

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA



FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

TESIS DOCTORAL

Efecto neuroprotector de hidroxitirosol en un modelo experimental de diabetes

Doctoranda: Lidia Romero Gómez

Directores:

Dr. José Antonio González Correa

Dr. José Pedro De la Cruz Cortés

Dr. José Julio Reyes de la Vega

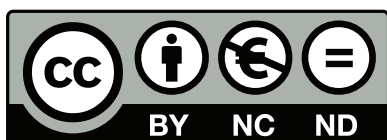
MÁLAGA 2014



**Publicaciones y
Divulgación Científica**

AUTOR: Lidia Romero Gómez

EDITA: Publicaciones y Divulgación Científica. Universidad de Málaga



Esta obra está sujeta a una licencia Creative Commons:

Reconocimiento - No comercial - SinObraDerivada (cc-by-nc-nd):

[Http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/es](http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/es)

Cualquier parte de esta obra se puede reproducir sin autorización
pero con el reconocimiento y atribución de los autores.

No se puede hacer uso comercial de la obra y no se puede alterar, transformar o hacer
obras derivadas.

Esta Tesis Doctoral está depositada en el Repositorio Institucional de la Universidad de
Málaga (RIUMA): riuma.uma.es



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Facultad de Medicina
Departamento de Farmacología y Pediatría

D. JOSE ANTONIO GONZALEZ CORREA, Doctor en Medicina y Cirugía,
D. JOSE PEDRO DE LA CRUZ CORTES, Doctor en Medicina y Cirugía y
D. JOSÉ JULIO REYES DE LA VEGA, Doctor por la Universidad de Málaga,
adscritos al Área de Farmacología del Departamento de Farmacología y
Pediatría de la Universidad de Málaga,

CERTIFICAN:

Que D^a. LIDIA ROMERO GÓMEZ ha obtenido y estudiado personalmente bajo nuestra dirección el material necesario para la realización de su Tesis Doctoral titulada **Efecto neuroprotector de hidroxitirosol en un modelo experimental de diabetes**, la cual ha finalizado con todo aprovechamiento, habiendo los que la suscriben revisado su Tesis y estando conformes para ser juzgada.

Y para que conste, en cumplimiento de las disposiciones vigentes, expedimos el presente certificado en Málaga a cuatro de junio de dos mil catorce.

J.A. González Correa

J.P. de la Cruz Cortés

J.J. Reyes

Llegó el momento menos científico, dónde se muestran los sentimientos y las sensaciones vividas durante este trayecto. Un trayecto compartido con muchas personas a las que quiero agradecerles el apoyo mostrado. Culmina una etapa académica en la que ha sido mucho el tiempo dedicado al estudio y al aprendizaje, una meta que se antojaba imposible, pero que he logrado alcanzar debido a la constancia y al esfuerzo.

En primer lugar, quisiera hacer una mención especial para mis directores, los profesores D. José Antonio González Correa, D. José Pedro de la Cruz Cortés y D. José Julio Reyes de la Vega:

A José Antonio quiero agradecerle su incondicional ayuda y tiempo prestado desde aquel día en que revisamos ese examen y me abrió las puertas al grupo de investigación LIAIT, ya que fue él quien despertó todo mi interés por el mundo de la investigación.

A José Pedro quiero darle las gracias por acogerme en el equipo de trabajo y confiar en mí, por estar siempre disponible, así como por sus consejos y su disciplina. Gracias por darme esta oportunidad.

A José Julio me gustaría agradecerle su gran interés y dedicación en la consecución de este trabajo, por su afecto, motivación y sus ánimos.

En segundo lugar, como no, quiero agradecer a mis compañeros del laboratorio de Farmacología que me acogiesen con los brazos abiertos y me enseñaran cómo un grupo de trabajo tan heterogéneo se complementaba tan bien. Gracias por todas las explicaciones y por todo vuestro tiempo:

A la doctora Ana Guerrero Loriguillo quiero agradecerle su empatía, dedicación, cariño y apoyo.

Al doctor Juan Antonio López Villodres, por su profesionalidad y su disposición, además de por sus conocimientos y consejos transmitidos.

Al doctor Javier Muñoz Marín, reconocerle su disposición, apoyo y simpatía.

A D. Juan Antonio Pino Blanes, quiero agradecerle su cercanía, su disponibilidad y sus bromas.

También quiero agradecer el apoyo y la ayuda que me han prestado el resto de mis compañeros; Miriam, Maribel, María, Elena, Antonio, Laura, Paula y Beatriz, que ha sido imprescindible para la consecución de este trabajo. Y en especial a Rocío Guzmán, por su apoyo, su alegría y su amistad incondicional.

