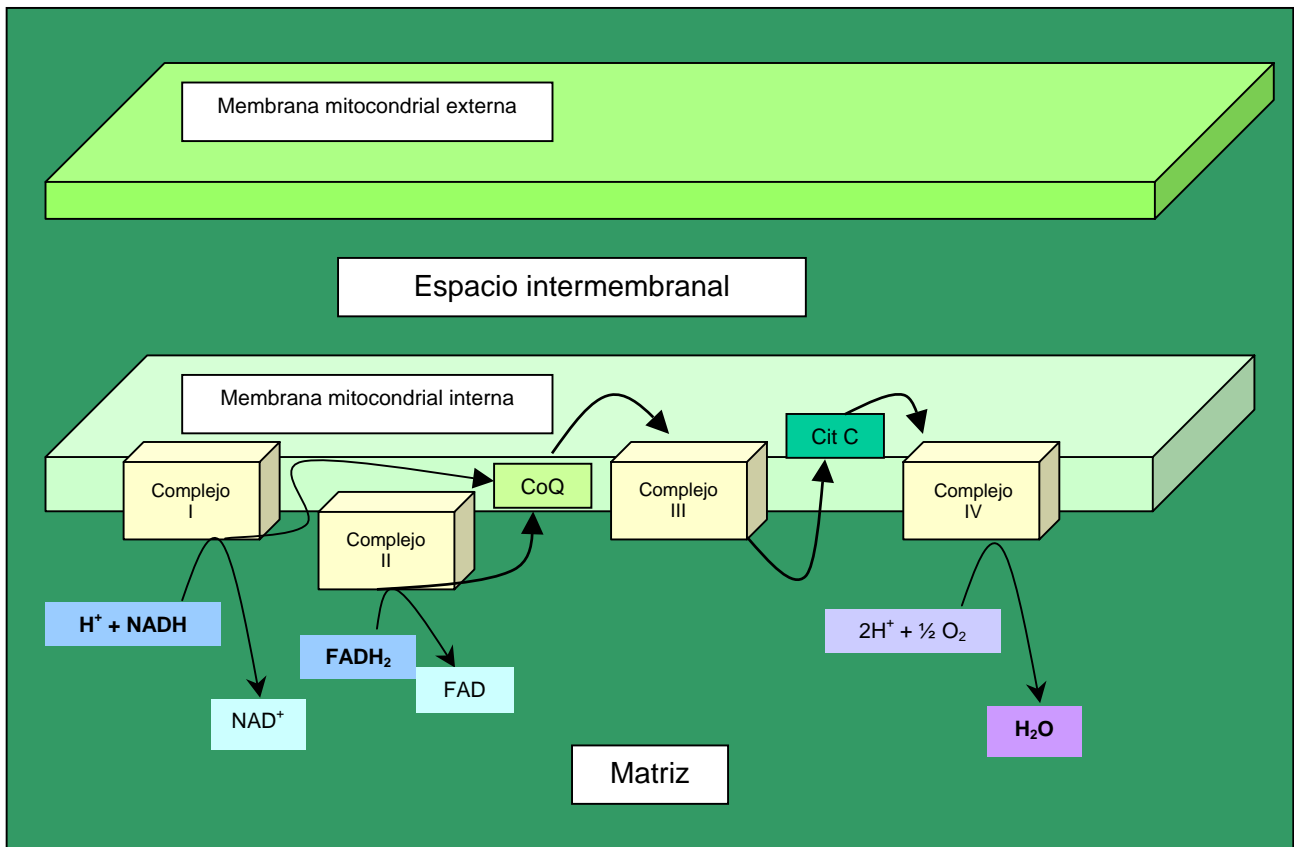
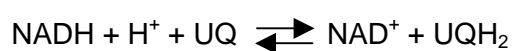


Figura 5. Esquema de la entrada y recorrido de los electrones en la cadena respiratoria mitocondrial.

Los electrones se incorporan a la cadena respiratoria por dos vías. La más importante es por el complejo I o NADH-ubiquinona reductasa. La totalidad del complejo está incrustada en la membrana mitocondrial interna y orientado de modo que su sitio de fijación del NADH mira hacia la matriz para poder interactuar con él. Aquí llegan los electrones cedidos por el NADH procedente de algunas reacciones metabólicas. La reacción global catalizada por el complejo I se podría simplificar:

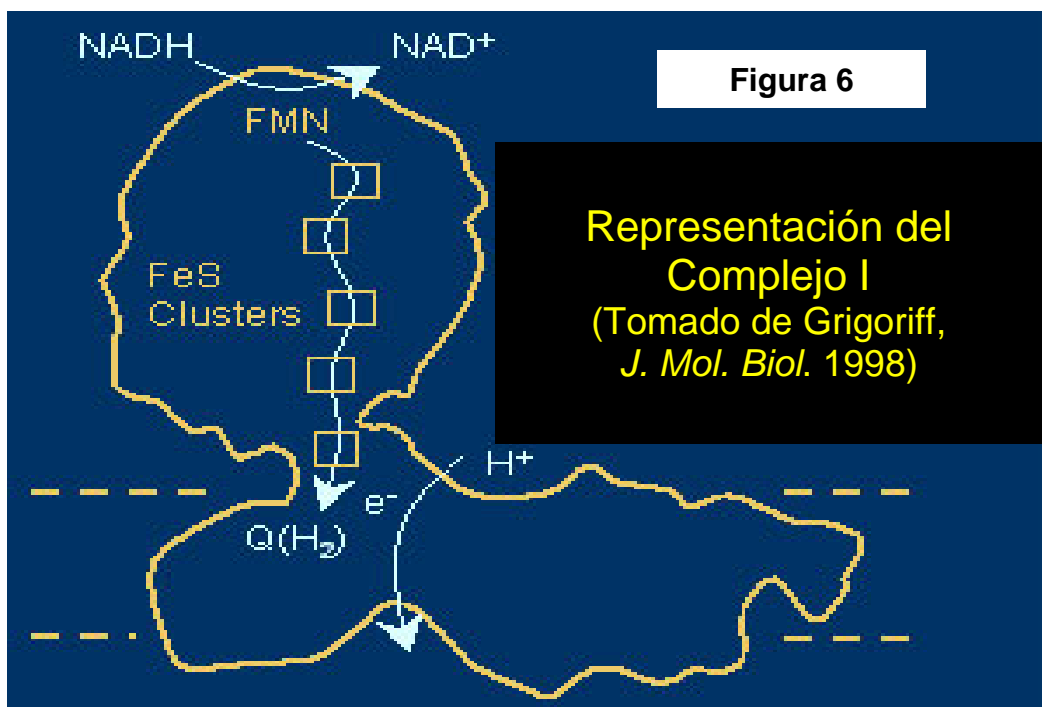


UQ es la ubiquinona oxidada, que acepta un ion hidruro del NADH y un protón del agua disolvente de la matriz. El complejo transfiere dos equivalentes de reducción

desde el NADH a su grupo prostético (FMN). De aquí pasarán a los centros ferro-sulfurados, y de ahí a la ubiquinona. Como consecuencia de todo este proceso, el complejo I es capaz de bombear protones al espacio intermembranal y crear un gradiente de protones. El amital, la rotenona y el antibiótico piericidina A inhiben el flujo electrónico hasta la ubiquinona.

Por microscopía electrónica se ha visto que el complejo I tiene forma de L (Figura 6) con dos dominios separados por un estrecho collar (Guenebaut *et al.*, 1998; Grigorieff, 1998). Es el más grande de toda la cadena respiratoria. Contiene 42 ó 43 subunidades diferentes con una estequiometría no conocida, un mononucleótido de flavina, lípidos unidos covalentemente, siete u ocho centros ferro-sulfurados y al menos tres moléculas de ubiquinol (Walker, 1992; Skehel *et al.*, 1998).

La otra vía por la que se incorporan electrones a la cadena respiratoria mitocondrial es por el succinato, un intermediario del ciclo de Krebs. Este los cede al complejo II o succinato-ubiquinona reductasa. El complejo consta de varios grupos ferro-sulfurados, nucleótidos de flavina (FAD) y un citocromo b por el que está anclado a la membrana. A diferencia del complejo I, el complejo II no es capaz de crear gradiente de protones en el espacio intermembranal (Hägerhäll, 1997).



La cesión de electrones por el complejo I o por el complejo II convergen en un punto común, la ubiquinona-complejo III. La ubiquinona cede los electrones al citocromo bc_1 , el mejor conocido de los enzimas respiratorios mitocondriales. Esta reacción redox está acoplada a la generación de un gradiente de protones a través de la membrana conocido como ciclo Q. Esto se debe principalmente a la ubiquinona, una molécula liposoluble con gran capacidad para desplazarse por el interior de la membrana y a la orientación asimétrica del complejo. La reacción redox de la ubiquinona-ubiquinol está asociada a un proceso de protonación-desprotonación, por lo que se consigue que al oxidarse el ubiquinol se transporte un ion hidrógeno a través de la membrana (Smith, 1998; Saraste, 1999). El complejo III de los mamíferos tiene once subunidades, entre ellas una proteína ferro sulfurada, un citocromo b_{562} , un citocromo b_{566} y un citocromo c_1 . La subunidad clave es uno de los citocromos b, que tiene una estructura compuesta de ocho hélices transmembrana con dos grupos hemo rodeadas por dos esas hélices, una proteína ferro-sulfurada asociada a la membrana con un centro tipo Rieske (Fe_2S_2) y con un citocromo c_1 anclado a membrana también. Las otras ocho subunidades son pequeñas proteínas que rodean el núcleo de metaloproteínas (Zhang *et al.*, 1998).

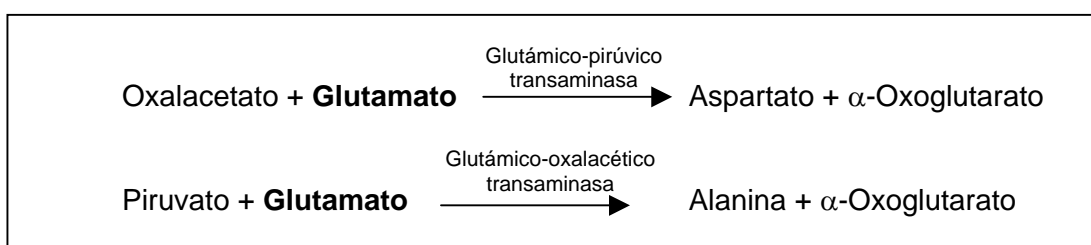
Del complejo III hay una transferencia de los electrones al citocromo c, que hace de intermediario hasta el complejo IV o citocromo oxidasa. Este enzima está compuesto de trece subunidades (Tsukihara *et al.*, 1996), de las que las tres mayores están codificadas por el DNA mitocondrial, mientras que las otras diez rodean el centro funcional del enzima. En este complejo se produce la transferencia de los electrones al oxígeno, para obtener agua. También se va a crear un gradiente de protones transmembrana, pero el mecanismo va a ser diferente al del citocromo bc_1 . Los electrones que vienen del citocromo c son cedidos al centro activo del enzima, que contiene hierro y cobre y son utilizados en reducir una molécula de oxígeno a dos moléculas de agua. Los protones que se necesitan para esta reacción son bombeados a través de la membrana, aunque el mecanismo preciso no se conoce todavía .

Como se ha explicado antes, tanto en el complejo I, como en el III y en el IV, hay una translocación de protones al espacio intermembranal. El enzima que aprovecha esta circunstancia para producir ATP es la ATP sintasa, F_1F_0 ATPasa o complejo V. Contiene 16 subunidades (Lutter *et al.*, 1993) y una masa mayor de 500 kDa. El sector intermembranal es el F_0 y es el canal del protón. Está unido al componente catalítico (F_1), localizado en la matriz mitocondrial, que tiene cinco subunidades (α , β , γ , δ y ϵ en una estequiometría de 3:3:1:1:1). Por lo que se sabe hasta ahora, la subunidad β tiene actividad catalítica y en ella hay tres sitios activos. Cada sitio pasa un ciclo de tres

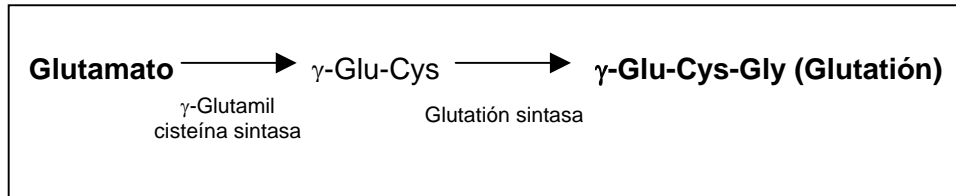
estados diferentes (“open”, “loose” y “tight”, que corresponden a un estado vacío, con ADP y fosfato unido y con ATP unido), pero siempre han de estar en estado diferente unos de otros (Boyer, 1993; 1997). El enzima ATP sintasa es una bomba de protones dependiente de ATP actuando de forma inversa, de forma que el flujo de protones promueve la reacción entre el ADP y el fosfato. La teoría que explica este suceso es la teoría quimiosmótica. Como se ha dicho antes, la transferencia de electrones va acompañada de un paso de protones al espacio intermembranal, lo que ocasionará una diferencia de concentración de protones (consecuentemente de pH). La energía acumulada (fuerza protón-motriz) se utiliza para sintetizar ATP a partir del flujo pasivo de protones por el poro que forma F_0 . No se conoce con exactitud la forma en la que el ATP es sintetizado (Saraste, 1999) y quizá el conocimiento exacto de la estructura tridimensional del enzima pueda ayudar mucho en esta cuestión.

4. Glutamato.

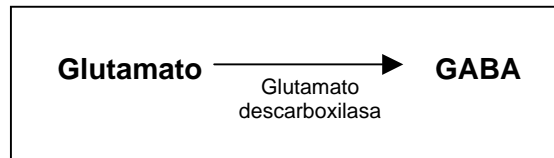
Vimos anteriormente que en los procesos isquémicos, tras la caída de ATP, comienza irremediabilmente el aumento de la concentración extracelular de este aminoácido. El glutamato es un aminoácido no esencial con un segundo grupo carboxilo en la cadena lateral, lo que le hace tener una carga neta negativa a pH 7. Esta carga negativa le hace estar presente en las regiones de interacción de muchas proteínas y en los centros catalíticos de algunos enzimas (proteasas ácidas, metaloproteasas,...) También tiene unas funciones metabólicas, como la síntesis de glutamina, prolina, arginina, glutatión o GABA, detoxificación de amonio o intermediario del Ciclo de Krebs al ser precursores del α -cetoglutarato.



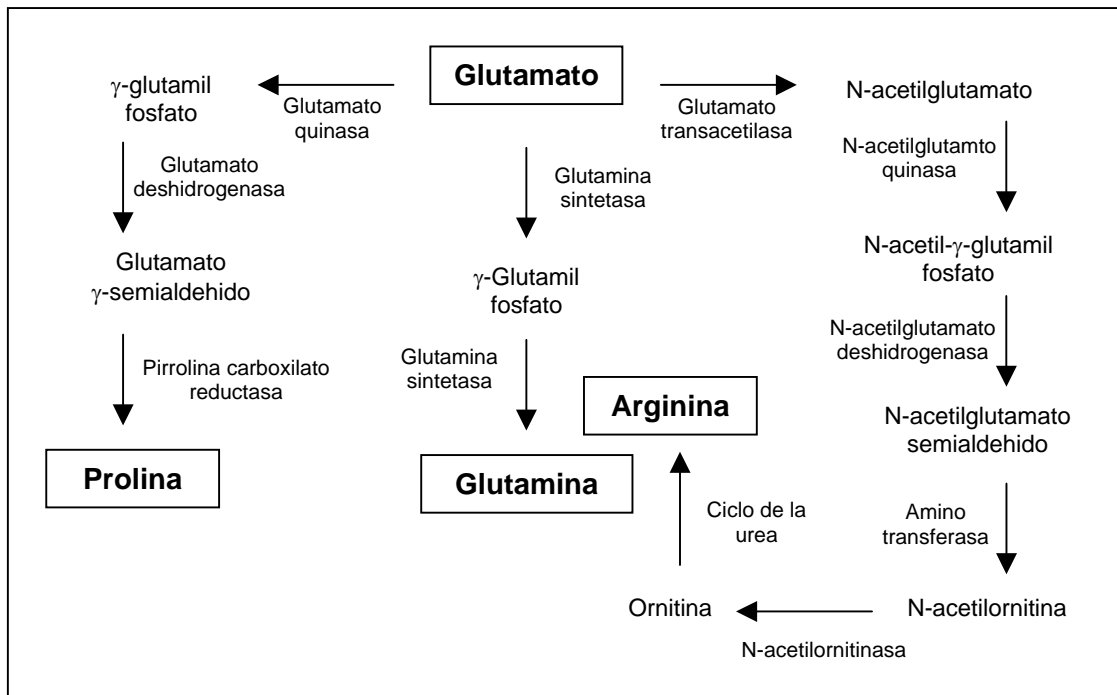
Reacciones de transaminación.



Reacción de síntesis de glutathión.



Reacción de síntesis del ácido γ -aminobutírico (GABA).



Reacciones de síntesis de α -aminoácidos.

Además de las funciones clásicas estructurales y metabólicas de estas moléculas, tiene una función imprescindible como neurotransmisor (Cotman *et al.*, 1981; Marmo, 1988). Se demostró por primera vez en crustáceos y años más tarde en mamíferos, aunque no fue fácil de demostrar, ya que el glutamato es intermediario de muchas reacciones. Actualmente se sabe que el glutamato cumple los requisitos para ser considerado un neurotransmisor: a) Está localizado presinápticamente en neuronas específicas y es liberado desde vesículas; b) es liberado por un mecanismo calcio-

dependiente ante algunos estímulos; c) existe un mecanismo de recaptación; d) hay una identidad farmacológica con la transmisión que ocurre normalmente.

En procesos fisiológicos este aminoácido excitador no supera una concentración (0,1-1 μ M) gracias a la acción de los recaptadores-transportadores que “limpian” el espacio intersináptico. Cuando esto no ocurre, se acumula glutamato, como sucede en la isquemia cerebral (Olney *et al.*, 1969). Ahora se verán los aspectos más importantes de este aminoácido en la enfermedad cerebrovascular. Para entender mejor lo anteriormente dicho se explicará a continuación el funcionamiento y los tipos de transportadores de glutamato que se conocen hasta el momento.

i) Funcionamiento y tipos de transportadores de glutamato.

Hasta la fecha los subtipos de transportadores de glutámico se han clasificado en tres grandes grupos (Robinson, 1999):

- El primero de ellos es de localización vesicular y está acoplado a la hidrólisis de una molécula de ATP. Parece ser que su misión es la de “empaquetar” el glutamato en las vesículas que posteriormente serán liberadas tras la despolarización del terminal sináptico (Maycox *et al.*, 1990). Este transportador no está localizado en la membrana plasmática pero colabora indirectamente a la recaptación de glutamato desde el espacio extracelular, ya que disminuye la concentración de este en el citoplasma al introducirlo en vesículas.

- El segundo grupo está situado en la membrana plasmática. Sería el transportador dependiente de cloro y ha sido caracterizado tanto en sinaptosomas (Zaczek *et al.*, 1987) como en células de glioma en cultivo (Waniewski *et al.*, 1984). Aunque está localizado en la membrana plasmática, no parece que su función sea la de aumentar la concentración de glutamato en el interior de la célula. Se le atribuye una función de intercambio de aminoácidos.

- El tercer tipo de transportador es el dependiente de sodio y al igual que el segundo tipo, está situado en la membrana plasmática. Se distingue del resto por su selectividad iónica, su distribución regional y su sensibilidad para inhibirse por análogos del ácido aspártico y glutámico. Debido a estas características y a su gran capacidad de

transporte se considera el principal responsable de la recaptación extracelular de glutamato. Todo esto justifica que sea este tipo de transportador el más estudiado.

ii) Características del recaptador de glutámico sodio-dependiente.

Ya en el año 1992, tres grupos clonaron casi simultáneamente tres tipos de transportadores de glutamato sodio-dependiente. En primer lugar, se aisló y clonó por métodos bioquímicos el cDNA de un transportador (Pines *et al.*, 1992) clasificado como GLT-1 (Glutamate Transporter). A continuación, se clonó a partir de una genoteca de intestino de conejo (Kanai *et al.*, 1992) el cDNA de un transportador que se llamó EAAC-1 (Excitatory Amino Acid Carrier). Un tercer grupo (Storck *et al.*, 1992) dio con el cDNA de una proteína a partir de la purificación cromatográfica de una galactosiltransferasa que no lograban obtener. Esta proteína que contaminaba su transferasa era lo que se denominó GLAST (Glutamate and Aspartic Transporter). La similitud de la secuencia génica (~50%) de estas tres proteínas dio que pensar que se trataba de una familia de proteínas.

Una vez clonados estos tres transportadores no pasó mucho tiempo hasta que se empezaron a clonar los homólogos humanos. Para unificar la nomenclatura y por comparación de su secuencia (Arriza, *et al.* 1994) se denominaron EAAT (Excitatory Amino Acid Transporter). GLAST-EAAT1, GLT1-EAAT2 y EAAC1-EAAT3. Es muy importante la localización de cada subtipo de transportador. Así el EAAT-1 y EAAT-2 son mayoritarios en glía, mientras que el EAAT-3 (EAAC-1) lo es en neuronas. A partir de aquí se han encontrado otros dos transportadores en mamíferos, denominados EAAT-4 y EAAT-5. Realmente, hasta la fecha podemos decir que basándonos en la similitud secuencial hay un homólogo de EAAT-1, dos de EAAT-2 y otros dos de EAAT-3. También se conocen variantes de splicing del GLT-1 (Utsunomiya-Tate *et al.*, 1997). Actualmente se está trabajando en la clonación de todos estos transportadores en ratón, con la idea de obtener ratones modificados genéticamente. Esto podría dar mucha información sobre la función y ubicación de esta familia de transportadores (Tanaka, 1997; Peghini *et al.*, 1997; Hakuba *et al.*, 2000). Lo que si se sabe es que estos transportadores están regulados por distintos sistemas como el peroxinitrito, la proteína quinasa C (Trotti *et al.*, 1997; 2001a) o la proteína quinasa A (Pisano *et al.*, 1996).

También se sabe que alteraciones genéticas en los transportadores están muy relacionadas con enfermedades neurodegenerativas en humanos y no sólo en la isquemia cerebral. Esto ocurre en la esclerosis lateral amiotrófica (ALS), donde se ha

visto que hay una mutación puntual de un residuo de asparagina por uno de serina en la región de glicosilación del transportador EAAT-2 (Trotti *et al.*, 2001b). La consecuencia es un peor funcionamiento del transportador y una acumulación de glutamato en estos pacientes responsable de muchos de los síntomas de esta enfermedad.

Las secuencias de los distintos cDNA codifican polipéptidos de 500 a 600 aminoácidos. Tanto los eucariotas como los procariotas mantienen una secuencia consenso en la mitad de la región carbono terminal (AAXFIAQ) y esto se ha intentado relacionar con la región encargada de la translocación del sustrato y del paso de los iones. Al modificar los residuos de cisteína próximos a esta región se vio que no había cotransporte. Se determinó que esta región tenía una forma específica (*reentrant loop*) que era compartida por muchos canales iónicos (MacKinnon, 1995), de manera que forma un poro de translocación que permite la entrada sustratos y de iones (Seal y Amara, 1998). Todavía harán falta otras técnicas como la cristalografía de rayos X para determinar la estructura exacta de esta proteína.

Lo que se sabe hasta ahora del funcionamiento de estos transportadores se conoce bien gracias a estudios principalmente de electrofisiología, ya que es un proceso electrogénico. Hay un cotransporte al interior celular de dos ó tres átomos de sodio, un protón y una molécula de glutamato a través de la membrana. El ciclo se cierra con un átomo de potasio que sale fuera de la célula. (Figura 7).

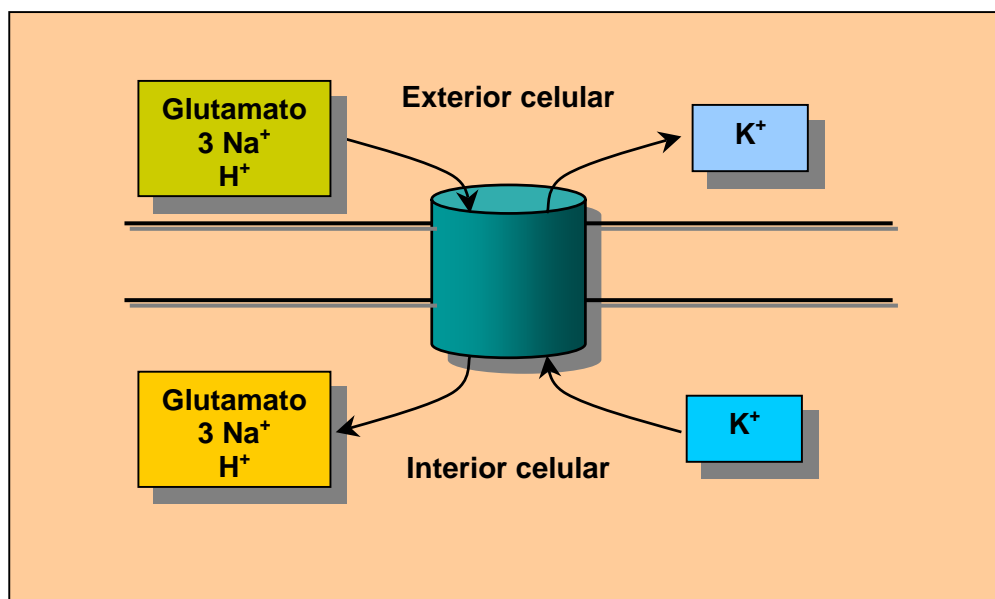


Figura 7. Recaptador de glutamato sodio-dependiente.

La fuerza que hace que funcione este transportador se deriva del gradiente electroquímico, principalmente del originado por el sodio. Es decir, de la concentración de sodio que haya en el exterior dependerá la capacidad del transportador para recaptar el glutamato del espacio extracelular. Si la membrana se despolarizase por alterar la concentración de sodio, como sucede en la isquemia, disminuiría la velocidad de transporte del transportador (Kanai *et al.*, 1994) o desaparecería. Otro dato que se ha observado en este transportador es el cotransporte que se puede dar de una molécula de cloro. Esta molécula de cloro entraría en algunas ocasiones junto con el glutamato y el sodio (Fairman *et al.*, 1995) y su misión sería la de evitar una despolarización de la célula que haría que el transportador funcionase peor.

Se ha calculado hasta qué punto puede variar la velocidad de transporte en función de la concentración de los distintos iones (Zerangue *et al.*, 1996). La medición se hizo en función del potencial de reversión de la corriente. Así, por cada diez veces que esté aumentada el gradiente de concentración de protones, L-glutamato, potasio o sodio, el potencial cambia en 25mV, 30mV, -30mV o 100mV respectivamente. Con esto se puede explicar por qué cuando han fallado las bombas iónicas y la concentración de iones está alterada de forma extraordinaria, como ocurre en un proceso isquémico, el transportador se revierte y empieza a funcionar al revés. La célula empieza a liberar glutamato al exterior. La reversión del transportador será de gran transcendencia en el proceso isquémico, como se verá a continuación.

iii) Liberación.

Desde hace algunos años se vienen proponiendo cuatro mecanismos (además de la liberación por rotura celular) como los posibles en la liberación de glutamato tras un proceso de isquemia:

1. Liberación vesicular calcio dependiente. (Dreier *et al.*, 1985; Katchmann *et al.*, 1993). Esta liberación se da en principalmente en neuronas. La entrada de calcio por canales específicos voltaje dependiente (en los terminales presinápticos el canal mayoritario es el tipo N, seguido del tipo L) es el responsable de esta liberación. Los canales de calcio están situados en zonas muy próximas a sus sitios activos, lo que hace que la respuesta sea inmediata. Esta forma de liberación se produce en los primeros momentos de la isquemia y no es mantenida mucho tiempo por ser un

proceso altamente dependiente de ATP. Cuando el cociente ATP/ADP disminuye por debajo de lo normal se inhibe este tipo de liberación (Sanchez-Prieto *et al.*, 1988).

2. Liberación a través de los llamados canales aniónicos de hinchamiento. (Kimmelberg *et al.*, 1990; Bednar *et al.*, 1992). Es característica de astrocitos y se produce en medios hipotónicos, lo que hace que se hinchen y se libere el glutamato de su interior.
3. Liberación por los astrocitos en un proceso sensible a indometacina. (Bezzi *et al.*, 1998). Este tipo de liberación se ha observado en astrocitos, es calcio dependiente y está mediada por prostaglandinas (principalmente la PGE₂). Al inhibir la síntesis de estas prostaglandinas con indometacina, no se produce la coactivación de los receptores AMPA-kainato y metabotrópicos y no hay entrada de calcio a la célula que produzca la liberación del glutamato.
4. Liberación por reversión del transportador. (Nicholls *et al.*, 1990; Szatkowski *et al.*, 1990; Rossi *et al.*, 2000). Fundamentalmente en neuronas.

Recientemente se ha comprobado que el mecanismo mayoritario en este proceso es el correspondiente a la reversión del transportador (Jabaudon *et al.*, 2000; Rossi *et al.*, 2000). Como se ha explicado antes, tras la caída de los niveles de ATP hay un fallo energético que conduce irremediablemente al fallo de las bombas iónicas encargadas del mantenimiento del gradiente electroquímico de membrana. Todo esto va a tener como consecuencia la reversión del transportador de glutamato como intento compensatorio de reponer la situación más favorable para la célula. Tratará de sacar el sodio de su interior y meter el potasio que falte hasta alcanzar el potencial de membrana normal. El problema es que esto lo hará la célula sacando más glutamato al medio extracelular (Jabaudon *et al.*, 2000), con lo que aumentará la concentración de este aminoácido y se potenciarán los efectos deletéreos del glutamato (Choi, 1988).

Hipótesis y objetivos.

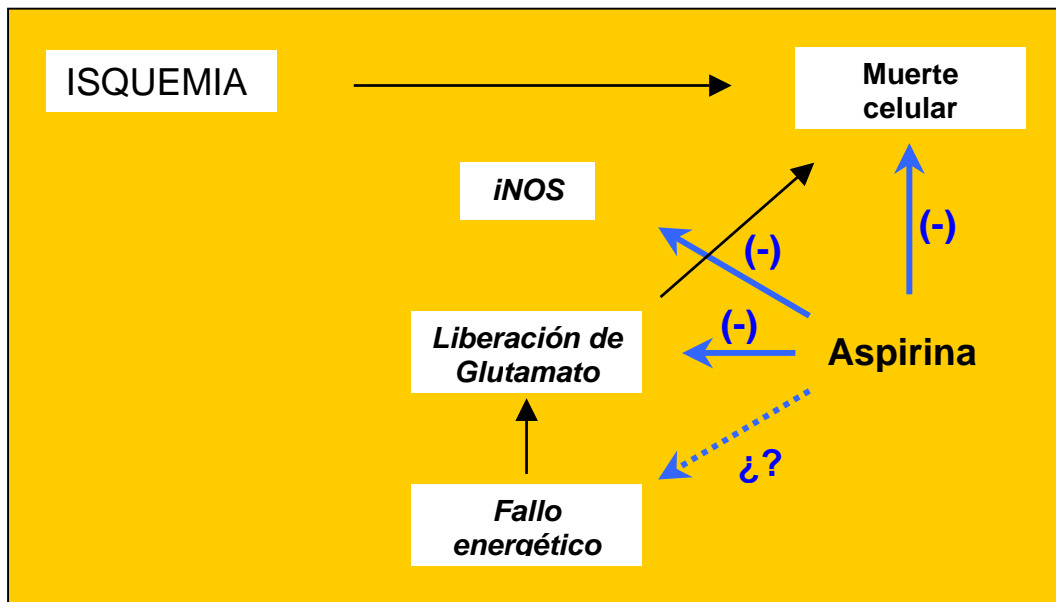
Nuestro grupo había demostrado en un modelo “*in vitro*” de isquemia cerebral experimental, utilizando rebanadas de cerebro anterior de rata expuestas a privación de oxígeno y glucosa, los siguientes hechos:

- a. Que en dicho modelo se produce, tras la privación de oxígeno y glucosa, una liberación de glutamato (Cárdenas *et al.*, 2000a).
- b. Que la liberación de glutamato interviene en la expresión de iNOS. (Cárdenas *et al.*, 2000a).
- c. Que la expresión de iNOS interviene en la muerte neuronal secundaria a la isquemia experimental (Cárdenas *et al.*, 2000b).

Además se sabía por otros autores que:

- d. La aspirina reduce el tamaño de los infartos (Grotta *et al.*, 1985; Carolei *et al.*, 1986). Tradicionalmente esto se ha atribuido a su capacidad de inhibir la ruta de la ciclooxygenasa y consecuentemente la agregación plaquetaria.
- e. Más recientemente, se han descrito otros mecanismos neuroprotectores de la aspirina, como la inhibición de la activación del factor nuclear- κ B (NF- κ B; Kopp y Gosh, 1994) o que es un eficaz captador de radicales libres (Pekoe *et al.*, 1982; Kuhn *et al.*, 1995).
- f. Nuestros datos mostraban un efecto inhibitor de la aspirina sobre la liberación de glutamato en el modelo de rebanadas (Moro *et al.* 2000).

Por tanto, la hipótesis que nos planteamos basándonos en los estudios previos, es que **la aspirina inhibe la liberación de glutamato interfiriendo en alguno de los mecanismos implicados en la liberación de este neurotransmisor tras la isquemia, y por esta causa es neuroprotectora. Además ese efecto neuroprotector es reproducible *in vivo*.**

Figura 20. **Hipótesis.**

Para demostrar el mecanismo de acción neuroprotector de la aspirina, elegimos el modelo de cultivo primario de neuronas corticales. El objetivo de los estudios *in vitro* es entender qué ocurre *in vivo*, pero acercándose más a la célula y a su interacción con su medio inmediato. Así, los estudios *in vitro* pueden proporcionar claves importantes en el desarrollo de algunos mecanismos. Tienen la desventaja de alejarse mucho de lo que son las condiciones fisiológicas (como es la ausencia de flujo sanguíneo) debido a su simplicidad, pero esa característica los hace tremendamente útiles a la hora de estudiar algunos procesos con un menor número de interferencias. Este modelo nos permitió estudiar los mecanismos de acción de la aspirina de forma aislada y controlada. En nuestro caso teníamos mayoritariamente neuronas corticales, sin que ningún otro grupo celular interfiriese significativamente en la evolución del proceso. En este sistema, los objetivos fijados fueron:

1. **Corroborar que en nuestro modelo se producían los mismos efectos que en el modelo de rebanadas, es decir, liberación de la liberación de glutamato y neurodegeneración.**
2. **Demostrar el papel neuroprotector de la aspirina.**
3. **Estudiar farmacológicamente la liberación de glutamato y los mecanismos implicados.**

Para la demostración de su efecto *in vivo*, elegimos el modelo de la oclusión de la arteria media cerebral (MCAO). Es uno de los modelos más empleados en el estudio de la enfermedad cerebrovascular. Es un modelo de isquemia focal, que debido a su duración y heterogeneidad, es mucho más complejo que la isquemia global. Permite ver una evolución de la lesión durante varios días. Además se pueden estudiar los distintos cambios metabólicos e iónicos que van sucediendo desde el core hasta el tejido intacto, pasando por la penumbra. En el caso de los modelos de isquemia global, esto no es posible, ya que todo el tejido sufre un daño homogéneo y parecido. En el modelo de MCAO, nos planteamos el siguiente objetivo:

- 4. Comprobar que en nuestro modelo *in vitro* hay liberación de glutamato y neurodegeneración.**
- 5. Demostrar el papel neuroprotector de la aspirina.**
- 6. Confirmar que el mecanismo de acción de la aspirina que hemos observado *in vitro*, también se observa *in vivo*.**

Introducción.

Material y métodos.

Resultados.

Discusión.

Conclusiones.

Bibliografía.

Material y métodos.

I. Preparaciones.

I.1. Modelos de isquemia.

I.1.1. In vitro. Cultivos celulares sometidos a POG.

Cultivos primario de neuronas corticales.

Los métodos de obtención, disociación y mantenimiento en cultivo primario de neuronas corticales utilizados en esta Tesis están ampliamente descritos en la bibliografía (Segal, 1983; Moro *et al.*, 1998; Fernández-Tomé *et al.*, 1999).

Obtención de las células. Antes de comenzar la disociación hubo que tratar las placas de cultivo con poli-lisina para mejorar la adherencia de las células a su superficie (Aronica *et al.*, 1993). Las células se obtuvieron a partir de fetos de rata Wistar, de 17 días de gestación. Para ello, se sacrificó la rata por decapitación y se extrajeron los fetos. Se lavaron en el *buffer de lavado* (NaCl 150mM; Na₂HPO₄·2H₂O 8mM; KCl 2,7mM; KH₂PO₄ 1,45mM; NaHCO₃ 2,6mM; pH=7,2) y se pasaron a una placa que contiene un medio de disección comercial, L-15, donde se obtuvieron las cortezas cerebrales. Una vez aislado el cortex, es imprescindible retirar las meninges antes de homogeneizar. Las cortezas limpias se trasladaron a la placa que contenía lo que llamamos *medio de incubación* (80% (v/v) MEM (Minimum Essential Medium), 10% (v/v) suero de caballo, 10% (v/v) suero fetal, 1,98mM glutamina, 3,3mM glucosa y 16mg/L gentamicina sulfato). El tejido se disgregó y homogeneizó mecánicamente.

Siembra. Tras la homogeneización, se realizó el conteo del número de células obtenidas. Para contar se empleó el método de exclusión del Azul Tripán en una cámara Neubauer (Keith *et al.*, 1979). Una vez conocida la cantidad de células que obtenidas, se suspendieron en *medio de incubación* hasta la densidad requerida, que en nuestro caso fue de 2×10^5 células/cm². Se sembraron en placas multipocillos Petri de 12 unidades ($\varnothing=2,2$ cm).

Mantenimiento. Durante los cuatro primeros días, las células se mantuvieron en el *medio de incubación*. Al cuarto día se cambió por un *medio de crecimiento* (90% (v/v) MEM, 10% (v/v) suero de caballo, 1,98mM glutamina, 3,3mM glucosa y 16mg/L gentamicina sulfato), que

además llevaba un citostático, la citosina arabinósido (10^{-5}M) para impedir el crecimiento de células que proliferan como la glía (Courtney *et al.*, 1992). A la semana de haberlas sembrado se volvió a cambiar el medio para poner de nuevo *medio de crecimiento*, pero esta vez sin citosina. Con este tratamiento se obtuvo un cultivo mayoritariamente neuronal, aunque con un 5% aproximadamente de población glial.

Cultivos enriquecidos con glía.

Para la obtención de un cultivo con población mayoritariamente glial, el procedimiento que se siguió fue similar al de la obtención de neuronas con alguna modificación. La densidad de siembra fue de 5×10^4 células/cm² y no se añadió citosina arabinósido al cuarto día de haber sembrado. De esta forma, se permitió la proliferación y crecimiento de la glía. El porcentaje de cada población celular fue de: $15 \pm 3\%$ neuronas, $75 \pm 8\%$ astrocitos y $10 \pm 2\%$ microglía. Además, los experimentos se llevaron a cabo a las dos semanas de la siembra.

Caracterización de la población celular de los cultivos.

Se fijaron las células e incubaron con el anticuerpo correspondiente para su posterior identificación. Para la identificación de los astrocitos se empleó el anticuerpo monoclonal anti-GFAP (glial fibrillary acidic protein o proteína fibrilar glial ácida) diluido 1:100 en PBS (buffer salino tamponado con fosfato a pH 7,4), mientras que para la localización de microglía se empleó lectina de tomate (biotina conjugada de aglutinina de *Lycopersicon esculentum* marcada con fluoresceína) diluida 1:150 en PBS. En el caso de los astrocitos hizo falta un fluoróforo como anticuerpo secundario monoclonal, que fue el CyTM2-antiIgG de ratón 1:250 en PBS. La incubación con los anticuerpos se llevó a cabo en atmósfera húmeda y a temperatura ambiente. Las células se mantuvieron con el anticuerpo primario anti-GFAP o con la lectina durante 1 hora. Transcurrido este tiempo, se lavaron con PBS y en el caso de los astrocitos se incubaron con el anticuerpo secundario durante otra hora y en las mismas condiciones de humedad y temperatura que el primario. Tras este tiempo, se lavó de nuevo con PBS y se tomaron las fotografías correspondientes.

Las neuronas se localizaron, en cuatro campos escogidos al azar, como células GFAP negativas, aglutinina de *Lycopersicon esculentum* negativas y apariencia birrefringente en contraste de fases. Se empleó un microscopio confocal (MRC1024; BioRad) para la identificación y fotografía de las distintas poblaciones celulares (Figura 8).

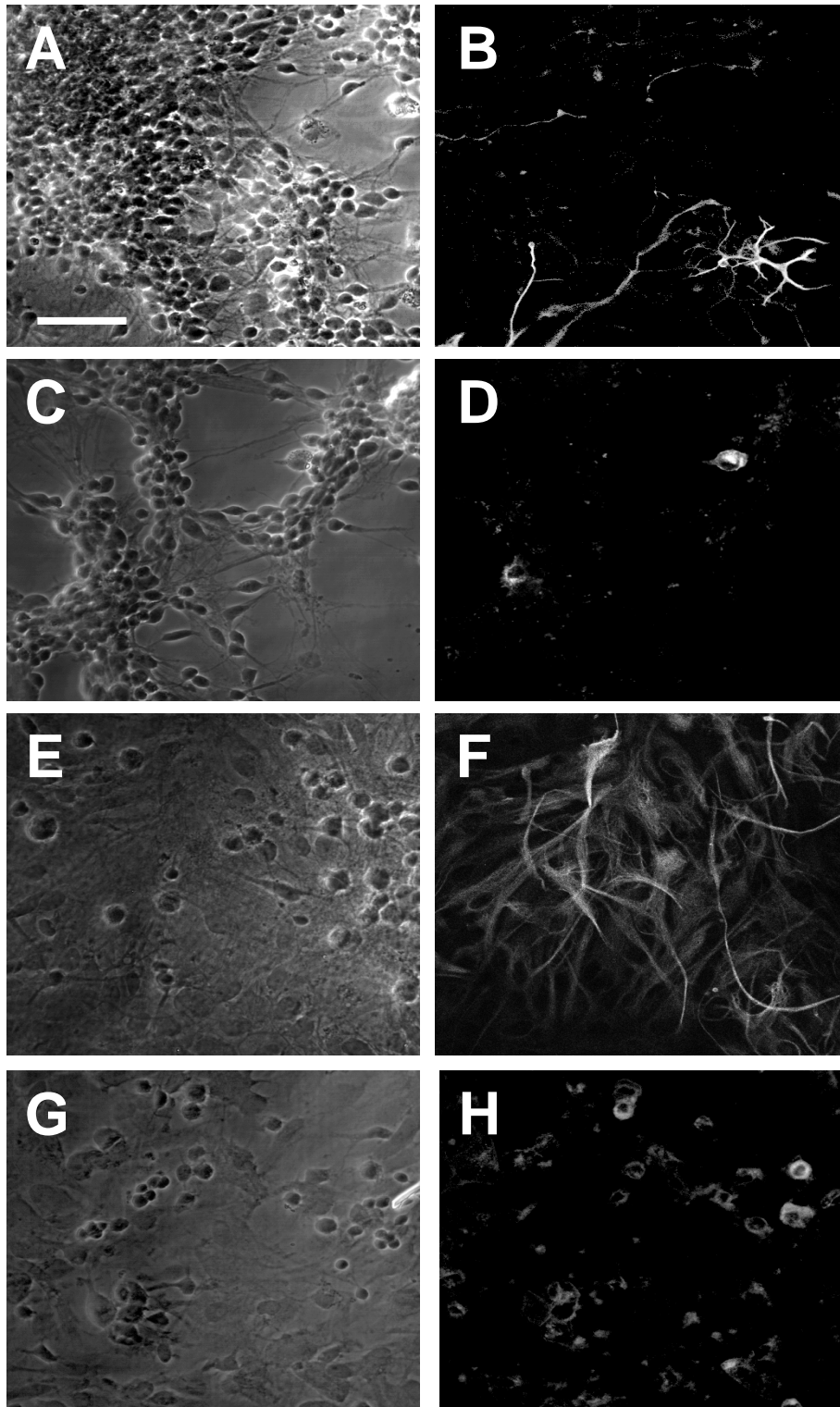


Figura 8. Caracterización del cultivo. **A-D)** Cultivo primario de neuronas corticales. Micrografía en contraste de fases (**A,C**) de un cultivo representativo de neuronas corticales y sus correspondientes micrografías mostrando astrocitos teñidos con anti-GFAP (**B**) o mostrando microglía teñida con FITC/*Lycopersicon esculentum agglutinin* (**D**). **E-H)** Cultivo primario de neuronas corticales enriquecido con glía. Micrografía en contraste de fases (**E,G**) de un cultivo representativo enriquecido con glía y sus correspondientes micrografías de fluorescencia mostrando astrocitos (**F**) o microglía (**H**). Escala 50 μ m.

Privación de oxígeno y glucosa (POG) y exposición a glutamato.

Los experimentos se llevaron a cabo a los nueve o diez días de la siembra. Para simular una isquemia *in vitro* se realizó una privación de oxígeno y glucosa (**POG**), en una cámara (Forma Scientific) a 37°C, en ausencia total de glucosa y en una atmósfera anaeróbica de nitrógeno (95%N₂/5%CO₂). Antes de comenzar cualquier tratamiento se lavaron las células dos veces con el buffer que se empleó durante la POG, el “*buffer de isquemia*” (NaCl 130mM; KCl 5,4mM; Cl₂Ca 1,8mM; MgCl₂ 0,8mM; NaH₂PO₄·H₂O 1mM; NaHCO₃ 26mM; pH=7,2) para retirar el *medio de crecimiento*. Durante la POG se mantuvo constante la presión y temperatura del sistema (0,5 psi en el manómetro de salida del circuito). Los grupos control conservaron durante el mismo tiempo una atmósfera aeróbica con *buffer de glucosa* (igual que el *buffer de isquemia*, pero que contiene 33mM de glucosa).

Al acabar el tiempo de POG, las células se lavaron con un *medio de reperfusión* (igual que el *medio de crecimiento*, pero cambiando la gentamicina por 0,15ng/mL de penicilina) dos veces y se dejan con este medio durante el periodo de “reperfusión” las 24 horas posteriores.

Muy importante es destacar que el tiempo de POG en los experimentos de liberación de glutamato fue de 150 minutos. El motivo de escoger 140-160 minutos fue porque se observó que en este tiempo había liberación de glutamato, pero no había liberación de LDH. Así, los experimentos en los que los valores de LDH de los grupos control y POG diferían significativamente no fueron considerados. De esta forma se estaba descartando que la liberación no deseada de glutamato por rotura celular y sus posteriores consecuencias (excitotoxicidad), interfiriese en el estudio de los mecanismos de liberación y el efecto de la aspirina sobre este proceso.

Alternativamente al tratamiento de POG, hubo células expuestas a glutamato. Se incubaron durante 5 minutos con una concentración de glutamato de 10μM en un medio que carecía de magnesio. Posteriormente se cambió el medio y se mantuvo así 24 horas.

Para las medidas de los niveles de ATP, el tiempo de POG escogido fue de 90 minutos. En este tiempo no hubo liberación de glutamato (se comprobó por HPLC), de forma que se evitó que hubiese gasto por exocitosis o por lisis celular (se midió la LDH).

I.1.2. In vivo. Oclusión de la arteria media cerebral de rata (OACM/MCAO).

Este modelo de oclusión permanente de la arteria cerebral media fue descrito por primera vez hace veinte años (Tamura *et al.*, 1981), aunque posteriormente ha sido modificado y perfeccionado (Bederson *et al.*, 1986a) hasta ser uno de los modelos *in vivo* más empleados en el estudio de enfermedades cerebrovasculares.

Se emplearon ratas macho Fischer de 230-260 gramos, anestesiadas con halotano 2,5% en una mezcla de 70% nitrógeno/30% oxígeno. Durante todo el proceso se mantuvo el animal a 37°C con una manta térmica para evitar la hipotermia que produce la anestesia. Se afeitó la zona cercana al ojo izquierdo y la zona ventral del cuello y se aplicó yodo para desinfectarlo.

Ligadura de la arteria carótida común. Antes de cauterizar la arteria cerebral media hubo que ligar la arteria carótida común izquierda para mejorar la reproducibilidad del infarto. Se localizó y aisló dicha arteria para ligarla con un hilo de sutura de 3/0, con doble nudo.

Exposición de la arteria cerebral media. El siguiente paso fue la exposición de la arteria media cerebral izquierda a través de una craneotomía en la región temporal. Se hizo una incisión de 1cm perpendicular a la línea que conecta el canto lateral del ojo y el canal auditivo externo para exponer y retraer el músculo temporal. Para evitar un aumento de la temperatura local ocasionado por la fricción del microtorno (Drill Freedom H00) se bañó esa zona con unas gotas de suero salino. Cuando se había debilitado suficientemente el hueso se retiró con unas pinzas finas. Para acceder a la arteria cerebral media hubo que romper y retirar la *dura mater* que la protege externamente.

Cauterización de la arteria cerebral media. Se requiere un alambre muy fino en forma de L, manejado por un micromanipulador (WPI M3301). Con la ayuda de un microscopio binocular (Nikon SMZ-1) se levantó la arteria cerebral media unos milímetros. De esta forma se redujo el flujo de sangre que llegaba a esta arteria para facilitar la cauterización (Geiger Model 100). La cauterización se hizo bañando con unas gotas de suero salino la zona. Así, el líquido y el alambre caliente fueron los que cauterizaron la arteria y no el cauterizador directamente, que podría romperla.

Una vez terminado este paso, se retiró el alambre y se cortó con unas tijeras pequeñas la arteria cauterizada para evitar una recanalización. Después se cerró la herida y se aplicó un

lubricante ocular ya que es probable que el ojo izquierdo se viese afectado. El animal se mantuvo con acceso al alimento y a la bebida *ad libitum*. La operación duró entre 30 y 45 minutos, y todos los procedimientos están conformes con el Comité de Cuidados Animales de la Universidad Complutense de Madrid según la normativa de la Unión Europea (DC86/609/CEE).

El procedimiento fue básicamente el mismo para el grupo de animales SHAM. Se empleó la misma anestesia. Se aisló la arteria carótida común, aunque no se ligó y se hizo la craneotomía en la región temporal, pero no se cauterizó la arteria cerebral media.

Implantación de la cánula de microdiálisis.

Se emplean ratas Fischer macho de 240-260g. Como anestesia se utiliza halotano 2,5% en una mezcla de 70% nitrógeno/30% oxígeno y los animales se fijan en un estereotáxico Kopf con la barra dental -3,3mm por debajo del cero interaural. La sonda de microdiálisis (3,5mm x 240 μ m; Cuprophan) se implanta 24 horas antes de la MCAO en el estriado izquierdo en las siguientes coordenadas: +1,0mm anteroposterior, +3,0mm mediolateral de bregma y 8,0mm dorsovental desde la superficie del cerebro (Paxinos *et al.*, 1986). La sonda se fija con cemento dental al cráneo según está descrito por Baldwin *et al.* (1994) y su correcto emplazamiento se comprueba después del experimento. Se perfunde líquido cefalorraquídeo artificial (KCl 2,5mM; NaCl 125mM; MgCl₂·6H₂O 1,18mM; CaCl₂·2H₂O 1,26mM) a un flujo constante de 1 μ L/min.

Antes de comenzar la operación de MCAO se permite que se equilibre el sistema durante una hora. Tras este tiempo se toman tres muestras para establecer un valor basal de glutamato y se comienza la MCAO. A partir de su finalización se toman muestras cada 30 minutos hasta un total de ocho horas. Estas muestras se procesan en la HPLC. El *recovery in vitro* se hace de 1ng/ μ L de glutamato y en nuestro caso, nuestra sonda es capaz de recoger un $20,5 \pm 1,5\%$ (n=6) del glutamato liberado en esa región.

I. 2. Otras preparaciones.

Aislamiento de mitocondrias y partículas submitocondriales de cerebro de rata.

Las mitocondrias y partículas submitocondriales se prepararon según Lizasoain *et al.* (1996). Se sacrificó la rata por decapitación, se extrajeron los cerebros y comenzó la homogeneización troceándolos en *buffer de aislamiento* (KCl 0,15M y KH₂PO₄ 20mM; pH 7,6) en hielo. El tejido troceado se pasó por el homogeneizador (0,25mm) y se centrifugó a 1300 g durante tres minutos a 4°C. El sobrenadante se separó, mientras que el pellet se volvió a resuspender en el *buffer de aislamiento*. El pellet resuspendido se centrifugó en las mismas condiciones que antes y el sobrenadante se mezcló con el anteriormente obtenido. La fracción subcelular se centrifugó a 17000 g durante 10 minutos a 4°C. El pellet se resuspendió de nuevo y se homogeneizó (homogeneizador 0,1mm).

Para conseguir una pureza mayor en la fracción mitocondrial, se centrifugó en gradiente de ficoll (10% p/v en *buffer de aislamiento*) a 45000g durante 45 minutos a 4°C. El pellet se resuspendió de nuevo en el buffer y se centrifugó a 9800 g durante diez minutos a 4°C. Para terminar se ajustó la proteína a 10mg/mL.

Las partículas submitocondriales se obtuvieron sometiendo las mitocondrias a tres ciclos de congelación-descongelación para romper las membranas. En el caso de las mitocondrias hubo que hacer el aislamiento y el experimento el mismo día. Las partículas submitocondriales pudieron mantenerse a -80°C cuatro o cinco días, aunque se detectó pérdida de actividad pasado este tiempo.

II. Determinaciones.

II. 1. Parámetros de viabilidad.

II. 1. 1. MCAO.

Caracterización del tamaño de infarto.

A las 48 horas de la MCAO se sacrificó el animal por dislocación cervical para extraer el cerebro y cortarlo en un molde (Brain Matrix; WPI) en secciones coronales de 2mm de espesor. Estas rebanadas se sumergieron durante 15 minutos a 37°C en una solución de TTC (cloruro de 2,3,5-trifenil-tetrazolio) al 2% (p/v) en tampón fosfato 0,05M. El TTC es una sal de tetrazolio que tiene la capacidad de ser reducido por la cadena respiratoria mitocondrial de forma que cambia de incoloro a rojo (Bederson *et al.*, 1986b). La zona necrosada, al carecer de actividad mitocondrial, no podrá reducir el tetrazolio y no tendrá coloración alguna.

Tras esto, se fotografiaron las secciones con una cámara digital (Nikon CoolPix990. Lexar Compact Flash Card). En la fotografía digital de la sección coronal se vio una región sin color que correspondía a la zona infartada. El área de esta zona se cuantificó calibrando previamente la escala del analizador de imágenes (Scion Image beta 4.0.2). Se midieron las zonas infartadas de los dos lados de cada sección y se sumaron para obtener el área total. Esta cantidad se multiplicó por 1mm, que es la profundidad de cada media sección, de forma que se obtuvo el volumen total de infarto.

II. 1. 2. Cultivos celulares.

Determinación de LDH (Lactato deshidrogenasa).

La lactato deshidrogenasa es un enzima citosólica que se libera al espacio extracelular como consecuencia de la lisis celular (Koh *et al.*, 1987). Para medirla, tras la POG se retira un volumen de medio y se mezcla con la misma cantidad de *buffer fosfato/NADH/piruvato* (concentración final de NADH 350µM; piruvato sódico 900µM; pH 7,4). Se mide la cinética durante 150 segundos a temperatura ambiente en un espectrofotómetro (Beckman DU7500) a

340nm. En esta longitud de onda registramos la desaparición de NADH al oxidarse por la presencia en el medio de LDH. En concreto la reacción es la siguiente:



La LDH se expresa como porcentaje de LDH total. Para calcular este valor se lisaron las células con Tritón X-100 y se midió a 340nm como se ha explicado antes. Este valor junto a los obtenidos previamente a 0, 3 y 24 horas es el valor total de LDH. Así, el valor de LDH liberado se determina: $\text{LDH}(\%) = 100 \times \text{LDH}_{(\text{medio})} / \text{LDH}_{(\text{medio})} + \text{LDH}_{(\text{células})}$

Determinación de MTT (Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio).

El MTT es un marcador de viabilidad a través de la medida colorimétrica de la actividad mitocondrial (Mossmann, 1983; Hansen *et al.*, 1989). Va a medir la capacidad de las mitocondrias de las células de reducir el MTT al colorante formazán. Las células se incuban tras la POG durante 3 horas con una *solución de buffer fosfato/MTT* (12mM de MTT en buffer fosfato a pH 7,4). Transcurrido ese tiempo se retira el medio y se mantienen durante 24 horas con un solubilizante compuesto de dimetilformamida al 40% y SDS al 20%, a pH 4,7. Para determinarlo se mide a 570 nm en un lector de microplacas (Molecular Devices).

Tinción con yoduro de propidio (PI).

Estos experimentos se hicieron para determinar la viabilidad celular tras la POG. El yoduro de propidio se une al DNA de células necróticas, lo que hace que emita fluorescencia roja ($\lambda_{\text{excitación}}=535\text{nm}$, $\lambda_{\text{emisión}}=617\text{nm}$), mientras que las células vivas apenas dan señal (Tanke *et al.*, 1982).

Para estos experimentos las células fueron mantenidas en medio *PGG* durante 30 minutos tras la POG. Después se lavaron con PBS frío y se incubaron en hielo durante 30 minutos con 1µg/mL de yoduro de propidio en PBS. Tras este tiempo las células se pudieron ver y fotografiar con un microscopio de fluorescencia (Nikon Eclipse TE300).

II. 2. Medida de liberación y recaptación de glutamato.

Determinación de glutamato.

La determinación se llevó a cabo por un sistema de HPLC (Perkin Elmer Binary Pump LC250) con detección fluorimétrica (Perkin Elmer LC240), $\lambda_{\text{emisión}}=450\text{nm}$ y $\lambda_{\text{excitación}}=340\text{nm}$, con derivatización pre-columna con o-ftaldehído (Lindroth *et al.*, 1979). El o-ftaldehído se compone de 0,06mM de este producto disuelto, en este orden, en 10% (v/v) de metanol, 89,25% (v/v) de tampón borato (pH 10,5) y 0,75% (v/v) de β -mercaptoetanol. Se empleó una columna de fase reversa C-18 donde se separan los aminoácidos isocráticamente con una fase móvil compuesta de tampón acetato (acetato sódico 0,04M y pH 6,5), 15% metanol y 2% de tetrahidrofurano. El gradiente se hizo con metanol y el área de los picos se obtuvo con un integrador (PE Nelson Model 1020) acoplado al sistema, comparando con el área de patrones externos.

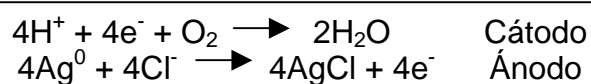
Determinación de la recaptación de [³H]-glutámico en cultivos neuronales.

Para este experimento se incubaron las células en solución control con ácido glutámico frío (3 μ M) y ácido glutámico tritiado (8 μ Ci/mL). Se llevó a cabo durante 90, 180 y 300 segundos para estudiar el proceso en condiciones de linealidad. Al terminar este periodo se lavó rápidamente dos veces con PBS y se lisaron las células a -80°C con ácido perclórico (0,3M). Cada grupo tenía un grupo control en el que se había substituido el sodio equimolecularmente por colina. De esta forma se calculó con una simple resta la recaptación sodio-dependiente llevada a cabo por el transportador. El glutámico recaptado de forma sodio-dependiente se expresa como porcentaje de glutámico total. La determinación se hizo en un contador de centelleo.

II. 3. Determinaciones mitocondriales.

Determinación del consumo de oxígeno de mitocondrias y partículas submitocondriales.

La medida del consumo de oxígeno se realiza con un electrodo tipo Clark (Digital Mode 10 Rank Brothers Ltd). El sistema consta de un electrodo de oxígeno con un ánodo de referencia de plata/cloruro de plata rodeado de un cátodo de platino. Los electrodos están bañados en una solución de KCl saturada, separada de la cámara de reacción por una membrana fina de teflón permeable al oxígeno pero que impide la contaminación de estos. En el cátodo de platino se va a producir la reducción del oxígeno molecular a agua.



El electrodo está conectado a un registrador, de forma que registrará las variaciones en el consumo de oxígeno. Para calibrarlo se llena de agua y se ajusta al 100% (240 μ M de O₂). A continuación se elimina la totalidad del oxígeno del agua con hidrosulfito sódico (Na₂S₂O₄, 174,1g/mol) y se obtiene el 0%. Con esto se podrá establecer la relación entre el registrador y el oxígeno consumido (cm de pendiente por moles de oxígeno consumidos).

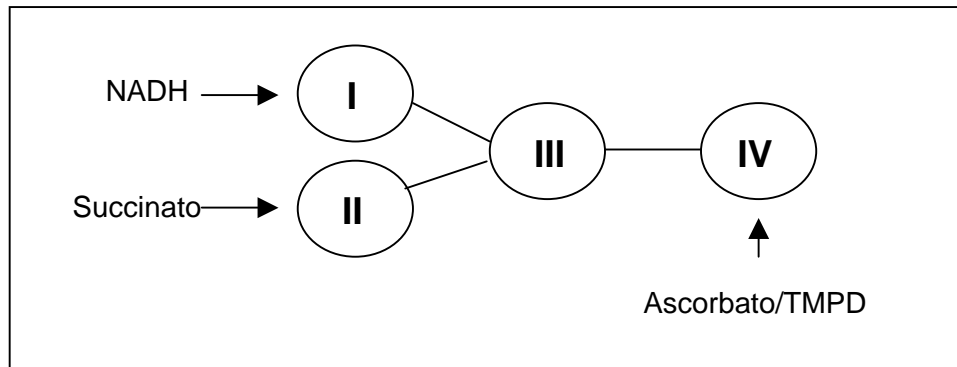
Se calculó la actividad de cada complejo según ya está descrito en la bibliografía (Partridge *et al.*, 1994; Lizasoain *et al.*, 1996). En todas las medidas se realizó el mismo protocolo. La medida en la cámara del electrodo se llevó a cabo sobre 2mL de *buffer de incubación* (KH₂PO₄ 50mM; EDTA·2H₂O 100 μ M; pH 7,2) y mitocondrias o partículas submitocondriales (concentración final 0,5mg/mL). Con una microjeringa se administró 20 μ L del fármaco en estudio (aspirina, salicilato sódico o indometacina) y posteriormente 20 μ L de *substrato específico de cada complejo*. Los resultados se obtuvieron en forma de pendientes, que se transformaron a moles de oxígeno consumidos.

Substratos específicos de cada complejo.

Substrato del complejo I-III. NADH. Concentración final en el electrodo es 50 μ M.

Substrato del complejo II-III. Ácido succínico. Concentración final 5mM.

Substrato del complejo IV. Ascórbico y TMPD (*N,N,N',N'*-Tetrametil-fenilendiamina). En el electrodo 5mM y 0,5mM respectivamente.



Medida del contenido de ATP.

El protocolo está basado en otros previamente empleados (Anderson *et al.*, 1999) aunque fue modificado hasta adaptarlo a nuestro sistema. Está diseñado para hacerlo tanto en tejido como en células como en mitocondrias enteras. En todos los casos se extrajo el ATP en un *tampón de extracción* (ácido tricloroacético 0,3% (p/v) y EDTA disódico 1mM), donde se conserva estable a 4°C. Después se neutralizó en *tampón tris-acetato* (pH 7,75) y para su detección fluorimétrica se empleó una solución de *luciferina-luciferasa* (1,5mg/mL en agua; L0633, Sigma), que reacciona específicamente con ATP. Las concentraciones se determinan mediante una curva patrón desde 10^{-4} hasta 10^{-9} M.

El tejido fresco se obtuvo 15 minutos después de terminar la MCAO, tiempo al que ya se ha producido la caída de ATP. Se seleccionó una porción de tejido, próxima a la lesión, que se homogeneizó en *buffer de extracción*. Se centrifugó a 10000g durante tres minutos a 4°C. El sobrenadante se diluyó 1:1 con *buffer tris-acetato* para neutralizar el medio. Para la detección de ATP se dispuso *luciferina-luciferasa*, que se midió inmediatamente en el lector de luminiscencia (Fluoroskan Ascent FL Labsystems).

Para el caso de células se retiró el medio tras una POG submáxima de 90 minutos y se añadieron 150µL de *solución de extracción*. A los diez minutos se retiró el medio y se mezcló (1:1) para medir el ATP en la placa del fluorímetro. A partir de aquí, se actuó igual que en el caso del tejido. Se mezcló 1:1 con *tris-acetato* y posteriormente se añadió *luciferina-luciferasa*.

En este caso la POG fue de 90 minutos ya que se buscaba un tiempo donde no hubiese liberación de AAE y el ATP no hubiese caído.

Con las mitocondrias enteras el procedimiento se ve modificado al principio. En cada tubo eppendorff termostatzado a 37°C en un baño se añadió el fármaco (aspirina, salicilato sódico o indometacina), *buffer manitol* (manitol 75mM; sacarosa 25mM; KCl 115mM; KH₂PO₄ 20mM; pH 7,2) y mitocondrias (10mg/mL, de forma que al diluir posteriormente se alcanzó 0,5mg/mL de concentración final). Ahora va a depender del complejo que se quiera estudiar. Para el complejo I-III se añadió una *solución de glutamato/malato/ADP* (lanzadera mitocondrial de glutamato-malato, para que el glutamato pueda atravesar la membrana mitocondrial) para una concentración final de 2,5mM de glutamato y de malato y 360µM de ADP, mientras que para el complejo II-III se añadió una *solución de succinato* para una concentración final de 20mM. También se hizo un blanco, que no llevaba ADP. A los cinco minutos de incubación, se añadió el mismo volumen que haya de *buffer de extracción*. A partir de aquí el proceso es igual que en los casos anteriores. Se mezcló en proporción 1:1 con *buffer tris-acetato* y se añadió *luciferina-luciferasa*.

II. 4. Otras determinaciones.

Determinación de proteínas.

El fundamento del método consiste en la capacidad de las proteínas para reducir el cobre en estado de oxidación II a estado de oxidación I de forma concentración dependiente (Hill *et al.* 1988), lo que le permite reaccionar con el ácido bicinconínico y dar un color violeta que podemos registrar a una longitud de onda de 562nm.

En cada pocillo se mezcló la muestra con el reactivo de cobre (98% (v/v) de ácido bicinconínico y 2% (v/v) CuSO₄·5H₂O) en proporción 1:20. Esto se mantuvo 30 minutos a 60°C y se mide a 562nm. Como estándar se emplea albúmina de suero bovina (BSA).

III. Protocolo experimental.

III. 1. CULTIVOS CELULARES.

Efecto de la aspirina sobre la muerte neuronal inducida por POG.

En estos experimentos el periodo de POG fue de 150 minutos. Tras este tiempo, se midieron distintos parámetros de viabilidad celular como son la LDH, MTT y PI. En el caso de la LDH se tomó del medio tras los 150 minutos, se retiró y se añadió el *buffer de reperfusión* mientras se mantuvieron las células en el incubador a 37°C. Esto permitió medir la LDH a las 0, 3 y 24 horas después de la POG. Para el MTT y el PI se retiró el medio y se determinó en las células (Figura 9).

Con estos experimentos se comprobó si había muerte celular tras la POG y si la aspirina era capaz de reducirla. La aspirina (30µM-3mM) se añadió al comenzar la POG. En la reperfusión se retiró cualquier fármaco.

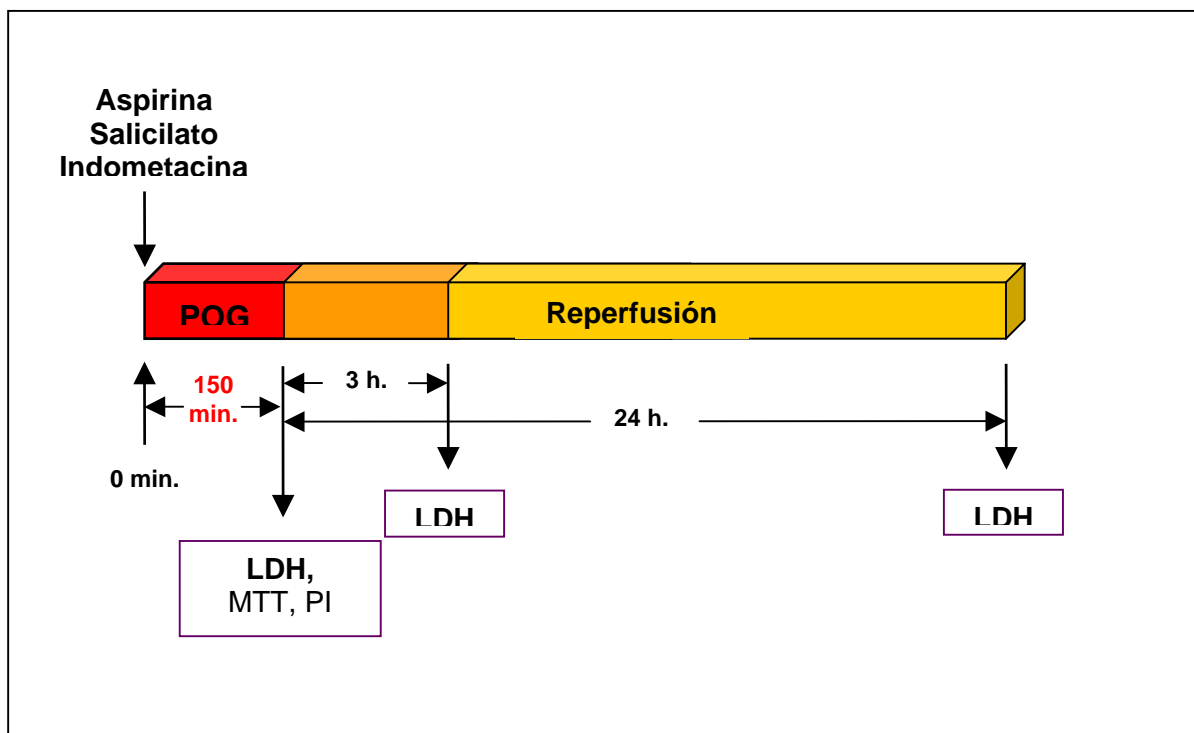


Figura 9. Esquema de los experimentos para la obtención LDH, MTT y PI.

Efecto del salicilato sódico y la indometacina sobre la muerte neuronal inducida por POG.

Los experimentos se llevaron a cabo igual que los de aspirina (figura 9), aunque sólo se determinó la LDH a 0, 3 y 24 horas tras la POG. Se probó el salicilato sódico (300 μ M) como fármaco análogo a la aspirina y la indometacina (3, 10 y 100 μ M) como AINE con índice COX2/COX1 similar al de la aspirina (Warner *et al.*, 1999).

Efecto de la aspirina, el salicilato sódico, la indometacina, la dizocilpina y el PDTC sobre la liberación de glutamato inducida por POG en neuronas corticales.

Se recogieron 100 μ L de medio tras los 150 minutos de POG (figura 10) y se centrifugaron para depositar alguna célula que hubiésemos podido tomar por error. Se comparó la liberación de glutamato en situación control, de POG y POG con aspirina en el rango de (30-3000 μ M), salicilato sódico (300 μ M) e indometacina (3-100 μ M). Como grupo control del sistema se evaluó el efecto sobre la liberación de LDH de un antagonista no competitivo del subtipo de receptor de glutamato NMDA, la dizocilpina (100nM). Debido a que se ha descrito que la neuroprotección por salicilatos podía estar mediada por el NF- κ B, se probó el efecto de un inhibidor de este factor PDTC (pirrolidinditiocarbamato sódico; 100 μ M) en nuestro sistema.

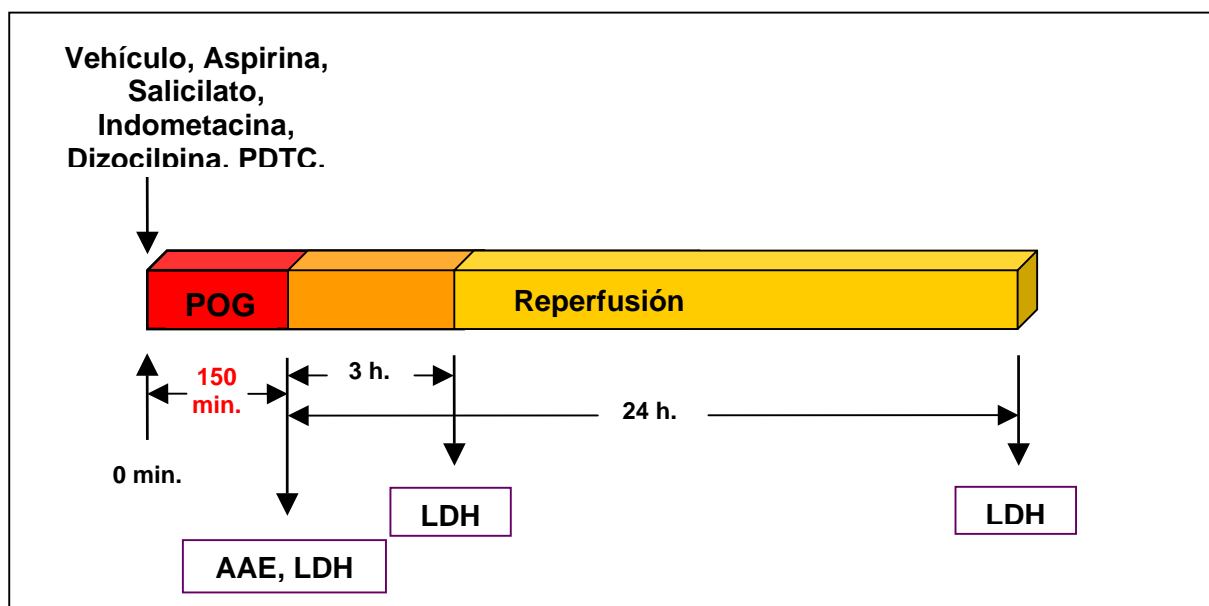


Figura 10. Esquema de los experimentos de obtención de glutamato

Efecto de la aspirina sobre el daño neuronal causado por glutamato.

Se expuso un cultivo de neuronas corticales a glutamato $10\mu\text{M}$ y ausencia total de magnesio en el buffer durante cinco minutos (figura 11). Tras este tiempo se cambió el medio por *buffer de reperfusión*. Se midió la viabilidad celular (LDH) y si la aspirina ($300\mu\text{M}$) tenía algún efecto en estas condiciones.

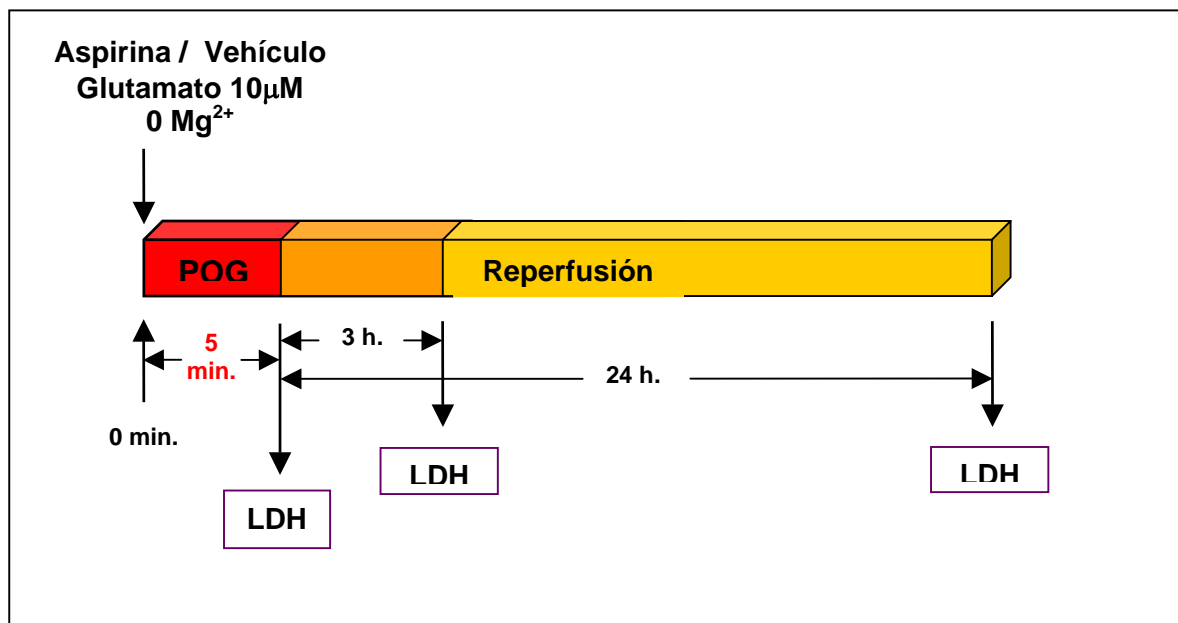


Figura 11. Esquema del experimento del efecto de aspirina sobre el daño neuronal originado por glutamato.

Efecto de la aspirina sobre la liberación de glutamato inducida por POG en cultivos enriquecidos con glía.

Se emplearon cultivos enriquecidos con glía sometidos a POG donde se pudo estudiar si el efecto de la aspirina ($300\mu\text{M}$) era compartido por otro tipo celular distinto al de las neuronas y si la presencia de células gliales modificaba el resultado.

Efecto del tPDC y BAPTA sobre la liberación de glutamato inducida por POG en neuronas corticales. Efecto de la aspirina.

Con estos experimentos se estudiaron los dos mecanismos más importantes de liberación de glutamato, el vesicular o calcio-dependiente y la reversión del transportador. Sobre ambos mecanismos se estudió el efecto de la aspirina (figura 12). En los dos casos se recogió 100 μ L de medio para cuantificar el glutamato por HPLC.

Para el estudio del mecanismo calcio-dependiente se empleó un quelante de calcio intracelular como es el BAPTA-AM (ácido 1,2-bis(2-aminofenoxi)etano-N,N,N',N'-tetraacético), 5 μ M. De esta forma se eliminaba el componente vesicular de la liberación. Se incubaron las células 45 minutos con BAPTA y se lavaron dos veces con buffer de isquemia antes de comenzar la POG. No sólo se estudió el efecto del BAPTA, también se estudió el efecto de la aspirina (300 μ M) con este tratamiento.

Para el estudio de la reversión del transportador, se empleó el tPDC (ácido L-trans-pirrolidin-2,4-dicarboxílico; 300 μ M). Con él, se inhibía el componente de la liberación relativo a la liberación calcio-independiente. Este fármaco se incubó 45 minutos antes de la POG junto al ácido kinurénico (1mM), un bloqueante de receptores NMDA y no NMDA, con lo que se inhibía el efecto secundario del glutamato liberado (Rossi *et al.* 2000). Tras la incubación, se retiraron los dos productos lavando las células con buffer de isquemia. En la POG se incubó un grupo sin aspirina (control) y otro con aspirina (300 μ M).

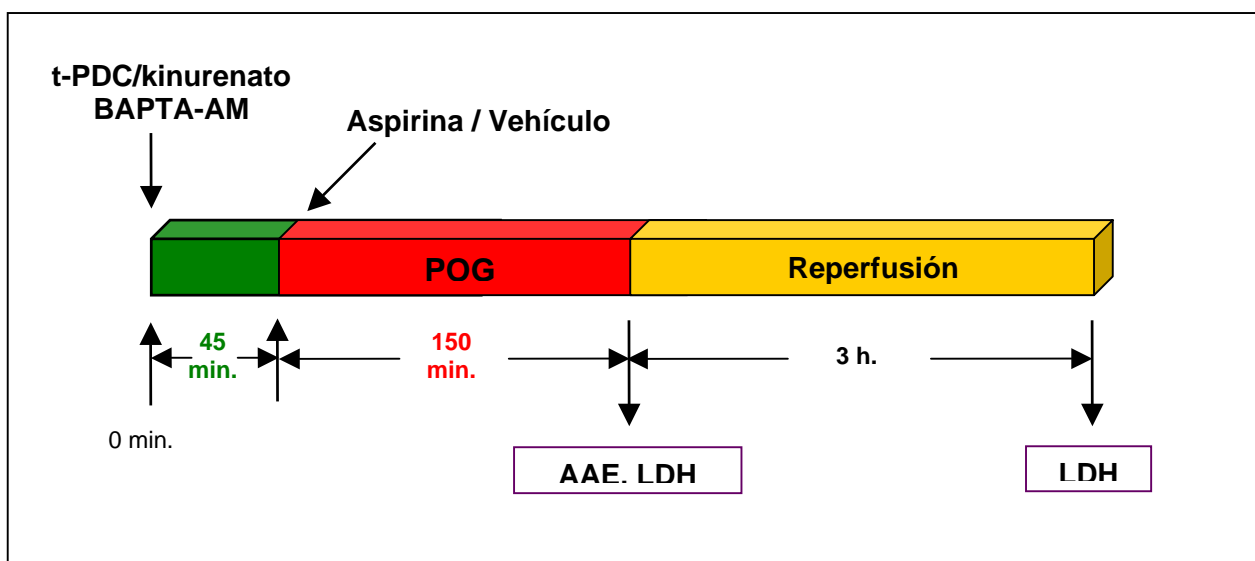


Figura 12. Esquema del estudio de los mecanismos implicados en la liberación de glutamato.

Efecto de la aspirina en la recaptación de glutamato en neuronas corticales

Se empleó glutamato tritiado en presencia y en ausencia de aspirina (figura 13). Se hizo un estudio a 90, 180 y 300 segundos, y se escogió el tiempo de 90 segundos por asegurar la linealidad en el tiempo de captación.

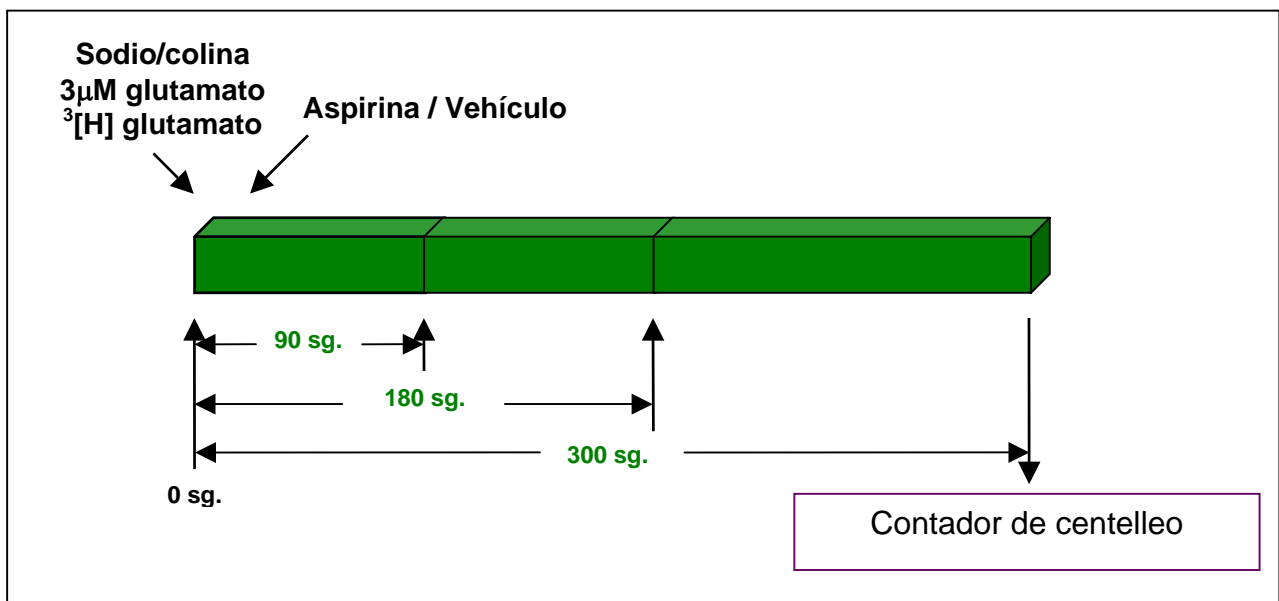


Figura 13. Esquema de los experimentos de recaptación de glutamato.

Efecto de la POG en los niveles de ATP en neuronas corticales. Efecto de la aspirina, salicilato sódico e indometacina.

El tiempo de POG empleado en estos experimentos fue de 90 minutos. Esta POG submáxima permitió ver caídas en los niveles de ATP sin que hubiese liberación de glutamato, muerte neuronal o pérdida de ATP por lisis celular (Figura 14).

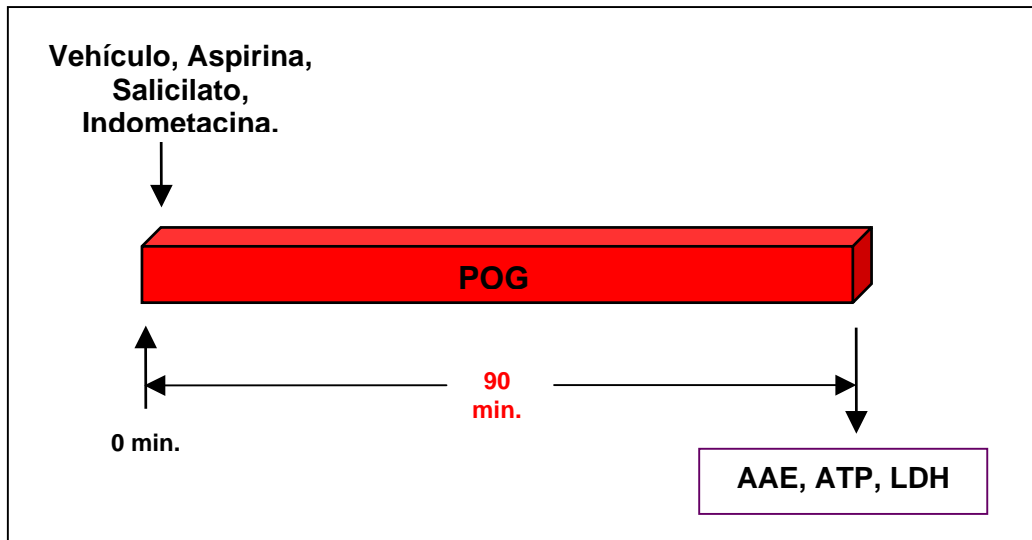


Figura 14. Esquema de los experimentos de medida de los niveles de ATP en células.

III. 2. MITOCONDRIAS Y PARTÍCULAS SUBMITOCONDRIALES.

Efecto de la aspirina, el salicilato sódico y la indometacina en los niveles de ATP en mitocondrias aisladas.

Tras el aislamiento de mitocondrias de cerebro de rata se comprobó el efecto de la aspirina, el salicilato sódico y la indometacina sobre los distintos complejos de la cadena respiratoria mitocondrial, el I-III-IV y el II-III-IV (figura 15).

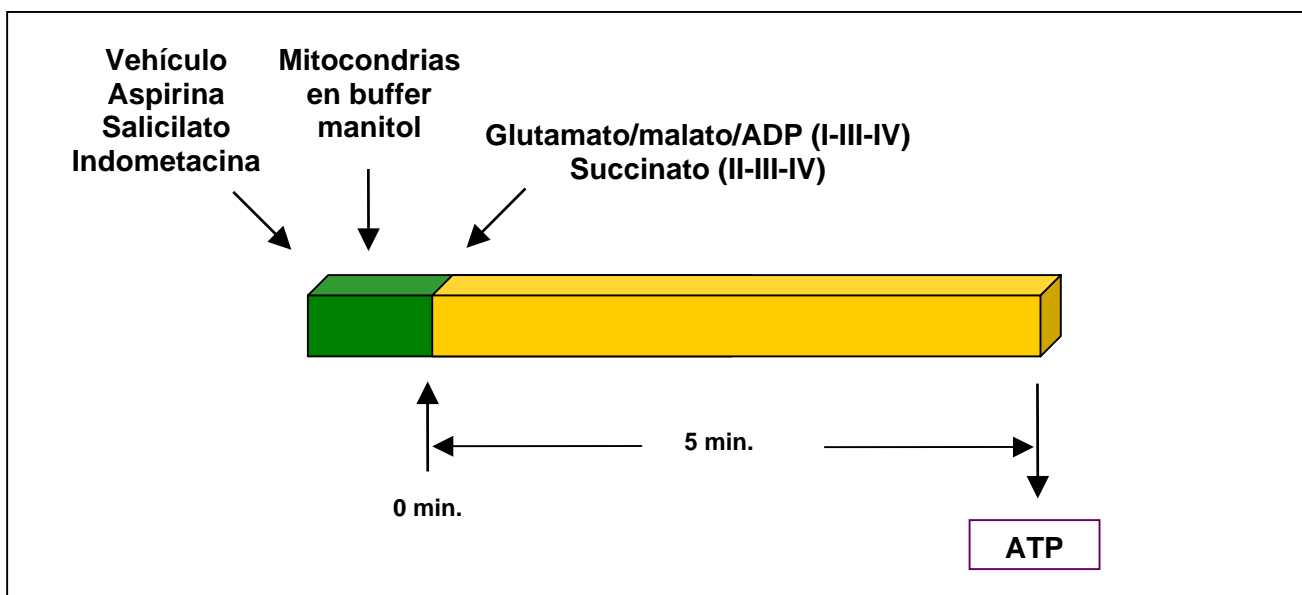


Figura 15. Esquema de los experimentos de medida de los niveles de ATP en mitocondrias.

Efecto de la aspirina, el salicilato sódico y la indometacina sobre el consumo de oxígeno en partículas submitocondriales.

Las partículas submitocondriales aisladas se incubaron con aspirina, salicilato sódico e indometacina para poder determinar el consumo de oxígeno de los complejos I-III, II-III y IV (Figura 16).

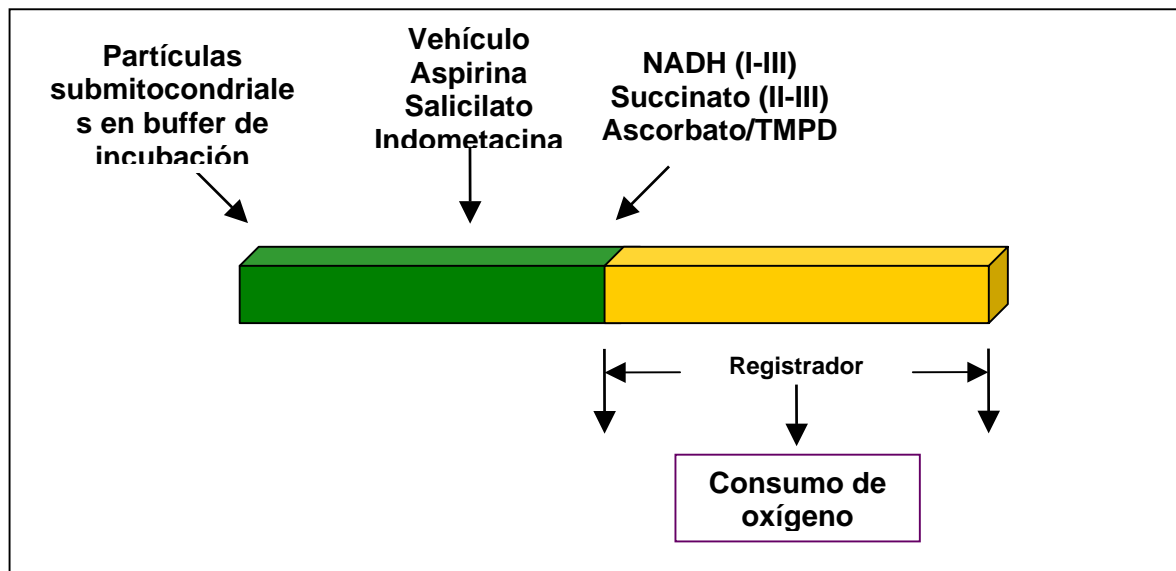


Figura 16. Esquema de los experimentos de cuantificación del consumo de oxígeno.

III. 3. ANIMAL ENTERO.

Efecto de la aspirina sobre el volumen del infarto en ratas sometidas a MCAO.

Se plantearon cuatro grupos de animales: MCAO, MCAO + aspirina 10mg/Kg, MCAO + aspirina 30mg/Kg y MCAO + aspirina 100mg/Kg. La aspirina y el suero salino se administraron i.p. 2 horas antes de la MCAO. El volumen de infarto se determinó 48 horas después de la operación.

Efecto de la aspirina en ratas sometidas a MCAO sobre la liberación de glutamato en plasma y en cerebro.

La determinación de los niveles de glutamato se determinó por HPLC. Se establecieron dos grupos clasificados como MCAO y MCAO + aspirina (30mg/Kg). La aspirina o el suero salino se administraron i.p. 2 horas antes del comienzo de la MCAO.

Para determinar los niveles de glutamato en el cerebro, las muestras se recogieron por microdiálisis (figura 17), según se describió en el apartado I.1.2. En el caso de los niveles plasmáticos (figura 18), se tomó sangre de la vena caudal, se desproteinizó y se centrifugó para obtener el suero.

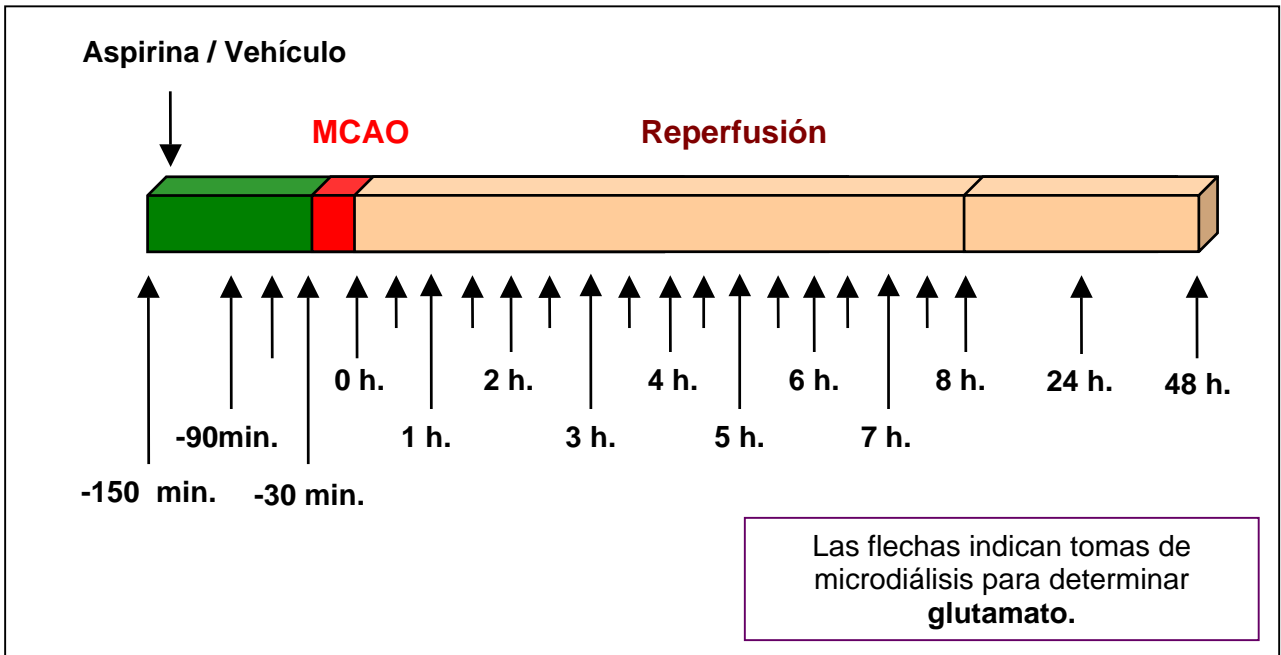


Figura 17. Esquema de las tomas de microdiálisis.

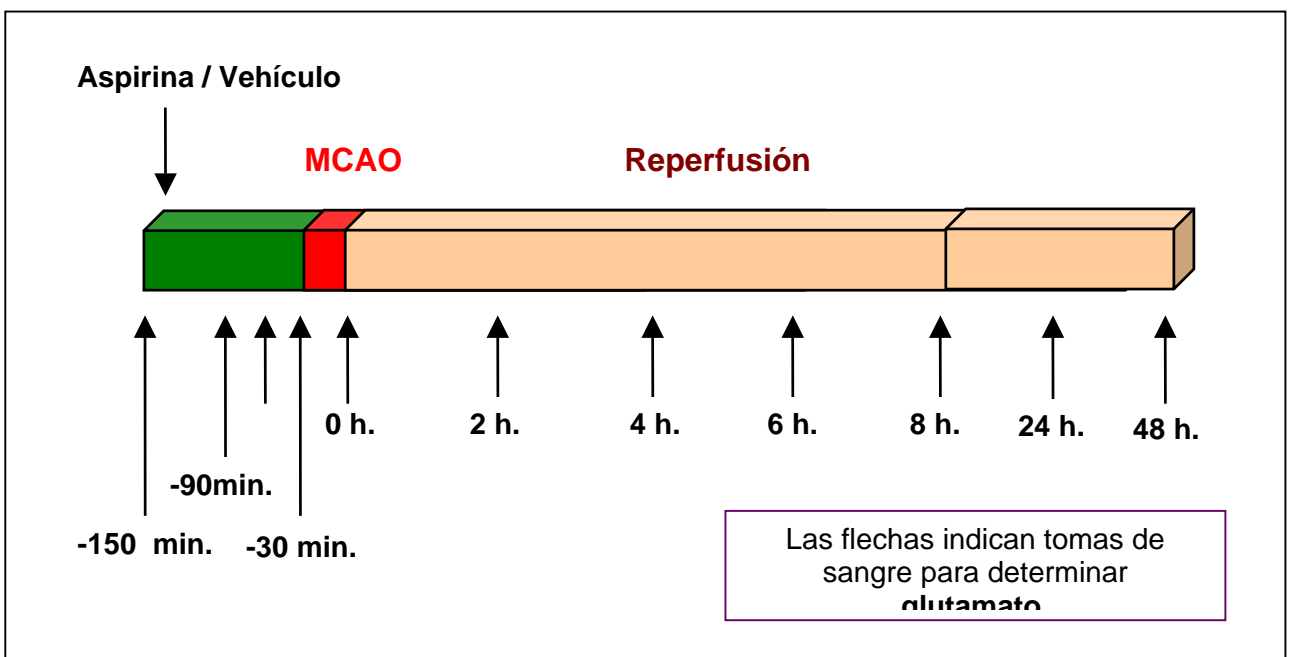


Figura 18. Esquema de las tomas de sangre.

Efecto de la aspirina sobre los niveles de ATP cerebral en ratas sometidas a MCAO.

Para estos experimentos se hicieron cuatro grupos, clasificados como SHAM, SHAM + aspirina 30mg/Kg, MCAO y MCAO + aspirina 30mg/Kg. Se sacrifica el animal 15 minutos después de la MCAO y se determina el ATP (figura 19) en una región cortical próxima a la arteria media cerebral cauterizada.

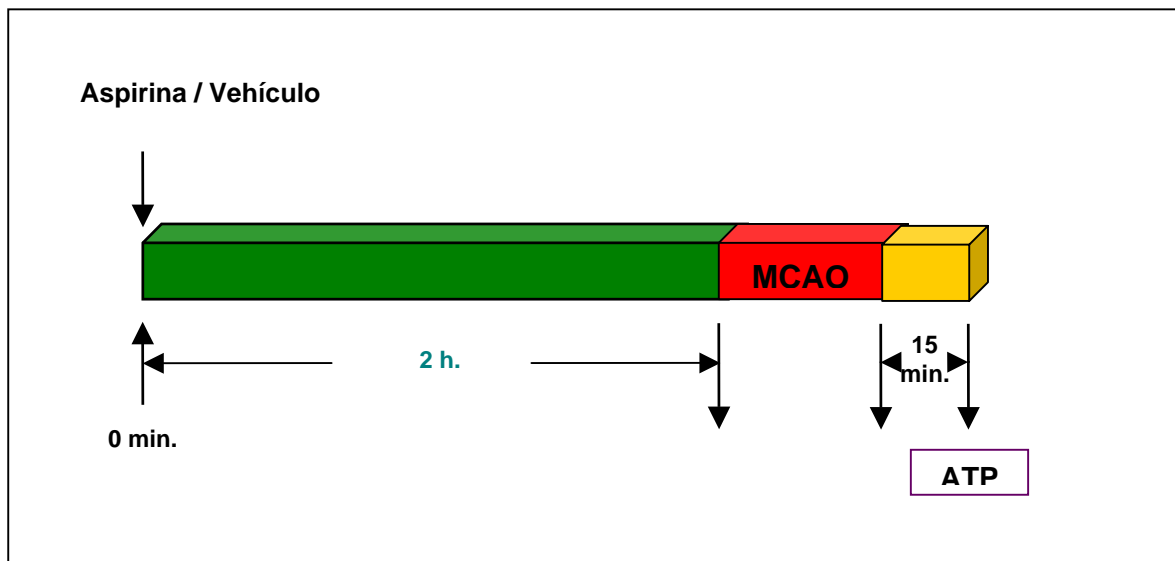


Figura 19. Esquema de los experimentos de medida de los niveles de ATP en animales MCAO.

IV. Análisis estadístico.

Todos los valores fueron expresados como media \pm SEM del número de experimentos indicados en cada caso. Se consideró $p < 0,05$ significativo (test Newman-Keuls).

V. Fármacos empleados.

Los productos empleados en esta Tesis se obtuvieron de Sigma, con las siguientes excepciones: sal soluble de aspirina (laboratorios Normon), anticuerpo anti-GFAP (Chemicon), CyTM2 anti-IgG (Amersham Pharmacia Biotech), kit determinación de yoduro de propidio (Molecular Probes V-13244) y ácido kinurénico (Tocris).

Introducción.

Material y métodos.

Resultados.

Discusión.

Conclusiones.

Bibliografía.

Resultados.

A.- In vitro: cultivos celulares.

Liberación de glutamato y muerte neuronal. Efecto de la aspirina y otros AINEs.

A.1. Efecto de la aspirina sobre la muerte neuronal inducida por un proceso de privación de oxígeno y glucosa (POG).

El proceso de POG de 150 minutos, produce muerte neuronal en nuestro modelo, como se observa en los tres marcadores de viabilidad celular (LDH, MTT y PI). Hay un aumento en los niveles de LDH liberados al medio a las 3 y 24 horas después de la POG (Figura 21), un mayor porcentaje de MTT reducido tras la POG y un mayor porcentaje de células marcadas inmediatamente después de la POG con PI (Figura 22).

Cuando se incubaron con aspirina, se redujeron los niveles de LDH en el medio ($IC_{50} = 0,115 \pm 0,015 \mu M$), disminuyó el porcentaje de células necróticas teñidas con PI y aumentó el de MTT reducido.

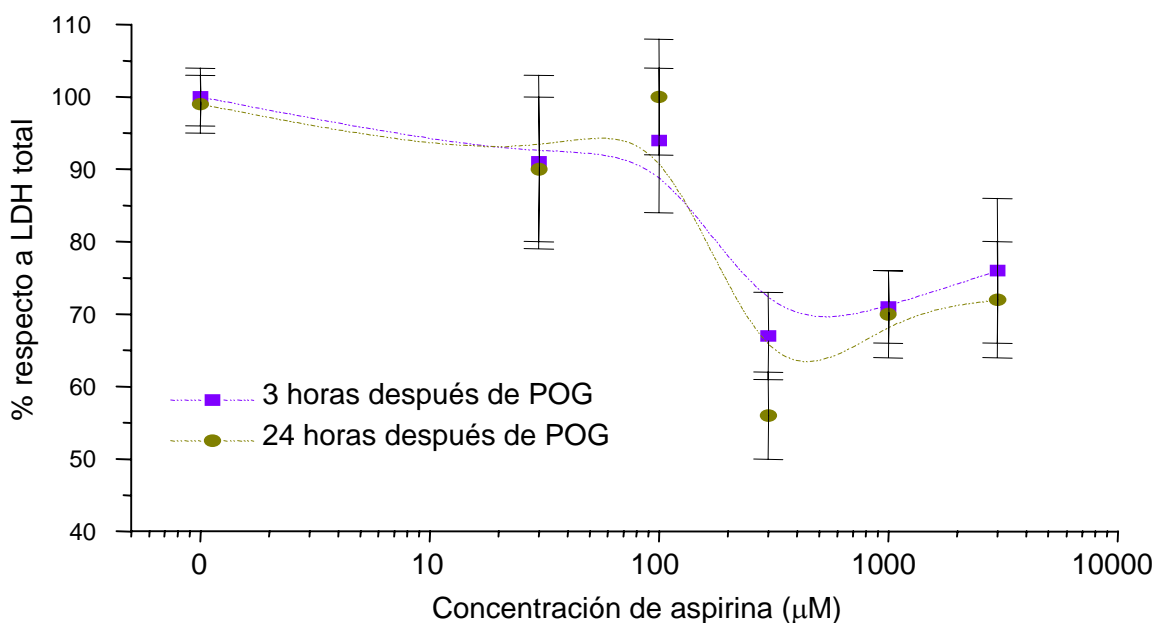


Figura 21. Efecto de la aspirina sobre la liberación de LDH, 3 y 24 horas después de la POG. El resultado se expresa como porcentaje de la LDH total.

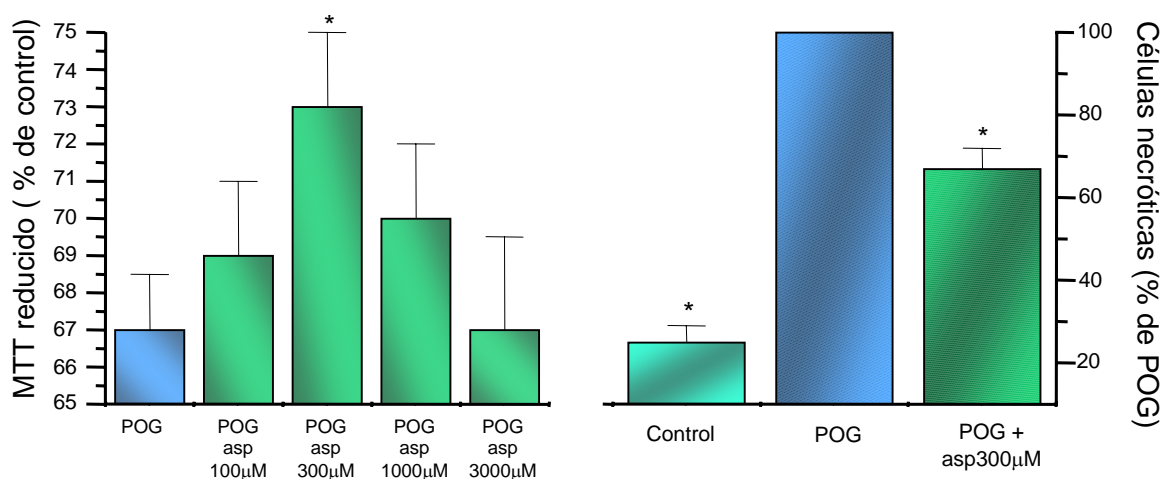


Figura 22. Inhibición por parte de la aspirina de la muerte celular inducida por POG, medido por la reducción de MTT (figura izquierda) y por la tinción de células con PI (figura derecha).

A.2. Efecto del salicilato sódico y la indometacina sobre la muerte neuronal inducida por POG.

El salicilato sódico fue capaz de reducir la muerte neuronal a la misma concentración a la que la aspirina demostró su máxima eficacia (300µM). Por su parte, la indometacina fracasó a las tres concentraciones empleadas como protector frente a la muerte neuronal inducida por POG (Figura 23). En esta gráfica se muestran los valores de LDH a las 24 horas de la POG.

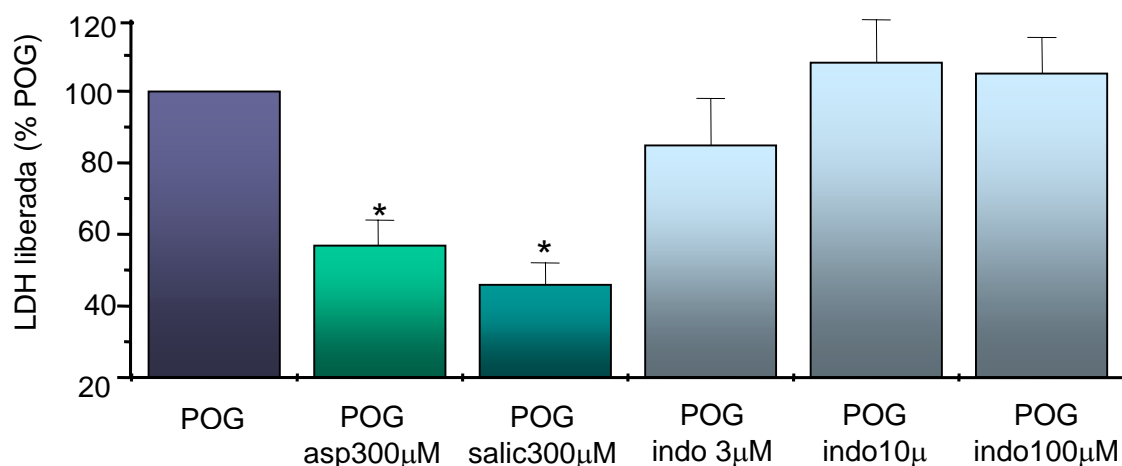


Figura 23. Efecto de otros AINEs (salicilato sódico e indometacina) sobre la muerte celular inducida por POG. *p<0,05 vs POG.

A.3. Efecto de la aspirina, el salicilato sódico y la indometacina en la liberación de glutamato inducida por POG.

La POG produjo la liberación de glutamato en los cultivos celulares ($1,22 \pm 0,23 \text{ nmol}/10^6$ células vs. no detectable en control). Como control adicional de nuestro sistema, se incubaron células con dizocilpina (100nM), de forma que al bloquear el receptor NMDA disminuyeron los valores de LDH ($37 \pm 4 \%$ de POG).

Al incubar las células con aspirina se apreció una disminución de la liberación de glutamato ($IC_{50}=0,042 \pm 0,009 \text{ mM}$; Figura 24), mientras que la incubación con un inhibidor de la translocación del factor nuclear κB , como es el PDTC (pirrolidinditiocarbamato), no produjo ninguna modificación en la liberación de glutamato comparado con la POG ($1,22 \pm 0,23$ vs. $1,20 \pm 0,12 \text{ nmol}/10^6$ células; $p>0,05$).

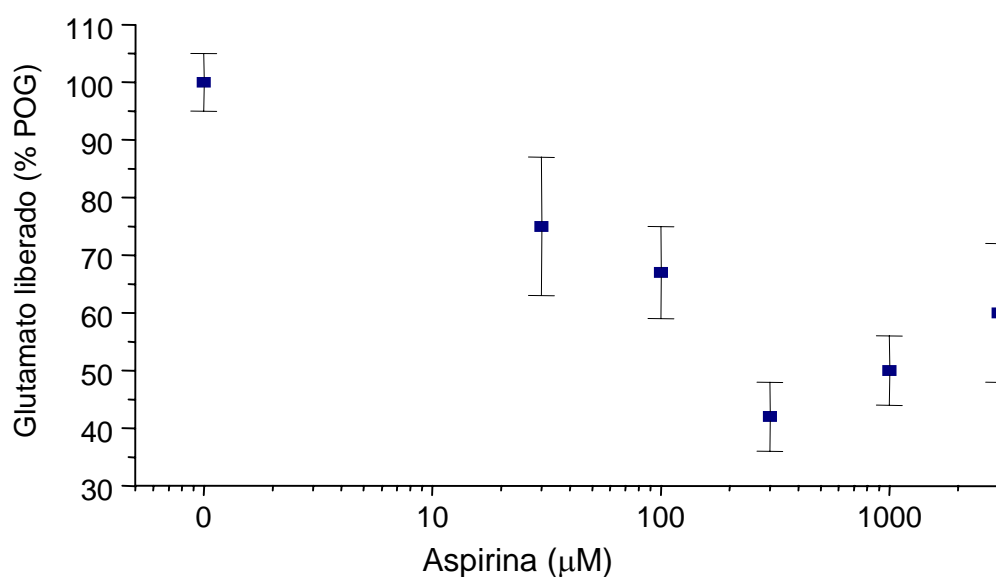


Figura 24. Efecto de la aspirina (30-3000 μM) sobre la liberación de glutamato inducida por POG.

Como ocurrió al incubar las células con aspirina (300 μM), el salicilato sódico (300 μM) inhibió la liberación de glutamato (Figura 25). Por el contrario, la indometacina (3-100 μM) en la misma situación no produjo ningún cambio significativo.

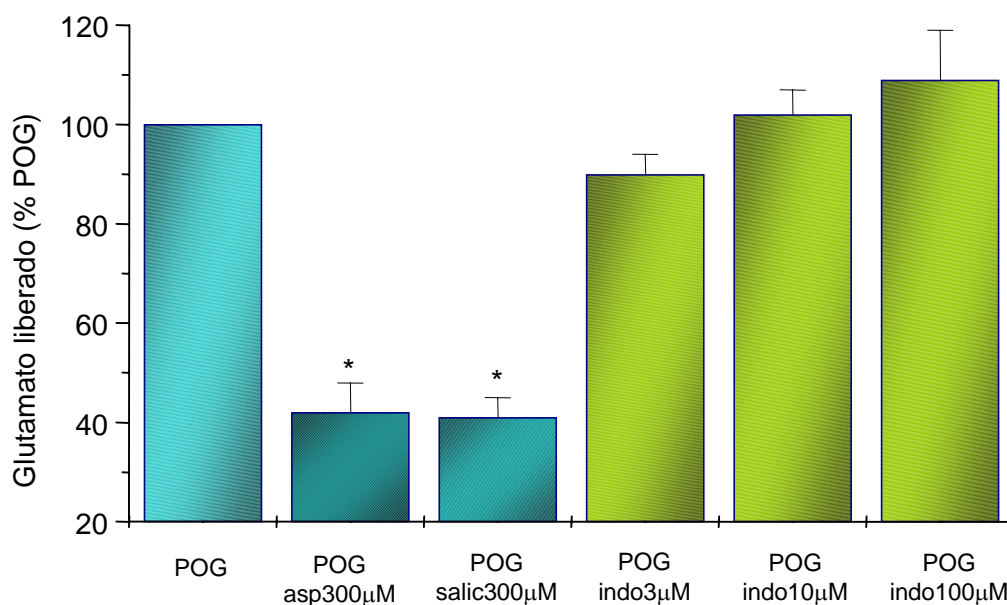


Figura 25. Efecto de aspirina, salicilato sódico e indometacina sobre la liberación de glutamato inducida por POG. * $p < 0,05$ vs. POG.

Mecanismos implicados en la liberación glutamato. Efecto de la aspirina.

A.4. Efecto de la aspirina sobre el daño neuronal causado por glutamato.

La incubación de las células en un medio con glutamato ($10\mu\text{M}$) en ausencia de magnesio durante cinco minutos, causó muerte celular (LDH liberada $32,9 \pm 1,5$ % de LDH total; $p < 0,05$). La incubación con aspirina ($300\mu\text{M}$) no modificó significativamente estos valores de LDH (30 ± 2 % de LDH total).

A.5. Efecto del t-PDC y BAPTA sobre la liberación de glutamato inducida por POG.

Efecto de la aspirina.

Como ya se expuesto en material y métodos, tanto el t-PDC (inhibidor del recaptador de glutamato)/kinurenato (bloqueante de receptores NMDA y no NMDA) como el BAPTA (quelante de calcio intracelular) necesitaron un periodo de carga de 45 minutos antes de la POG. Los dos tratamientos ocasionaron una menor liberación de

glutamato (Figura 26). Cuando además se incubaron estos grupos con aspirina (300 μ M) se observó una inhibición adicional en el caso del BAPTA, hecho que no se apreció en el grupo del t-PDC.

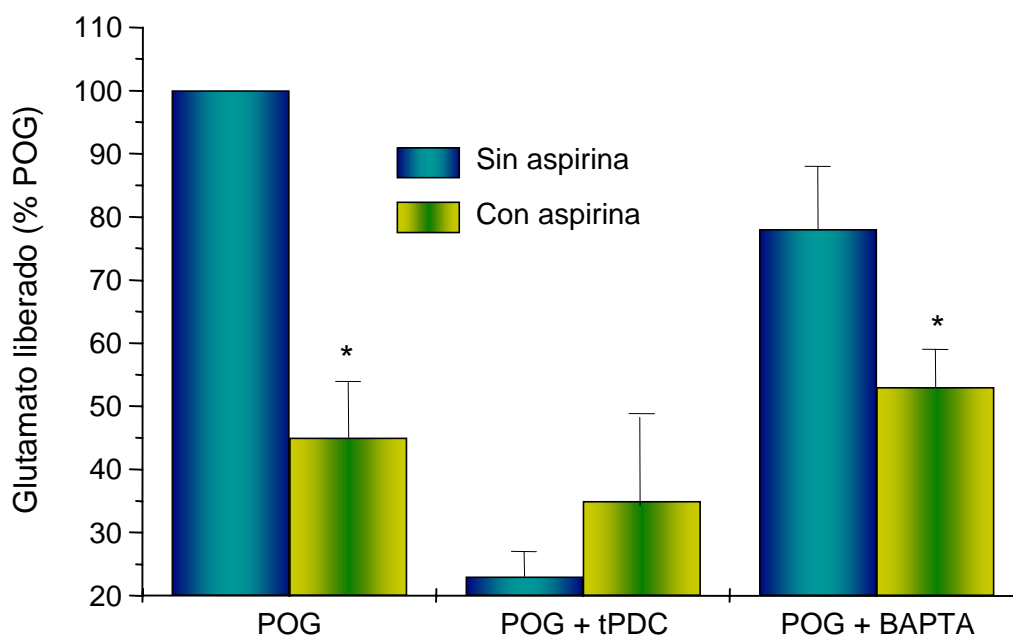


Figura 26. Estudio del mecanismo de liberación de glutamato por reversión del transportador (tPDC) y del mecanismo excitotóxico (BAPTA). Efecto de la aspirina 300 μ M. * $p < 0,05$.

A.7. Efecto de la aspirina sobre la liberación de glutamato inducida por POG en cultivos enriquecidos con glía.

La liberación de glutamato no se vio modificada por la presencia de aspirina en cultivos mixtos-neurona-glía ($1,29 \pm 0,13$ vs. $1,12 \pm 0,11$ nmol glutamato/mL; $p > 0,05$) expuestos a POG.

A.8. Efecto de la aspirina en la recaptación de glutamato en neuronas corticales.

La recaptación no se afectó por la presencia de aspirina (300 μ M), aunque sí lo hizo en presencia del inhibidor del transportador, el t-PDC (300 μ M). En la figura 27 se representa la recaptación sodio-dependiente a los 90 segundos, donde el proceso es lineal.

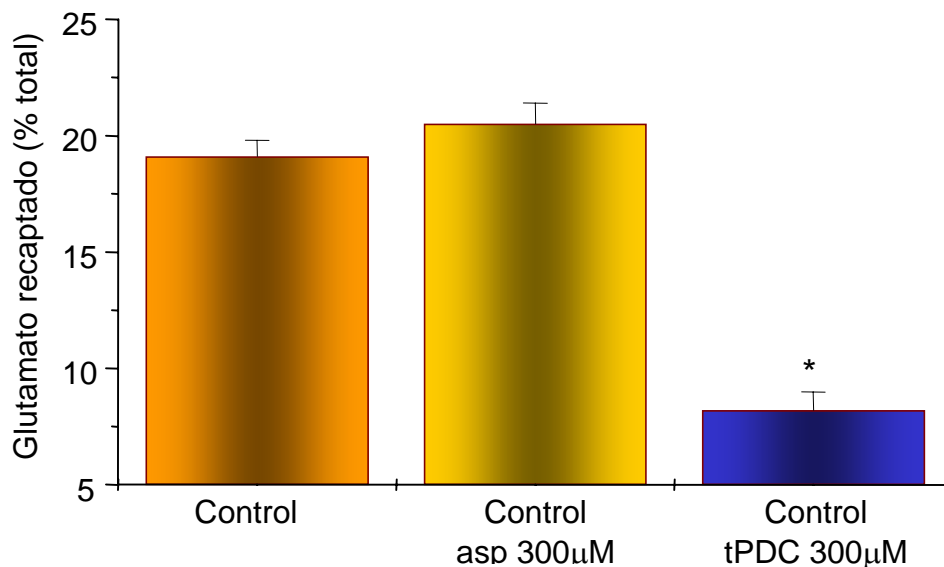


Figura 27. Efecto de la aspirina y el tPDC sobre la recaptación de glutamato. * $p < 0,05$ vs. control.

A.9. Efecto de la POG sobre los niveles de ATP en neuronas corticales. Efecto de la aspirina.

Una de las primeras etapas en la isquemia cerebral es la caída de ATP, que conlleva posteriormente la reversión del recaptador de glutamato. Por esto, decidimos medir los niveles de ATP. La exposición a una POG submáxima de 90 minutos ocasionó una caída en los niveles de ATP comparado con los niveles control ($23,2 \pm 3,7$ nmol/mg proteína). La incubación con aspirina ($300\mu\text{M}$) y con salicilato sódico ($300\mu\text{M}$) incrementó los valores de ATP, mientras que la indometacina ($3\mu\text{M}$ y $100\mu\text{M}$) no fue capaz de recuperar los niveles de ATP (Figura 28).

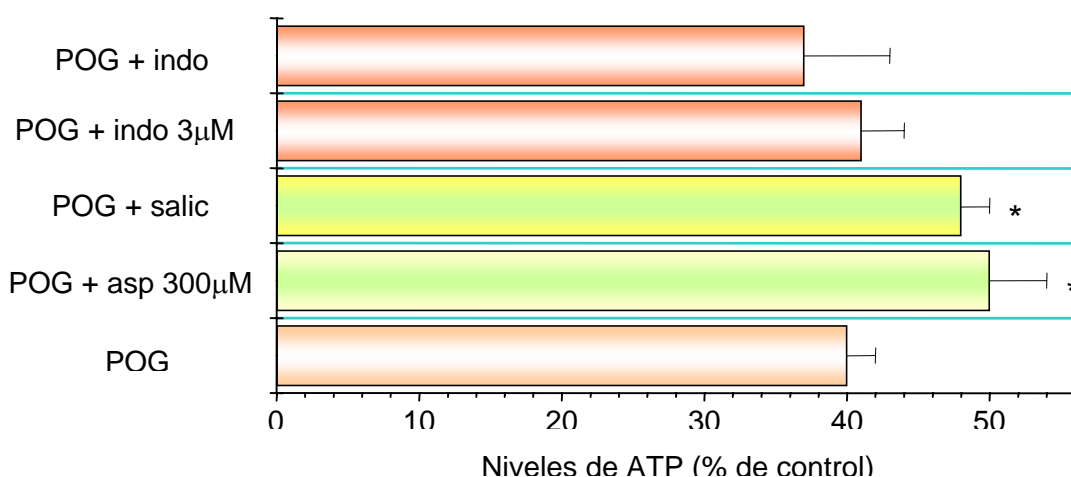


Figura 28. Efecto de aspirina, salicilato sódico e indometacina sobre la caída de ATP inducida por POG. * $p < 0,05$ vs POG.

B. Mitocondrias y partículas submitocondriales.

B.1. Efecto de la aspirina, el salicilato sódico y la indometacina en los niveles de ATP en mitocondrias aisladas.

La aspirina (30, 100 y 300 μ M) aumentó los niveles de ATP en mitocondrias aisladas, cuando se utilizaron sustratos del complejo I-III-IV de la cadena respiratoria mitocondrial (control 929 \pm 77 nmol/mg proteína). El complejo II-III-IV no vio incrementada su actividad con las mismas concentraciones de aspirina respecto al control (399 \pm 31 vs. 381 \pm 40 nmol/mg proteína).

Con el salicilato sódico (30, 100 y 300 μ M) los resultados fueron similares a los de aspirina, se incrementaron los niveles de ATP por la estimulación del complejo I-III-IV (Figura 29). Por su parte, la indometacina (3, 10 y 30mM) no fue capaz de aumentar los niveles de ATP a través del complejo I-III-IV ni por el II-III-IV (Figura 29).

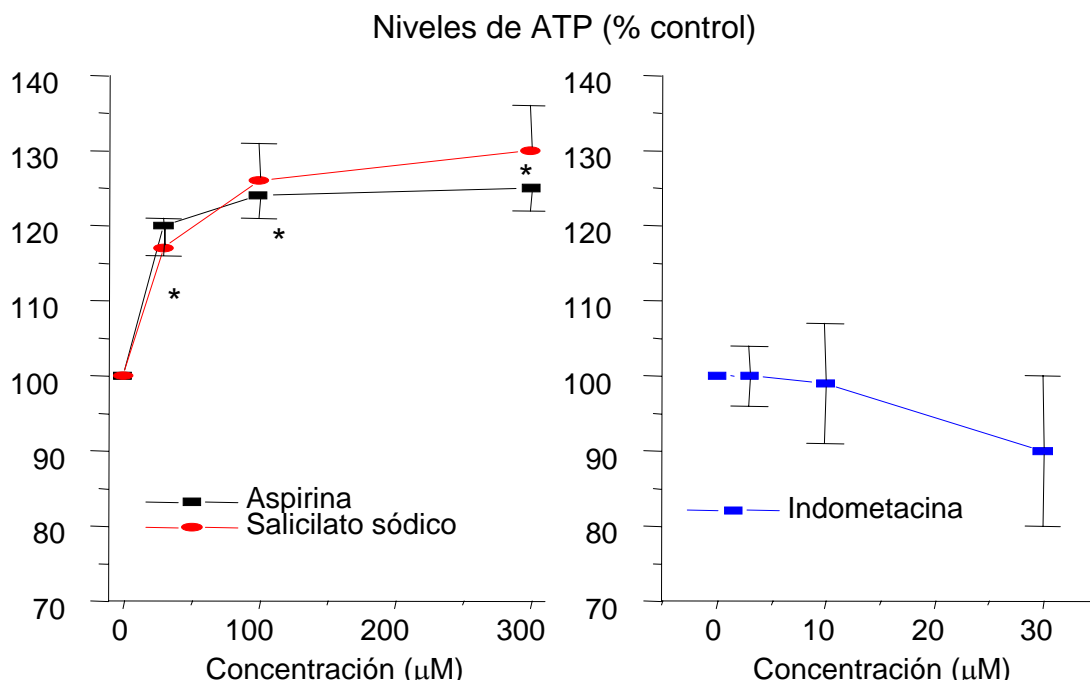


Figura 29. Efecto de aspirina y otros AINEs (salicilato sódico e indometacina) sobre la producción de ATP por el complejo I-III-IV.
* $p < 0,05$ vs. control.

B.2. Efecto de la aspirina, el salicilato sódico y la indometacina sobre el consumo de oxígeno en partículas submitocondriales.

La aspirina (100-1000 μ M) incrementó la respiración NADH-dependiente (complejo I-III de la cadena respiratoria mitocondrial) en partículas submitocondriales respecto al control ($11,2 \pm 0,9\mu\text{M O}_2/\text{min}$). Lo mismo sucedió con el salicilato sódico (300 μ M), mientras que la indometacina (3-100 μ M) no modificó significativamente los valores control (Figura 30).

La respiración succinato-dependiente (complejo II-III; valor control $9,5 \pm 0,9\mu\text{M O}_2/\text{min}$) no se vio afectada por la aspirina a ninguna concentración, y lo mismo ocurrió con la respiración TMPD/ascorbato-dependiente (complejo IV; valor control $19,1 \pm 1,9\mu\text{M O}_2/\text{min}$).

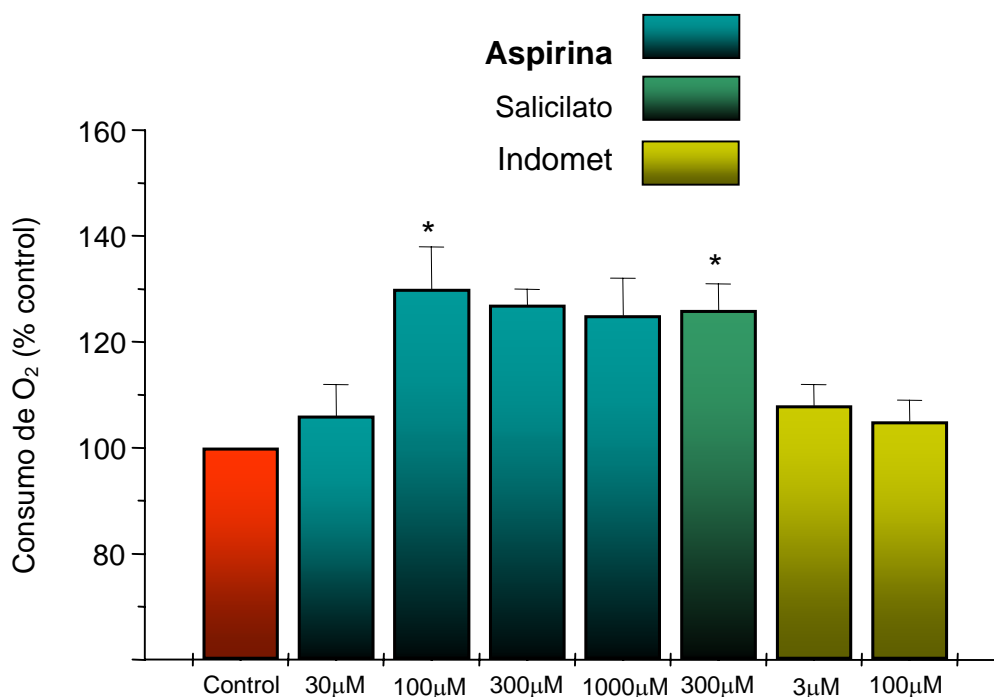


Figura 30. Medida del consumo de oxígeno en partículas submitocondriales. Efecto de la aspirina (30-1000 μ M), salicilato sódico (300 μ M) e indometacina (3-100 μ M). * $p < 0,05$ vs. control.

C. Animal entero.

Neurodegeneración producida por MCAO.

C.1. Efecto de la aspirina sobre el volumen de infarto en ratas sometidas a MCAO.

Se probaron tres dosis: 10, 30 y 100mg/Kg, administradas i.p. 2 horas antes de la operación. De ellas, 30 mg/Kg produjo una reducción significativa del volumen del infarto respecto al grupo de ratas no tratadas (Figura 31; $114,0 \pm 14,7\text{mm}^3$ vs. $150,9 \pm 9,5\text{mm}^3$).

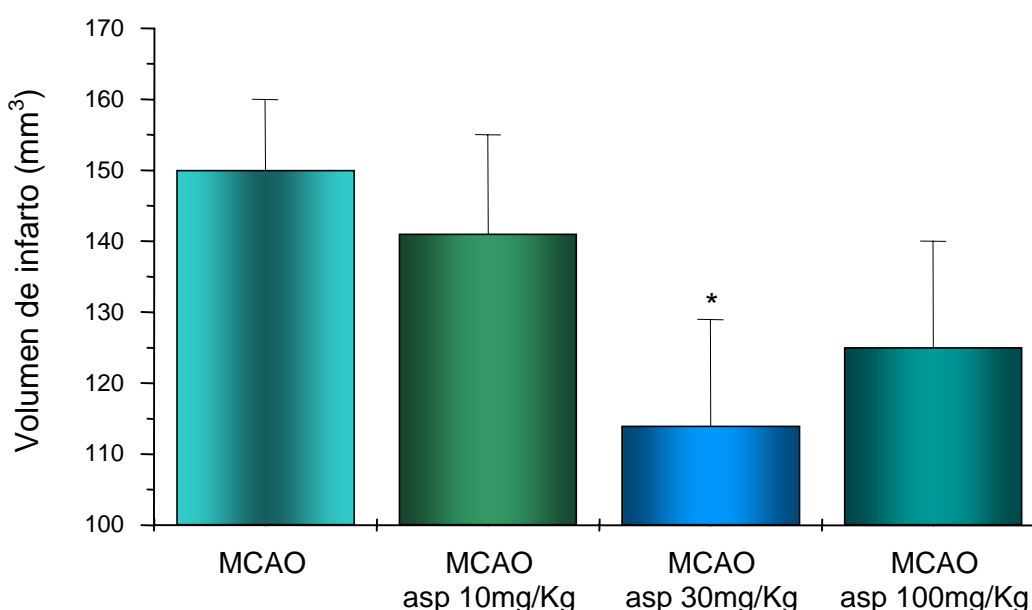


Figura 31. Efecto de la aspirina sobre el volumen de infarto producido por MCAO. * $p < 0,05$ vs. MCAO.

Efecto de la aspirina. Mecanismo de acción de la aspirina *in vivo*.

C.2. Efecto de la aspirina en ratas sometidas a MCAO sobre la liberación de glutamato en plasma y cerebro.

La MCAO indujo aumento de los niveles de glutamato. Los animales tratados con aspirina (30mg/Kg) mostraron unos niveles plasmáticos y cerebrales (microdialísis) de glutamato, menores que las ratas sin tratamiento. En el caso del dializado (Figura 32), el pico de liberación estuvo en las dos primeras horas tras la MCAO. A las cuatro horas casi había recuperado los niveles basales. El efecto de la aspirina se aprecia en el tramo

de las 0 a las 3 horas, donde hay una inhibición significativa (hasta un 40%) en la liberación de glutamato.

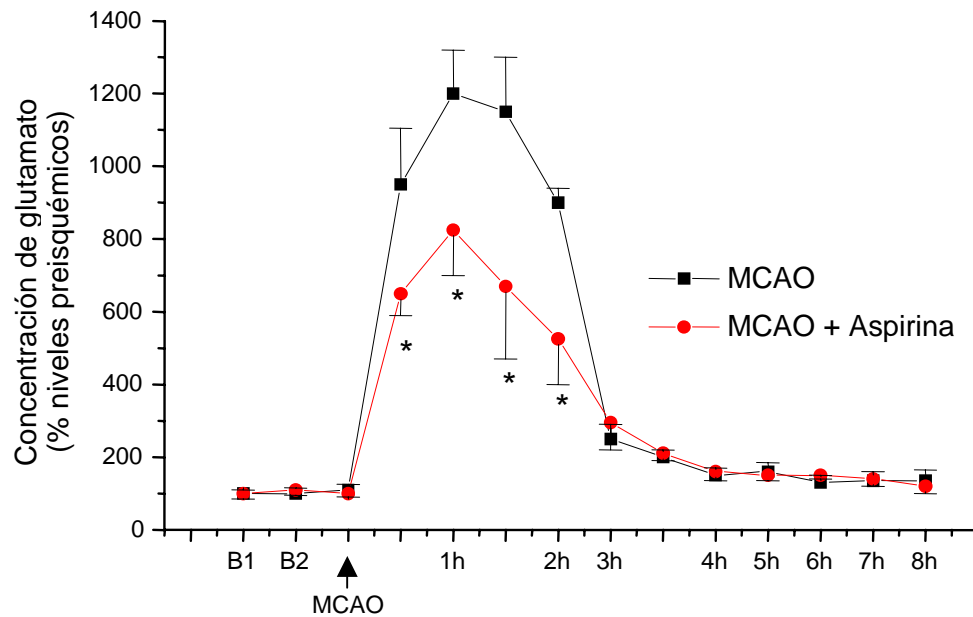


Figura 32. Efecto de la aspirina sobre los niveles de glutamato cerebrales. * $p < 0,05$ vs. MCAO.

Los niveles plasmáticos presentaron un perfil distinto a los de la microdiálisis. El aumento comenzó a las 4 horas y a las 48 horas se recuperaban los niveles preisquémicos. La aspirina disminuyó la liberación en ese periodo y a partir de las 8 horas, la disminución resultó significativa (Figura 33).

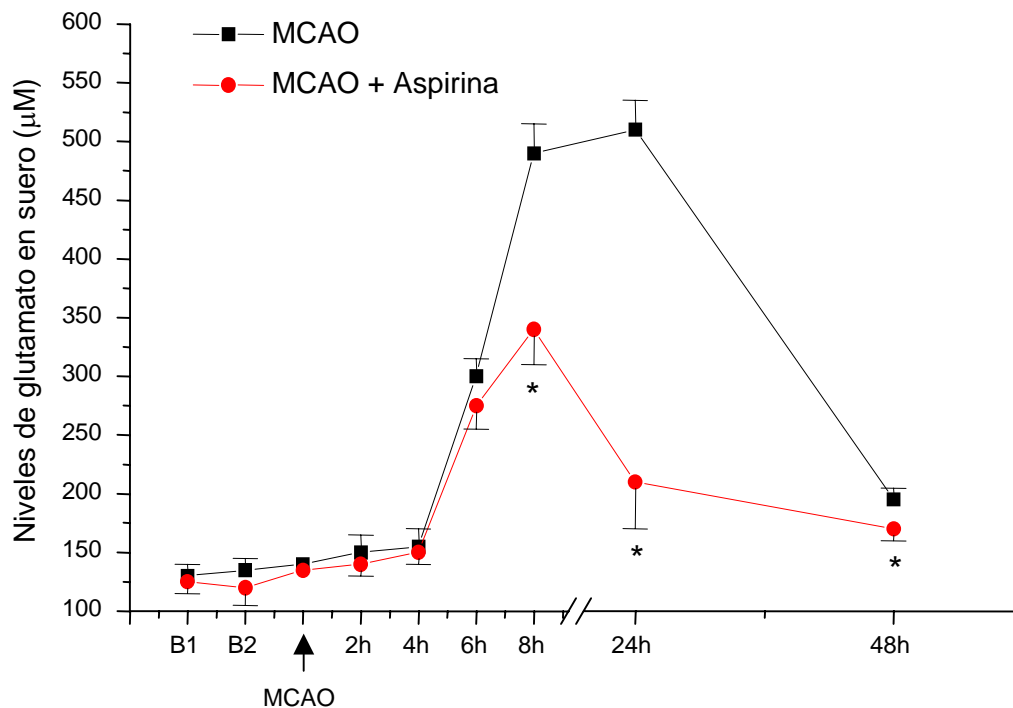


Figura 33. Efecto de la aspirina sobre los niveles de glutamato plasmáticos. * $p < 0,05$ vs. MCAO.

C.3. Efecto de la aspirina sobre los niveles de ATP cerebral en ratas sometidas a MCAO.

El grupo de ratas MCAO sufrió una disminución del 30% en los niveles de ATP comparado con las ratas SHAM. En los animales que recibieron aspirina (30mg/Kg) 2 horas antes de la MCAO, el ATP fue significativamente distinto del grupo salino. El efecto de la aspirina sobre los niveles cerebrales de ATP se observó incluso en las ratas SHAM, en los que el ATP aumentó de forma significativa. (Figura 34).

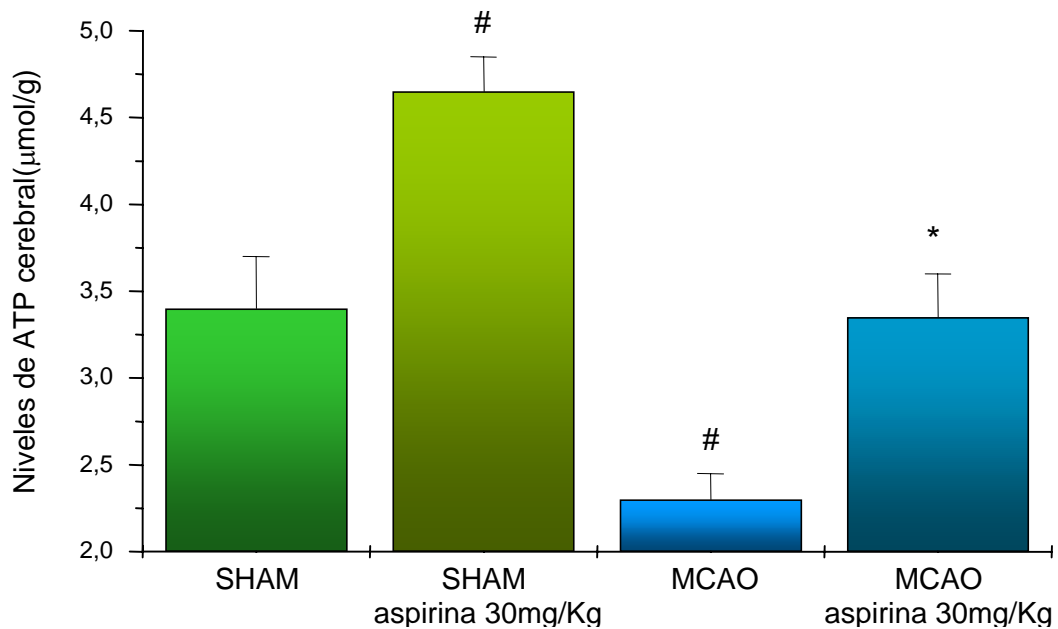


Figura 34. Efecto de la aspirina sobre los niveles de ATP cerebrales en animales MCAO y SHAM. # $p < 0,05$ vs. SHAM; * $p < 0,05$ vs. MCAO.

Introducción.

Material y métodos.

Resultados.

Discusión.

Conclusiones.

Bibliografía.

Discusión.

Muerte celular y liberación de glutamato. Neuroprotección por aspirina.

Nuestro grupo recientemente ha descrito un nuevo efecto neuroprotector de la aspirina (Moro *et al.* 2000), a través de la inhibición de la liberación de glutamato en un modelo *in vitro* de isquemia cerebral (rebanadas de cerebro anterior de rata expuestas a privación de oxígeno y glucosa; POG). Para poder estudiar con más profundidad los mecanismos implicados en esta acción protectora de la aspirina, en esta Tesis se ha empleado otro modelo de isquemia *in vitro* como es el cultivo primario de neuronas corticales de rata expuestas a POG.

Las células sometidas a un periodo de 150 minutos de POG sufren un daño respecto a las controles (células no tratadas), como se observa en los marcadores escogidos para evaluar el daño celular (liberación de LDH, inhibición de la reducción de MTT y tinción con PI). Las distintas dosis de aspirina producen una mejoría en los parámetros de viabilidad (reduciendo los niveles de LDH liberada, aumentando el porcentaje de MTT reducido y disminuyendo el número de células teñidas con PI), y la protección es máxima a la concentración de 300 μ M.

Una vez confirmado el efecto neuroprotector de la aspirina en este modelo, el siguiente punto es encontrar el mecanismo por el que la aspirina protege de la muerte neuronal. Aunque la aspirina tiene muchas acciones farmacológicas, ya sea como antioxidante (Kuhn *et al.*, 1995) o inhibiendo la translocación de NF- κ B (Kopp y Gosh, 1994), nuestros antecedentes van encaminados a la liberación de glutamato como mecanismo neuroprotector. Ya está descrito en la literatura que el glutamato es un factor que induce excitotoxicidad en la enfermedad cerebrovascular (Choi y Rothman, 1990). En nuestro modelo, en efecto, hemos comprobado que la muerte neuronal va acompañada por un aumento en la liberación de glutamato. También hemos observado que la aspirina inhibe la liberación de glutamato en nuestro sistema

de forma paralela a la neuroprotección que ejerce. En este caso, el efecto es máximo a la concentración de 300 μ M.

Un dato importante es que el salicilato sódico, el metabolito más importante de la aspirina, a una concentración de 300 μ M, tuvo un efecto similar al de la aspirina. No ocurre lo mismo con la indometacina, un AINE que no es del grupo de los salicilatos, pero que tiene un cociente de inhibición para las isoformas de la COX parecido a la aspirina (Warner *et al.*, 1999): $IC_{50}(\text{aspirina})=4,4$; $IC_{50}(\text{indometacina})=10$. $IC_{80}(\text{aspirina})=3,8$; $IC_{80}(\text{indometacina})=4,3$. La ausencia de efecto de la indometacina descarta por lo tanto la ruta de la ciclooxigenasa como mecanismo de acción de la aspirina.

Mecanismos implicados en la inhibición de la liberación de glutamato.

Una vez demostrada la neuroprotección que ejerce la aspirina y la inhibición que produce sobre la liberación de glutamato, el siguiente objetivo fue investigar los mecanismos implicados. Se han descrito varios mecanismos, actuando individual o combinadamente, como los principales responsables de la liberación de glutamato inducida por POG: 1). Liberación dependiente de calcio en astrocitos y estimulado por prostaglandinas (Bezzi *et al.*, 1998); 2). Exocitosis vesicular calcio-dependiente (Drejer *et al.*, 1985); 3). Reversión del transportador electrogénico (Rossi *et al.* 2000; Jabaudon *et al.* 2000). Para su estudio, hemos ido haciendo una disección farmacológica de los principales mecanismos implicados.

Además de los mecanismos mencionados, en nuestro modelo el aumento de la concentración extracelular de glutamato puede resultar también de la lisis celular. Por tanto, un punto imprescindible en estos experimentos de liberación es eliminar este componente de liberación. Para ello, en todos los experimentos, además de medir los niveles de glutamato en el medio, se determinaron los valores de LDH. Si estos valores diferían significativamente con los valores de LDH del grupo control, podíamos suponer que había habido muerte celular, con lo que el experimento no era válido y era descartado. Esto

nos obligó a tener que controlar muy bien el tiempo de POG, ya que el sobrepasar unos minutos el tiempo adecuado, podía suponer la invalidación del experimento.

En el caso del mecanismo de liberación en astrocitos estimulada por prostaglandinas, hay que recordar que la indometacina no tenía ningún efecto, lo que sugería que la inhibición de la ciclooxigenasa no participa en el efecto neuroprotector de la aspirina. Hemos confirmado este punto en cocultivos de neurona-glia, donde observamos que el efecto de la aspirina desaparece, lo que significa que podemos descartar este tipo de liberación mediada por astrocitos. En la caracterización que hacemos del cultivo de neuronas puro, los astrocitos apenas alcanzan el 10% de la población total.

El siguiente mecanismo estudiado fue la exocitosis calcio-dependiente. Para ello empleamos un quelante de calcio intracelular, el BAPTA-AM (ácido 1,2-bis(2-aminofenoxy)etano-N,N,N',N'-tetraacético). Este compuesto disminuyó el glutamato liberado. Cuando además de con BAPTA-AM, se incubaba con aspirina (300 μ M), se observa una disminución aún mayor de la liberación de glutamato. Esto indica que el mecanismo de acción de la aspirina es independiente del mecanismo calcio-dependiente.

El último mecanismo que quedaba por analizar es el debido a la reversión del transportador. Casi simultáneamente, han sido publicados dos artículos (Rossi *et al.* 2000; Jabaudon *et al.* 2000) atribuyendo la mayoría del glutamato liberado en situaciones de isquemia a este mecanismo. Nosotros hemos estudiado este mecanismo empleando un inhibidor del recaptador como es el trans-PDC (ácido L-trans-pirrolidin-2,4-dicarboxílico). Es un inhibidor competitivo (Bridges *et al.*, 1991; Dunlop *et al.*, 1993) del glutamato. Se introduce en el interior de la célula en el periodo de preincubación, para después competir por el sitio de unión del glutamato a su transportador, teniendo una mayor afinidad. Además de impedir la unión del glutamato, ralentiza la velocidad de transporte. De esta forma, el recaptador de glutamato se ve dificultado para realizar su función. En la preincubación también tuvimos que añadir kinurenato, un bloqueante de receptores NMDA y

no NMDA, para evitar la excitotoxicidad inducida por la acumulación de glutamato en el espacio extracelular. En nuestros experimentos el trans-PDC produce una inhibición importante de la liberación de glutamato, mientras que la coincubación con aspirina (300 μ M) no modifica significativamente los valores obtenidos con trans-PDC. Esto nos está indicando que el mecanismo de acción de la aspirina es la inhibición de la reversión del transportador.

Por otra parte, también analizamos la neuroprotección por salicilatos debido a la inhibición de la translocación del factor nuclear κ B (Grilli *et al.*, 1996). Este efecto ha sido descrito a concentraciones elevadas de salicilatos (>1mM) y para su demostración se añadió glutamato exógenamente, lo que no permitió ver el efecto directo de la aspirina sobre la liberación. En nuestras condiciones, la aspirina (<1mM) no inhibe la muerte neuronal inducida por glutamato. Otro experimento que descarta este mecanismo es la incubación de las células con PDTC (pirrolidinditiocarbamato), un inhibidor de la translocación de este factor de transcripción (Schreck *et al.*, 1992), que no afecta la liberación de glutamato.

Alcanzado este punto, tenemos claro que la aspirina está actuando evitando la reversión del transportador. Ahora hay que saber si el efecto es directamente en la recaptación. Para ello, incubamos células control (sin POG) con glutamato tritiado y medimos el porcentaje de recaptación respecto al glutamato total. Interesantemente, al repetir el protocolo con aspirina (300 μ M), no hay variación ninguna del porcentaje de recaptación. Esto indica que la aspirina no actúa directamente sobre la recaptación, lo que nos obliga a analizar algún evento anterior a la reversión del transportador.

Es sabido que la reversión del transportador en el proceso isquémico es consecuencia de otros eventos anteriores en el tiempo. El primero de ellos es el fallo energético y la depleción de los niveles de ATP (Madl *et al.*, 1993). Nos decidimos a investigar este proceso, más aún, sabiendo que hay algunas publicaciones que han demostrado que la aspirina incrementa la tolerancia contra la hipoxia retrasando la caída de ATP (Riepe *et al.*, 1997) y otras que

apuntan que la prevención de la pérdida de ATP es una estrategia neuroprotectora (Kass y Lipton, 1989; Abramowicz *et al.*, 1991).

El modelo escogido fue el de mitocondrias y partículas submitocondriales aisladas de cerebro de rata (Lizasoain *et al.*, 1996). En este modelo comprobamos el efecto directo de la aspirina sobre la producción de ATP y sobre la respiración mitocondrial (electrodo de oxígeno).

Lo primero era comprobar que la POG de 90 minutos reducía los niveles de ATP de nuestras células. En este caso escogimos 90 minutos y no 150, como en los estudios de liberación de glutamato. El motivo de escoger este tiempo es porque con 90 minutos, no ha habido consumo de ATP por exocitosis o por lisis celular. Cuando incubamos las mitocondrias con aspirina se observa que hay un aumento en los niveles de ATP y un mayor consumo de oxígeno, pero sólo cuando se estimula la respiración a través del complejo I-III-IV (estimulado por el intercambiador de glutamato/malato). Cuando se estimula el complejo II-III-IV (con succinato), la producción de ATP y el consumo de oxígeno no se ven modificados.

Para confirmar que es un efecto directo de la aspirina sobre el complejo I-III (NADH-ubiquinona oxidoreductasa) y no es debido a otros efectos, hemos repetido las incubaciones, pero ahora con partículas submitocondriales. El resultado es el esperado, hay un aumento de la respiración mitocondrial por el complejo I-III (estimulado por NADH), mientras que II-III (succinato) y el IV (ascorbato/TMPD) no se ven alterados.

Repetimos el experimento con salicilato sódico para confirmar el efecto apreciado en los cultivos neuronales. El resultado fue el mismo, hay un incremento del consumo de oxígeno y de la producción de ATP a través del complejo I-III. De nuevo, hay una ausencia de efecto con la indometacina.

La habilidad de la aspirina para actuar en el complejo I-III de la cadena respiratoria mitocondrial había sido descrita ya hace casi 40 años (Whitehouse y Haslam, 1962) en otros tejidos. Además se describía la capacidad como

desacoplante de la fosforilación oxidativa, aumentando el consumo de oxígeno y disminuyendo la producción de ATP. En nuestro caso, hay un aumento de la producción de ATP, y además se produce cuando todavía hay oxígeno, lo que implica un cierto carácter preventivo.

Neurodegeneración y liberación de glutamato. Neuroprotección por aspirina *in vivo*.

Nos propusimos en la segunda parte de esta Tesis la corroboración de los datos obtenidos del modelo *in vitro* en un modelo *in vivo*. El modelo escogido es el de la oclusión de la arteria media cerebral (MCAO) en rata. Lo primero que comprobamos es que los animales que habían sido tratados con aspirina no variaban su temperatura como consecuencia de las propiedades antipiréticas.

La dosis más efectiva de aspirina fue la de 30mg/Kg, que en humanos corresponde a una dosis analgésica, según la fórmula de Mordenti y Borchard (1989).

$$\text{Dosis humano} = \text{Dosis animal}(\text{peso humano/peso animal})^{0.7}$$

$$X = 7,5\text{mg}(70\text{Kg}/0,25\text{Kg})^{0.7}; x=390\text{mg}.$$

Lo que primero observamos es que las ratas sometidas a MCAO liberan glutamato (Baker *et al.*, 1995; Puig *et al.*, 2000), como se ve en los niveles cerebrales y en los plasmáticos. Por el contrario, como cabría esperar, los animales tratados con aspirina sufren un menor daño isquémico ya que hay una menor liberación de glutamato. Ya hemos mencionado que antes de la liberación de glutamato, donde el mecanismo mayoritario es la reversión del transportador (Jabaudon *et al.*, 2000; Rossi *et al.*, 2000) hay una caída de los niveles de ATP (Madl y Burgessser, 1993). En el modelo de cultivo primario de neuronas hemos demostrado que la aspirina es capaz de aumentar los niveles de ATP para evitar el fallo energético y la posterior liberación de glutamato por el mecanismo mayoritario, la reversión del transportador. La comprobación *in vivo* ocurre cuando medimos el ATP en animales MCAO y MCAO tratados con

aspirina. Estos últimos tenían un contenido de ATP intracelular próximo a los animales SHAM, mientras que los primeros sufren una disminución significativa. Incluso los animales SHAM que recibieron aspirina, tienen unos niveles de ATP intracelular muy superiores a los de los animales SHAM sin tratamiento, lo que estaría confirmando el efecto de la aspirina aumentando la producción de ATP.

Además del efecto neuroprotector directo que hemos demostrado, que ocurre en los primeros momentos del infarto isquémico, otros mecanismos pueden estar contribuyendo a la neuroprotección por aspirina. Una menor liberación de glutamato estaría favoreciendo un menor daño por la menor expresión de algunas enzimas proinflamatorias, como la óxido nítrico sintasa inducible (Cárdenas *et al.*, 2000a) o la ciclooxigenasa tipo 2. En nuestro caso no parece que la inhibición de la translocación del NF- κ B esté influyendo decisivamente en el efecto neuroprotector, ya que ha sido escrito a concentraciones elevadas (antiinflamatorias) de aspirina.

Los datos y conclusiones obtenidas en esta Tesis, podrían tener una correlación en la clínica. Ya que se ha visto que un aumento de la concentración de glutamato en sangre y en fluido cerebroespinal está directamente relacionado con un deterioro neurológico del paciente (Castillo *et al.*, 1996).

Introducción.

Material y métodos.

Resultados.

Discusión.

Conclusiones.

Bibliografía.

Conclusiones.

Conclusiones más importantes obtenidas en esta Tesis:

1. *La exposición de cultivos primarios de neuronas corticales de rata a la privación de oxígeno y glucosa produce liberación de glutamato y muerte celular.*
2. *La incubación de los cultivos con aspirina es neuroprotectora, inhibiendo la liberación de glutamato a concentraciones correspondientes al rango analgésico.*
3. *El mecanismo de acción neuroprotector de la aspirina es la inhibición de la reversión del transportador de glutamato (mecanismo mayoritario de liberación en la isquemia cerebral).*
4. *La aspirina inhibe la reversión del transportador de glutamato al incrementar la producción de ATP, y este efecto lo ejerce a través del complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial.*
5. *En el modelo de oclusión de la arteria media cerebral de rata, la aspirina también es neuroprotectora a dosis analgésicas.*
6. *El mecanismo neuroprotector en este modelo es también a través del aumento de los niveles de ATP.*

Introducción.

Material y métodos.

Resultados.

Discusión.

Conclusiones.

Bibliografía.

BIBLIOGRAFÍA.

- Abramowicz AE., Kass IS., Chambers G., Cottrell JE. Midazolam improves electrophysiologic recovery after anoxia and reduces the changes in ATP levels and calcium influx during anoxia in the rat hippocampal slice. *Anesthesiology*. **74** (6): 1121-1128.
- Alberts MJ., Bertels C., Dawson DV. (1990). An analysis of time of presentation after stroke. *JAMA*. **263** (1): 65-68.
- Amato A., Barbour B., Szatkowski M., Attwell D. (1994). Counter-transport of potassium by the glutamate uptake carrier in glial cells isolated from the tiger salamander retina. *J Physiol*. **479** (3): 371-380.
- Anderson MF., Sims NR. (1999). Mitochondrial respiratory function and cell death in focal cerebral ischemia. *Journal of Neurochemistry*. **73**: 1189-1199.
- Aronica E., Condorelli DF., Niccoletti F., Dell'Albani P., Balazs R. (1993). Metabotropic glutamate receptors in cultured cerebellar granule cells: development profile. *J Neurochem*. **60**: 559-565.
- Asahi M., Asahi K., Jung J., Del Zoppo G., Fini ME., Lo EH. (2000). Role for matrix metalloproteinase 9 after focal cerebral ischemia: effects of gene knockout and enzyme inhibition with BB-94. *J Cereb Blood Flow Metab*. **20**: 1681-89.
- Astrup J., Symon L., Branston NM., Lassen NA. (1977). Cortical evoked potential and extracellular K⁺ and H⁺ at critical levels of brain ischemia. *Stroke*. **8** (1): 51-57.
- Attwell D., Barbour B., Szatkowski M. (1993). Nonvesicular release of neurotransmitter. *Neuron*. **11** (3): 401-407.
- Aubin N., Curet O., Deffois A., Carter C. (1998). Aspirin and salicylate protect against MPTP-induced dopamine depletion in mice. *Journal of Neurochemistry*. **71** (4): 1635-1642.
- Baker CJ., Fiore AJ., Frazzini VI., Choudhri TF., Zubay GP., Solomon RA. (1995). Intraischemic hypothermia decreases the release of glutamate in the cores of permanent focal cerebral infarcts. *Neurosurgery*. **36** (5): 994-1001.
- Balasingam V., Tejada-Berges T., Wright E., Bouckova R., Yong VW. (1994). Reactive astrogliosis in the neonatal mouse brain and its modulation by cytokines. *J Neurosci*. **14**: 846-56.
- Baldwin HA., Williams JL., Snares M., Ferreira T., Cross AJ., Green AR. (1994). Attenuation by chlormetiazole administration of the rise in extracellular amino acids

- following focal ischaemia in the cerebral cortex of the rat. *Br J Pharmacol.* **112**: 188-194.
- Barbour B., Szatkowski M., Ingledew N., Attwell D. (1989). Arachidonic acid induces a prolonged inhibition of glutamate uptake into glial cells. *Nature.* **342** (6252): 918-920.
 - Barone FC., White RF., Spera PA. (1998). Ischemic preconditioning and brain tolerance. Temporal histological and functional outcomes, protein synthesis requirement and interleukin-1 receptor antagonist and early gene expression. *Stroke* **29**: 1937-51.
 - Bates S., Read SJ., Harrison DC., Topp S., Morrow R., Gale D., Murdock P., Barone FC., Parsons AA., Gloger IS. (2001). Characterisation of gene expression changes following permanent MCAO in the rat using subtractive hybridisation. *Mol Brain Res.* **93**: 70-80.
 - Bazan NG. (1989). Arachidonic acid in the modulation of excitable membrane function and at the onset of brain damage. *Ann N Y Acad Sci.* **559**: 1-16.
 - Beckman JS., Beckman TW., Chen J., Marshall PA., Freeman BA. (1990). Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc Natl Acad Sci. USA.* **87** (4): 1620-1624.
 - Bederson JB., Pitts LH., Germano SM., Nishimura MC., Davis RL. (1986b). Evaluation of 2,3,5-Triphenyltetrazolium Chloride as a stain for detection and quantification of experimental cerebral infarction in rats. *Stroke.* **17**: 1304-1307.
 - Bederson JB., Pitts LH., Tsuji M., Nishimura MC., Davis RL. (1986a). Rat middle cerebral artery occlusion: evaluation of the model and development of a neurologic examination. *Stroke.* **17**: 472-478.
 - Bednar MM., Kohut JJ., Kimelberg HK., Gross JJ., Gross CE. (1992). In vitro evidence supporting two mechanisms of action for the transport inhibitor L-644,711 in cerebral ischaemia. *Neurol Res.* **14**: 53-62.
 - Benveniste H., Drejer J., Schousboe A., Diemer NH. (1984). Elevation of the extracellular concentrations of glutamate and aspartate in rat hippocampus during transient cerebral ischemia monitored by intracerebral microdialysis. *J Neurochem.* **43** (5): 1369-1374.
 - Bezzi P., Carmignoto G., Pasti L., Vesce S., Rossi D., Rizzini BL., Pozzan T., Volterra A. (1998) Prostaglandins stimulate calcium-dependent glutamate release in astrocytes. *Nature.* **391**: 281-285.

- Borchard RE., Barnes CD., Eltherington LG. (1992). Drug dosage in laboratory animals: a handbook, 3ed. CRC Press, Boca Raton.
- Bormann J. (2000). The 'ABC' of GABA receptors. *Trends Pharmacol.* **21**: 16-19.
- Boyer PD. (1993). The binding change mechanism for ATP synthase--some probabilities and possibilities. *Biochim Biophys Acta.* **1140** (3): 215-50.
- Boyer PD. (1997). The ATP synthase--a splendid molecular machine. *Annu Rev Biochem.* **66** :717-49.
- Brandt U. (1997). Proton-translocation by membrane-bound NADH:ubiquinone-oxidoreductase (complex I) through redox-gated ligand conduction. *Biochimica et Biophysica Acta.* **1318**: 79-91.
- Bridges RJ., Stanley MS., Anderson MW., Cotman CW., Chamberlain AR. (1991). Conformationally defined neurotransmitter analogues. Selective inhibition of glutamate uptake by one pyrrolidine-2,4-dicarboxylate diastereomer. *J Med Chem.* **34** (2): 717-725.
- Brott T., Bogousslavsky J. (2000). Treatment of acute ischemic stroke. *N Eng J Med.* **343** 10: 710-722.
- Budd DC., May GR., Nicholls DG., McCormack JG. (1996). Inhibition by lifarizine of intracellular Ca²⁺ rises and glutamate exocytosis in depolarized rat cerebrocortical synaptosomes and cultured neurons. *The British Journal of Pharmacology.* **118**: 162-166.
- Cárdenas A., Hurtado O., Leza JC., Lorenzo P., Bartrons R., Lizasoain I., Moro MA. (2000b). Fructose-1,6-bisphosphate inhibits the expression of inducible nitric oxide synthase caused by oxygen-glucose deprivation through the inhibition of glutamate release in rat forebrain slices. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* **362** (3): 208-212.
- Cárdenas A., Moro MA., Hurtado O., Leza JC., Lorenzo P., Castrillo A., Bodelon OG., Bosca L., Lizasoain I. (2000a). Implication of glutamate in the expression of inducible nitric oxide synthase after oxygen and glucose deprivation in rat forebrain slices. *J Neurochem.* **74** (5): 2041-2048.
- Carolei A., Prencipe M., Fiorelli M., Fieschi C. (1986). Severity of stroke and aspirin. *Neurology.* **36** (7): 1001-1010.
- Castillo J. (2000). Fisiopatología de la isquemia cerebral. *Revista de neurología.* **30** (5): 459-464.
- Castillo J. Álvarez Sabín J., Martí-Viralta JL., Martínez Vila E., Matías-Guiu J. (1999). Manual de enfermedades vasculares cerebrales. Prous science. 2ª edición.

- Castillo J., Dávalos A., Naveiro J., Moya M. (1996). Neuroexcitatory aminoacids and their relationships to infarct size and neurological deficit in ischemic stroke. *Stroke*. **27**:1060-1065.
- Chan PH. (1996). Role of oxidants in ischemic brain damage. *Stroke*. **27** (6): 1124-1129.
- Choi DW. (1988). Glutamate neurotoxicity and diseases of the nervous system. *Neuron*. **1**: 623-634.
- Choi DW., Koh JY. (1998). Zinc and brain injury. *Annu Rev Neurosci*. **21**: 347-375.
- Clark RK., Lee EV., Fish CJ., White RF., Price WJ., Jonak GL., Feuerstein GZ., Barone FC. (1993). Development of tissue damage, inflammation and resolution following stroke: an immunohistochemical and quantitative planimetric study. *Brain Res Bull*. **31**: 565-72.
- Coffey ET., Sihra TS., Nicholls DG. (1993). Protein kinase C and the regulation of glutamate exocytosis from cerebrocortical synaptosomes. *The Journal of Biological Chemistry*. **268** (28): 21060-21065.
- Coffey ET., Sihra TS., Nicholls DG., Pocock JM. (1994). Phosphorylation of synapsin I and MARCKS in nerve terminals is mediated by Ca²⁺ entry via A_ga-GI sensitive Ca²⁺ channel which is coupled to glutamate exocytosis. *FEBS Letters*. **353**: 264-268.
- Cooper JR., Bloom FE., Roth RH. (1991). The biochemical basis of neuropharmacology. Oxford University Press. 6^a edición.
- Cornell-Bell AH., Finkbeiner SM., Cooper MS., Smith SJ. (1990). Glutamate induces calcium waves in cultured astrocytes: long-range glial signaling. *Science*. **247**: 470-473.
- Cotman CW., Foster A., Lanthorn T. (1981). An overview of glutamate as a neurotransmitter. *Adv Biochem Psychopharmacol*. **27**: 1-27.
- Courtney MJ., Nicholls DG. (1992). Interactions between phospholipase C-coupled and N-methyl-D-aspartate receptor in cultured cerebellar granule cells: protein kinase C mediated inhibition of N-methyl-D-aspartate. *J Neurochem*. **59**: 983-992.
- Darley-Usmar VM., Rickwood D., Wilson MT. (1987). Mitochondria, a practical approach. IRL Press.
- Delhase M., Li N., Karin M. (2000). Signalling pathways: Kinase regulation in inflammatory response. *Nature*. **406**: 367-368.
- Dreier J., Benveniste H., Diemer NH., Schousboe A. (1985). Cellular origin of ischemia-induced glutamate release from brain tissue in vivo and in vitro. *J Neurochem*. **45**: 145-151.

- Dubois RN., Abramson SB., Crofford L., Gupta RA., Simon LS., Van De Putte LB., Lipsky PE. (1998) Cyclooxygenase in biology and disease. *The FASEB Journal*. **12**: 1063-1073.
- Dunlop J., Grieve A., Griffiths R. (1993). L-trans-pyrrolidine-2,4-dicarboxylic acid (L-transPDC) has properties consistent with that of a competitive substrate for the plasma membrane glutamate transporter. *Biochem Soc Trans*. **21** (2): 111S.
- Dutton PL., Moser CC., Sled VD., Daldal F., Ohnishi T. (1998). A reductant-induced oxidation mechanism for complex I. *Biochimica et Biophysica Acta*. **1364**: 245-257.
- Frantz B., O'Neill EA. (1995). The effect of sodium salicylate and aspirin on NF- κ B. *Science*. **270**: 2017-2018.
- Frederickson CJ. (1989). Neurobiology of zinc and zinc-containing neurons. *Int Rev Neurobiol*. **31**: 145-238.
- Friedrich T., Steinmüller K., Weiss H. (1995). The proton-pumping respiratory complex I of bacteria and mitochondria and its homologue in chloroplasts. *FEBS Letters*. **367**: 107-111.
- Galeffi F., Sinnar S., Schwartz-Bloom D. (2000). Diazepam promotes ATP recovery and prevents cytochrome c release in hippocampal slices after in vitro ischemia. *Journal of Neurochemistry*. **75** (3): 1242-1249.
- Gallo V., Ciotti MT., Colleti A., Aloisi F., Levi G. (1982). Selective release of glutamate from cerebellar granule cells differentiating in culture. *Proc Natl Acad Sci USA*. **79**: 7919-7923.
- Gallo V., Ghiani CA. (2000). Glutamate receptors in glia: new cells, new inputs and new functions. *Trends Pharmacol*. **21**: 252-258.
- García JH., Kamijyo Y. (1974). Cerebral infarction: evolution of histopathological changes after occlusion of a middle cerebral artery in primates. *J Neuropathol Exp Neurol*. **33**: 409-21.
- Gray MW., Burger G., Lang BF. (1999). Mitochondrial evolution. *Science*. **283** (5407): 1476-1481.
- Grigorieff N. (1998). Three-dimensional structure of bovine NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) at 2.2 Å in ice. *J Mol Biol*. **277** (5): 1033-1046.
- Grilli M., Pizzi M., Memo M., Spano PF. (1996). Neuroprotection by aspirin and sodium salicylate through blockade of NF- κ B activation. *Science*. **274**: 1383-1385.
- Grotta JC., Lemark NA., Gary H., Fields WS., Vital D. (1985). Does platelet antiaggregant therapy lessen the severity of stroke?. *Neurology*. **35** (5): 632-635.

- Guenebaut V., Schlitt A., Weiss H., Leonard K., Friedrich T. (1998). Consistent structure between bacterial and mitochondrial NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I). *J Mol Biol.* **276** (1): 105-112.
- Hagerhall C. (1997). Succinate: quinone oxidoreductases. Variations on a conserved theme. *Biochim Biophys Acta.* **1320** (2): 107-41.
- Hakim AM. (1987). The cerebral ischemic penumbra. *Can J Neurol Sci.* **14** (4): 557-559.
- Hakim AM., Shoubridge EA. (1989). Cerebral acidosis in focal ischemia. *Cerebrovasc Brain Metab Rev.* **1** (2): 115-32.
- Hakuba N., Koga K., Gyo K., Usami SI., Tanaka K. (2000). Exacerbation of noise-induced hearing loss in mice lacking the glutamate transporter GLAST. *J Neurosci.* **20** (23): 8750-8753.
- Hansen MB., Nielsen SE., Berg K. (1989). Re-examination and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth/cell kill. *J Immunol Meth.* **119**: 203-210.
- Harrison. (1994). Medicina interna. Vol II. Interamericana McGraw-Hill. 13ª edición.
- Herrero MT., Oset-Gasque MJ., Cañadas S., Vicente S., González MP. (1998). Effect of various depolarizing agents on endogenous amino acid neurotransmitter release in rat cortical neurons in culture. *Neurochemistry International.* **32**: 257-264.
- Herrero MT., Oset-Gasque MJ., López E., Vicente S., González MP. (1999). Mechanism by which GABA, through its GABA_A receptor, modulates glutamate release from rat cortical neurons in culture. *Neurochemistry International.* **34**: 141-148.
- Hossmann KA. (1994). Viability thresholds and the penumbra of focal ischemia. *Ann Neurol.* **36** (4): 557-565.
- Hossmann KA., Kleihues P. (1973). Reversibility of ischemic brain damage. *Arch Neurol.* **29** (6): 375-384.
- Hsu CY., An G., Liu JS., Xue JJ., He YY., Lin TN. (1993). Expression of immediate early gene and growth factor mRNAs in a focal cerebral ischemia model in the rat. *Stroke.* **24**: 178-8.
- Hurtado O., Cárdenas A., Lizasoain I., Boscá L., Leza JC., Lorenzo P., Moro MA. (2001). Up-regulation of TNF- α convertase (TACE/ADAM17) after oxygen-glucose deprivation in rat forebrain slices. *Neuropharmacology* **40**:1093-1101.
- Iadecola C. (1997). Bright and dark sides of nitric oxide in ischemic brain injury. *Trends Neurosci.* **17**: 6669-6677.

- Iadecola C. (1999). Cerebral ischemia. Molecular and Cellular Pathophysiology. Humana Press.
- Ikeda M., Nakazawa T., Abe K., Kaneko T., Yamatsu K. (1989). Extracellular accumulation of glutamate in the hippocampus induced by ischemia is not calcium dependent-in vitro and in vivo evidence. *Neuroscience Letters*. **96**: 202-206.
- Jabaudon D., Scanziani M., Gähwiler BH., Gerber U. (2000). Acute decrease in net glutamate uptake during energy deprivation. *Proc Natl Acad Sci. USA*. **97**: 5610-5615.
- Jabaudon D., Shimamoto K., Yasuda-Kamatani Y., Scanziani M., Gähwiler BH, Gerber U. (1999). Inhibition of uptake unmasks rapid extracellular turnover of glutamate of nonvesicular origin. *Proc Natl Acad Sci. USA*. **96**: 8733-8738.
- Jacewicz M, Kiessling M, Pulsinelli WA. (1986). Selective gene expression in focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab*. **6** (3): 263-72.
- Kagansky N., Levy S., Knobler H. (2001). The role of hyperglycemia in acute stroke. *Arch Neurol*. **58** (8): 1209-1212.
- Kanai Y., Smith CP., Hediger A. (1993). A new family of neurotransmitter transporters: the high-affinity glutamate transporters. *The FASEB Journal*. **7**: 1450-1459.
- Kass IS., Lipton P. (1989). Protection of hippocampal slices from young rats against anoxic transmission damage is due to better maintenance of ATP. *J Physiol*. **413**: 1-11.
- Katayama Y., Kawamata T., Tamura T., Hovda DA., Becker DP., Tsubokawa T. (1991). Calcium-dependent glutamate release concomitant with massive potassium flux during cerebral ischemia in vivo. *Brain research*. **558**: 136-140.
- Katchman AN., Hershkowitz N. (1993). Early anoxia-induced vesicular glutamate release results from mobilization of calcium from intracellular stores. *J Neurophysiol*. **70**: 1-7.
- Keith RF., Elliot F. (1979). The preparation and use of isolated cells for metabolic studies. *Tech Metabol Res B*. **204**: 1-20.
- Khayyam N., Thavendiranathan P., Carmichael FJ., Kus B., Jay V., Burnham WM. (1999). Neuroprotective effects of acetylsalicylic acid in an animal model of focal brain ischemia. *Neuroreport*. **10**: 371-374.
- Kiefer JR., Pawlitz JL., Moreland KT., Stageman RA., Hood WF., Gierse JK., Stevens AM., Goodwin DC., Rowlinson SW., Marnett LJ., Stallings WC, Kurumbail RG. (2000). Structural insights into the stereochemistry of the cyclooxygenase reaction. *Nature*. **405**: 97-101.

- Kim YH., Kim EY., Gwag BJ., Sohn S., Koh JY. (1999). Zinc-induced cortical neuronal death with features of apoptosis and necrosis: mediation by free radicals. *Neuroscience*. **89** (1): 175-82.
- Kimelberg HK., Goderie SK., Higman S., Pang S., Waniewski RA. (1990). Swelling-induced release of glutamate, aspartate, and taurine from astrocyte cultures. *J Neurosci*. **10** (5): 1583-1591.
- Kochanek PM., Hallenbeck JM. (1992). Polymorphonuclear leukocytes and monocytes/macrophages in the pathogenesis of cerebral ischemia and stroke. *Stroke*. **23**: 1367-1379.
- Koh JY., Choi DW. (1987). Quantitative determination of glutamate mediated cortical neuronal injury in cell culture by lactate dehydrogenase efflux assay. *J Neurosci Meth*. **20**: 83:90.
- König N., Serrano P., Drian MJ. (1994). AMPA elicits long-lasting, partly hypothermia-sensitive calcium responses in acutely dissociated or cultured embryonic brainstem cells. *Neurochemistry International*. **24** (5): 459-471.
- Kontos HA. (1985). George E. Brown memorial lecture. Oxygen radicals in cerebral vascular injury. *Circ Res*. **57** (4): 508-16.
- Kopp E., Ghosh S. (1994). Inhibition of NF- κ B by sodium salicylate and aspirin. *Science*. **265**: 956-959.
- Kuhn W., Müller T., Büttner T., Gerlach M. (1995). Aspirin as a free radical scavenger: Consequences for therapy of cerebrovascular ischemia. *Stroke*. **26** (10): 1959-1960.
- Kwon G., Hill JR., Corbett JA., McDaniel ML. (1997). Effects of aspirin on nitric oxide formation and de novo protein synthesis by RINm5F cells and rat islets. *Molecular Pharmacology*. **52**: 398-405.
- Lascola C., Kraig RP. (1997). Astroglial acid-base dynamics in hyperglycemic and normoglycemic global ischemia. *Neurosci Biobehav Rev*. **21** (2): 143-50.
- Lee JM., Grabb MC., Zipfel GJ., Choi DW. (2000). Brain tissue responses to ischemia. *J Clin Invest*. **106** (6): 723-731.
- Lindroth P., Mopper K. (1979). High performance liquid chromatographic determination of subpicomole amounts of amino acids by precolumn fluorescence derivatization with o-phthaldehyde. *Annal Chem*. **51**: 1667-1674.
- Lipton P. (1999). Ischemic cell death in brain neurons. *Physiol. Rev*. **79**: 1431-1568.
- Lipton P. (1999). Ischemic cell death in brain neurons. *Physiological reviews*. **79** (4): 1431-1568.

- Lizasoain I., Moro MA., Knowles RG., Darley-Usmar V., Moncada S. (1996). Nitric oxide and peroxynitrite exert distinct effects on mitochondrial respiration which are differentially blocked by glutathione or glucose. *Biochem J.* **314**: 877-880.
- Lobner D., Canzoniero LM., Manzerra P., Gottron F., Ying H., Knudson M., Tian M., Dugan LL., Kerchner GA., Sheline CT., Korsmeyer SJ., Choi DW. (2000). Zinc-induced neuronal death in cortical neurons. *Cell Mol Biol.* **46** (4): 797-806.
- Lutter R., Saraste M., van Walraven HS., Runswick MJ., Finel M., Deatherage JF., Walker JE. (1993). F1F0-ATP synthase from bovine heart mitochondria: development of the purification of a monodisperse oligomycin-sensitive ATPase. *Biochem J.* **295**:799-806.
- MacKinnon AC., Wyatt KM., McGivern JG., Sheridan RD., Brown CM. (1995). [3H]-lifarizine, a high affinity probe for inactivated sodium channels. *Br J Pharmacol.* **115** (6): 1103-1109.
- Madl JE., Burgesser K. (1993). Adenosine triphosphate depletion reverses sodium-dependent, neuronal uptake of glutamate in rat hippocampal slices. *The Journal of Neuroscience.* **13** (10): 4429-4444.
- Malkowski MG., Ginell SL., Smith WL., Garavito RM. (2000). The productive conformation of arachidonic acid bound to prostaglandin synthase. *Science.* **289**: 1933-1937.
- Margulis L. (1970). Recombination of non-chromosomal genes in Chlamydomonas: assortment of mitochondria and chloroplasts?. *J Theor Biol.* **26** (2): 337-342.
- Marmo E. (1988). L-glutamic acid as a neurotransmitter in the CNS. *Med Res Rev.* **8** (3): 441-458.
- Martin D., Bustos GA., Bowe MA., Bray SD., Nadler JV. (1991). Autoreceptor regulation of glutamate and aspartate release from slices of the hippocampal CA1 area. *Journal of Neurochemistry.* **56** (5): 1647-1655.
- Masferrer JL., Needleman P. (2000). Anti-inflammatories for cardiovascular disease. *Proc Natl Acad Sci. USA.* **97** (23): 12400-12401.
- Mattson MP., Culmsee C., Yu Z., Camandola S. (2000). Roles of nuclear factor κ B in neuronal survival and plasticity. *Journal of Neurochemistry.* **74**: 443-456.
- Mattson MP., Culmsee C., Yu Z., Camandola S. (2000). Roles of nuclear factor κ B in neuronal survival and plasticity. *J Neurochem.* **74**:443-456.
- McAdam BF., Castella-Lawson F., Mardini IA., Kapoor S., Lawson JA., FitzGerald GA. (1999). Systemic biosynthesis of prostacyclin by cyclooxygenase (COX-2): The human pharmacology of a selective inhibitor of COX-2. *Proc Natl Acad Sci. USA.* **96**: 272-277.

- Miller RJ. (1991). The control of neuronal calcium homeostasis. *Prog Neurobiol.* **37**: 255-285.
- Mordenti J., Chapell W. (1989). The use of interspecies scaling in toxicokinetics. *Toxicokinetics and drug development.* Pergamon Press.
- Moro MA., De Alba J., Cárdenas A., De Cristóbal J., Lizasoain I., Leza JC., Lorenzo P. (2000). Mechanisms of the neuroprotective effect of aspirin after oxygen and glucose deprivation in rat forebrain slices. *Neuropharmacology.* **39**: 1309-1318.
- Mosmann T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Meth.* **65**: 55-63.
- Muñoz-Torrero JJ., Mora FJ., Díez-Tejedor E. (2000). Tratamiento del infarto cerebral agudo. Presente y futuro. *Revista de Neurología.* **30** (10): 959-982.
- Nedergaard M., Astrup J. (1986). Infarct rim: effect of hyperglycemia on direct current potential and [14C]2-deoxyglucose phosphorylation. *J Cereb Blood Flow Metab.* **6** (5): 607-615.
- Nicholls D., Attwell D. (1990). The release and uptake of excitatory amino acids. *Trends Pharmacol Sci.* **11**: 462-468.
- Norton WT., Aquino DA., Hozumi I., Chiu TC., Brosnan CF. (1992). Quantitative aspects of reactive gliosis: a review. *Neurochem Res.* **17**: 877-885.
- Nowak TS. Jr., Ikeda J., Nakajima T. (1990). 70 kDa heat shock protein and c-fos gene expression after transient ischemia. *Stroke.* **21**: 107-11.
- O'Neill LAJ., Kaltschmidt C. (1997). NF- κ B: a crucial factor for glial and neuronal cell function. *Trends Neurosci.* **20** (6): 252-258.
- Okada Y., Copeland BR., Mori E., Tung MM., Thomas WS., Del Zoppo GZ. (1994). P-selectin and intercellular adhesion molecule-1 expression after focal brain ischemia and reperfusion. *Stroke.* **25**: 202-211.
- Olanow CW. (1993). A radical hypothesis for neurodegeneration. *Trends Neurosci.* **16** (11): 439-444.
- Olney JW., Sharpe LG. (1969). Brain lesions in an infant rhesus monkey treated with monosodium glutamate. *Science.* **166** (903): 386-388.
- Orrenius S., McConkey DJ., Bellomo G., Nicotera P. (1989). Role of Ca²⁺ in toxic cell killing. *Trends Pharmacol Sci.* **10** (7): 281-285.
- Ottersen OP., Zhang N., Walberg F. (1992). Metabolic compartmentation of glutamate and glutamine: morphological evidence obtained by quantitative immunocytochemistry in rat cerebellum. *Neuroscience.* **46** (3): 519-524.

- Oubidar M., Boquillon M., Marie C., Schreiber L., Bralet J. (1994). Ischemia-induced brain iron delocalization: effect of iron chelators. *Free Radic Biol Med.* **16** (6): 861-867.
- Palmada M., Böhmer C., Centelles JJ., Kinne RKH. (1999). Effect of benzodiazepines on the epithelial and neuronal high-affinity glutamate transporter EAAC1. *Journal of Neurochemistry.* **73**: 2389-2396.
- Palmiter RD., Cole TB., Quaife CJ., Findley SD. (1996). ZnT-3, a putative transporter of zinc into synaptic vesicles. *Proc Natl Acad Sci. USA.* **93** (25): 14934-14939.
- Parnas H., Segel L., Dudel J., Parnas I. (2000). Autoreceptors, membrane potential and regulation of transmitter release. *Trends Neurosci.* **23** (2): 60-68.
- Paxinos G., Watson C. (1986). The rat brain in stereotaxic coordinates. Academic Press, New York.
- Pekoe G., Van Dyke K., Mengoli H., Peden D., English D. (1982). Comparison of the effects of antioxidant non-steroidal anti-inflammatory drugs against myeloperoxidase and hypochlorous acid luminol-enhanced chemiluminescence. *Agents Actions.* **12** (1-2): 232-238.
- Peña F., Tapia R. (1999). Relationships among seizures, extracellular amino acid changes and neurodegeneration induced by 4-aminopyridine in rat hippocampus: A microdialysis and electroencephalographic study. *Journal of Neurochemistry.* **72**: 2006-2014.
- Phillis JW., Smith-Barbour M., Perkins LM., O'Regan MH. (1994). Characterization of glutamate, aspartate and GABA release from ischemic rat cerebral cortex. *Brain Research Bulletin.* **34** (5): 457-466.
- Pisano P., Samuel D., Nieoullon A., Kerkerian-Le Goff L. (1996). Activation of the adenylate cyclase-dependent protein kinase pathway increases high affinity glutamate uptake into rat striatal synaptosomes. *Neuropharmacology.* **35** (5): 541-547.
- Pober JS., Cotran RS. (1990). Cytokines and endothelial cell biology. *Physiol Rev.* **70**: 427-51.
- Pocock JM., Cousin MA., Parkin J., Nicholls DG. (1995). Glutamate exocytosis from cerebellar granule cells: The mechanism of a transition to an L-type Ca²⁺ channel coupling. *Neuroscience.* **67** (3): 595-607.
- Puig N., Davalos A., Adan J., Piulats J., Martinez JM., Castillo J. (2000). Serum amino acid levels after permanent middle cerebral artery occlusion in the rat. *Cerebrovasc Dis.* **10** (6): 449-454.

- Riepe MW., Kasischke K., Raupach A. (1997). Acetylsalicylic acid increases tolerance against hypoxic and chemical hypoxia. *Stroke*. **28** (10): 2006-2011.
- Robinson MB. (1999). The family of sodium-dependent glutamate transporters: a focus on the GLT-1/EAAT2 subtype. *Neurochemistry International*. **33**: 479-491.
- Rosenberg GA., Estrada EY., Dencoff JE. (1998). Matrix metalloproteinases and TIMPs are associated with blood-brain barrier opening after reperfusion in rat brain. *Stroke*. **29**: 2189-95.
- Rosenberg GA., Navratil M., Barone F., Feuerstein G. (1996). Proteolytic cascade enzymes increase in focal cerebral ischemia in rat. *J. Cereb. Blood Flow Metab*. **16**: 360-366.
- Rossi DJ., Oshima T., Attwell D. (2000). Glutamate release in severe brain ischaemia is mainly by reversed uptake. *Nature*. **403** (20): 316-321.
- Sanchez-Prieto J., Gonzalez P. (1988). Occurrence of a large Ca²⁺-independent release of glutamate during anoxia in isolated nerve terminals (synaptosomes). *J Neurochem*. **50** (4): 1322-1324.
- Sarantis M., Attwell D. (1990). Glutamate uptake in mammalian retinal glia is voltage- and potassium-dependent. *Brain Research*. **516**: 322-325.
- Saraste M. (1999). Oxidative phosphorylation at the *fin de siècle*. *Science*. **283**: 1488-1493.
- Schreck R., Meier B., Mannel DN., Droge W., Baeuerle PA. (1992). Dithiocarbamates as potent inhibitors of nuclear factor kappa B activation in intact cells. *J Exp Med*. **175** (5): 1181-1194.
- Seal RP., Amara SG. (1998). A reentrant loop domain in the glutamate carrier EAAT1 participates in substrate binding and translocation. *Neuron*. **21** (6): 1487-1498.
- Seal RP., Amara SG. (1999). Excitatory amino acid transporters: A family in flux. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. **39**: 431-456.
- Sharp FR., Massa SM., Swanson RA. (1999). Heat-shock protein protection. *Trends Neurosci*. **22**: 97-99.
- Shoffner JM., Wallace DC. (1993). Oxidative phosphorylation diseases and stroke. *Heart Dis Stroke*. **2** (5): 439-445.
- Siesjo BK. (1988). Acidosis and ischemic brain damage. *Neurochem Pathol*. **9**: 31-88.
- Sims KD., Straff DJ., Robinson MB. (2000). Platelet-derived growth factor rapidly increases activity and cell surface expression of the EAAC1 subtype of glutamate

- transporter through activation of phosphatidylinositol 3-kinase. *The Journal of Biological Chemistry*. **274** (7): 5228-5327.
- Sjostrand FS., Dubochet J., Wurtz M., Kellenberger E. (1978). Dark-field electron microscopic analysis of mitochondrial membranes. *J Ultrastruct Res*. **65** (1): 23-29.
 - Skehel JM., Fearnley IM., Walker JE. (1998). NADH:ubiquinone oxidoreductase from bovine heart mitochondria: sequence of a novel 17.2kDa subunit. *FEBS Letters*. **438**: 301-305.
 - Smith JL. (1998). Secret life of cytochrome bc1. *Science*. **281** (5373): 58-59.
 - Snider BJ., Lobner D., Yamada KA., Choi DW. (1998). Conditioning heat stress reduces excitotoxic and apoptotic components of oxygen-glucose deprivation-induced neuronal death in vitro. *Journal of Neurochemistry*. **70**: 120-129.
 - Storck T., Schulte S., Hofmann K., Stoffel W. (1992). Structure, expression, and functional analysis of a Na(+)-dependent glutamate/aspartate transporter from rat brain. *Proc Natl Acad Sci. USA*. **89** (22): 10955-10959.
 - Szatkowski M., Attwell D. (1994). Triggering and execution of neuronal death in brain ischaemia: two phases of glutamate release by different mechanisms. *Trends Neurosci*. **17**: 359-365.
 - Szatkowski M., Barbour B., Attwell D. (1990). Non-vesicular release of glutamate from glial cells by reversed electrogenic glutamate uptake. *Nature*. **348** (6300): 443-446.
 - Szatkowski M., Barbour B., Attwell D. (1991). The potassium-dependence of excitatory amino acid transport: resolution of a paradox. *Brain Research*. **555** (2): 343-345.
 - Takahashi M., Billups B., Rossi D., Sarantis M., et al. (1997). The role of glutamate transporters in glutamate homeostasis in the brain. *J Exp Biol*. **200** (2): 401-409.
 - Tamura A., Graham DI., McCulloch J., Teasdale GM. (1981). Focal cerebral ischaemia in the rat: 1. Description of technique and early neuropathological consequences following middle cerebral artery occlusion. *J Cereb Flow Metab*. **1**: 53-60.
 - Tanaka J., Ichikawa R., Watanabe M., Tanaka K., Inoue Y. (1997). Extra-junctional localization of glutamate transporter EAAT4 at excitatory Purkinje cell synapses. *Neuroreport*. **8** (11): 2461-2464.
 - Tanke HJ., van der Linden PW., Langerak J. (1982). Alternative fluorochromes to ethidium bromide for automated read out of cytotoxicity tests. *J Immunol Meth*. **52**: 91-96.

- Tareilus E., Breer H. (1992). Rapid depolarization-induced changes in intrasynaptosomal calcium concentrations. *Neurochemistry International*. **20** (3): 275-279.
- Tonder N., Johansen FF., Frederickson CJ., Zimmer J., Diemer NH. (1990). Possible role of zinc in the selective degeneration of dentate hilar neurons after cerebral ischemia in the adult rat. *Neurosci Lett*. **109** (3): 247-252.
- Trotti D., Aoki M., Pasinelli P., Berger UV., Danbolt NC., Brown RH. Jr., Hediger MA. (2001b). Amyotrophic lateral sclerosis-linked glutamate transporter mutant has impaired glutamate clearance capacity. *J Biol Chem*. **276** (1): 576-582.
- Trotti D., Danbolt NC., Volterra A. (1998). Glutamate transporters are oxidant-vulnerable: a molecular link between oxidative and excitotoxic neurodegeneration?. *Trends Pharmacol Sci*. **19**: 328-334.
- Trotti D., Nussberger S., Volterra A., Hediger MA. (1997). Differential modulation of the uptake currents by redox interconversion of cysteine residues in the human neuronal glutamate transporter EAAC1. *Eur J Neurosci*. **9** (10): 2207-2212.
- Trotti D., Peng J., Dunlop J., Hediger MA. (2001a). Inhibition of the glutamate transporter EAAC1 expressed in *Xenopus* oocytes by phorbol esters. *Brain Res*. **914** (1-2): 196-203.
- Tsukihara T., Aoyama H., Yamashita E., Tomizaki T., Yamaguchi H., Shinzawa-Itoh K., Nakashima R., Yaono R., Yoshikawa S. (1996). The whole structure of the 13-subunit oxidized cytochrome c oxidase at 2.8 Å. *Science*. **272** (5265): 1136-1144.
- Uemura Y., Kowall NW., Moskowitz MA. (1991). Focal ischemia in rats causes time-dependent expression of c-fos protein immunoreactivity in widespread regions of ipsilateral cortex. *Brain Res*. **552**: 99-105.
- Utsunomiya-Tate N., Endou H., Kanai Y. (1997). Tissue specific variants of glutamate transporter GLT-1. *FEBS Lett*. **416** (3): 312-316.
- Vane JR., Bakhle YS., Botting RM. (1998). Cyclooxygenase 1 and 2. *Annu. Rev. Pharmacol Toxicol*. **38**: 97-120.
- Villalba M., Martinez-Serrano A., Börner C., Blanco P., Satrustegui J. (1992). NMDA-induced increase in $[Ca^{2+}]_i$ and $^{45}Ca^{2+}$ uptake in acutely dissociated brain cells derived from adult rats. *Brain research*. **570**: 347-353.
- Volterra A., Bezzi P., Rizzini BL., Trotti D., Ullensvang K., Danbolt NC., Racagni G. (1996). The competitive transport inhibitor L-trans-pyrrolidine-2,4-dicarboxylate triggers excitotoxicity in rat cortical neuron-astrocyte co-cultures via glutamate release rather than uptake inhibition. *Eur J Neurosci*. **8** (9): 2019-2028.

- Walker JE. (1992). The NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) of respiratory chains. *Q Rev Biophys.* **25** (3): 253-324.
- Wallace JL. (1999). Selective COX-2 inhibitors: is the water becoming muddy?. *Trends Pharmacol Sci.* **20**: 4-6.
- Wang XK., Siren AL., Yue TL., Barone FC., Feuerstein GZ. (1994). Upregulation of intracellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) on brain microvascular endothelial cells in rat ischemic cortex. *Mol Brain Res.* **26**: 61-8.
- Wang XK., Yue TL., Barone FC., Feuerstein GZ. (1995). Demonstration of increased endothelial-leukocyte adhesion molecule 1 mRNA expression in rat ischemic cortex. *Stroke.* **26**: 1665-9.
- Waniewski RA., Martin DL. (1984). Characterization of L-glutamic acid transport by glioma cells in culture: evidence for sodium-independent, chloride-dependent high affinity influx. *J Neurosci.* **4** (9): 2237-2246.
- Warner TD., Giuliano F., Vojnovic I., Bukasa A., Mitchell JA., Vane JR. (1999). Nonsteroid drug selectivities for cyclooxygenase-1 rather than cyclooxygenase-2 are associated with human gastrointestinal toxicity: a full *in vitro* analysis. *Proc Natl Acad Sci. USA.* **96**: 7563-7568.
- Weiss JH, Sensi SL, Koh JY. (2000). Zn²⁺: a novel ionic mediator of neural injury in brain disease. *Trends Pharmacol Sci.* **21** (10): 395-401.
- Welsh FA., Moyer DJ., Harris VA. (1992). Regional expression of heat shock protein 70 mRNA and c-fos mRNA following focal ischemia in rat brain. *J Cereb Blood Flow Metab.* **12**: 204-212.
- Westerink BHC., Damsma G., de Vries JB. (1989). Effect of ouabain applied by intrasrtial microdialysis on teh *in vivo* release of dopamine, acetylcholine, and amino acids in the brain of conscious rats. *Journal of Neurochemistry.* **52** (3): 705-712.
- Whitehouse MW, Haslam JM. (1962). Ability of some antirheumatic drugs to uncouple oxidative phosphorylation. *Nature.* **196**: 1323-1324.
- Willis CL., Humprey JM., Koch HP., Hart JA., Blakely T., Ralston L., Baker CA., Shim S., Kadri M., Chamberlin AR., Bridges RJ. (1996). L-trans-2,3-pyrrolidine dicarboxylate: characterization of a novel excitotoxin. *Neuropharmacology.* **35** (5): 531-539.
- Willoughby DA., Moore AR., Colville-Nash PR. (2000). Cyclopentenone prostaglandins-new allies in the war on inflammation. *Nature Medicine.* **6** (2): 137-138.

- Yang D., Oyaizu Y., Oyaizu H., Olsen GJ., Woese CR. (1985). Mitochondrial origins. *Proc Natl Acad Sci. USA.* **82** (13): 4443-4447.
- Yin MJ., Yamamoto Y., Gaynor RB. (1998). The anti-inflammatory agents aspirin and salicylate inhibit the activity of I κ B kinase- β . *Nature.* **396**: 77-80.
- Zaczek R., Arlis S., Markl A., Murphy T., Drucker H., Coyle JT. (1987). Characteristics of chloride-dependent incorporation of glutamate into brain membranes argue against a receptor binding site. *Neuropharmacology.* **26** (4): 281-287.
- Zerangue N., Kavanaugh MP. (1996). Flux coupling in a neuronal glutamate transporter. *Nature.* **383** (6601): 634-637.
- Zhang J., Benveniste H., Piantadosi CA. (1993). Inhibition of nitric oxide synthase increases extracellular cerebral glutamate concentration after global ischemia. *Neuroscience letters.* **157**: 179-182.
- Zhang L., Yu L., Yu CA. (1998). Generation of superoxide anion by succinate-cytochrome c reductase from bovine heart mitochondria. *J Biol Chem.* **273** (51): 33972-33976.