En tercer lugar, a todas mis compañeras de trabajo; por su interés y apoyo, pero sobre todo por aguantarme en los días de agobio. Del mismo modo, no puedo olvidarme de mis pacientes, con los que he acabado teniendo una relación más que estrecha ya que se preocupan ellos por mí del mismo modo que yo por ellos.

Finalmente, a TODA mi familia, porque somos un bloque que a pesar de las diferencias nos aceptamos y queremos, siempre compartiendo todos los momentos posibles. Aquí quiero hacer una mención especial a mis padres, a los que quiero agradecer su incondicional cariño y apoyo. A vosotros os debo haber llegado hasta aquí, porque mis logros son fruto de vuestro esfuerzo y dedicación. A mi abuelo José por sus mimos. A mi hermano José Manuel por nuestro amor-odio. Con momentos como este me gustaría compensaros por todo vuestro apoyo y amor.

Y concluyo con mi pareja, Antonio, al que quiero agradecerle que esté siempre ahí, queriéndome, escuchándome y cuidándome; por su continuo apoyo y motivación para que realice todas mis inquietudes y proyectos y por hacerme reír en los peores momentos. A su familia también quiero agradecerle todo su cariño y apoyo.

Muchas gracias a todos.

A mis padres



*La ciencia del hombre es grande,
pero su ignorancia es inmensa.*

Fernando Pessoa

ÍNDICE

Índice	Pág.
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. DIABETES MELLITUS.....	1
1.1.1. DEFINICIÓN.....	1
1.1.2. COMPLICACIONES CRÓNICAS.....	2
1.1.2.1. MACROANGIOPATÍA.....	2
1.1.2.2. MICROANGIOPATÍA.....	2
1.1.3. EPIDEMIOLOGÍA.....	2
1.2. FISIOPATOLOGÍA DE LAS COMPLICACIONES DE LA DIABETES MELLITUS.....	3
1.2.1. LA VÍA DE LOS POLIOLES.....	4
1.2.2. VÍA DE LA HEXOSAMINA.....	6
1.2.3. VÍA DEL DIACILGLICEROL-PROTEINCINASA C.....	7
1.2.4. FORMACIÓN DE PRODUCTOS FINALES DE LA GLICACIÓN.....	9
1.2.5. ESTRÉS OXIDATIVO.....	10
1.3. ENFERMEDAD CEREBROVASCULAR.....	12
1.3.1. EPIDEMIOLOGÍA.....	12
1.3.2. DEFINICIÓN.....	12
1.3.3. FACTORES DE RIESGO.....	14
1.3.4. ASPECTOS FISIOPATOLÓGICOS DE LA ENFERMEDAD CEREBROVASCULAR.....	16

1.3.4.1. TROMBOGÉNESIS.....	16
1.3.4.2. FISIOPATOLOGÍA DEL DAÑO TISULAR POR LA ISQUEMIA-REPERFUSIÓN.....	17
1.3.5. BIOQUÍMICA DE LA ISQUEMIA CEREBRAL.....	20
1.3.5.1. ALTERACIONES PRIMARIAS DE LA ISQUEMIA.....	22
1.3.5.2. MECANISMOS DE DAÑO CELULAR EN LA REPERFUSIÓN.....	23
1.3.5.3. CONSECUENCIAS A NIVEL CELULAR DE LA ISQUEMIA-REPERFUSIÓN.....	24
1.3.6. MEDIADORES FUNDAMENTALES DEL DAÑO CELULAR EN LA ISQUEMIA-REPERFUSIÓN.....	26
1.3.6.1. FALTA DE APORTE SANGUÍNEO.....	26
1.3.6.2. ACIDOSIS INTRACELULAR.....	27
1.3.6.3. ACÚMULO INTRACELULAR DE CALCIO.....	28
1.3.6.4. ACÚMULO DE EICOSANOIDES.....	30
1.3.6.5. MEDIADORES INFLAMATORIOS.....	31
1.3.6.6. ÓXIDO NÍTRICO.....	32
1.3.6.7. FACTOR INDUCIDO POR HIPOXIA (HIF).....	33
1.3.6.8. NADPH OXIDASA.....	35
1.3.6.9. ESTRÉS OXIDATIVO Y NITROSATIVO.....	36
1.3.6.9.1. ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO Y ESPECIES REACTIVAS DE NITRÓGENO (ROS Y RNS).....	36
1.3.6.9.2. SISTEMAS DE DEFENSA DEL DAÑO OXIDATIVO.....	38
1.3.6.9.3. DAÑOS PROVOCADOS POR	41

RADICALES LIBRES.....	
1.3.6.9.4. PEROXIDACIÓN LIPÍDICA.....	42
1.3.7. DAÑOS BIOQUÍMICOS: ESTÍMULO DE LA INFLAMACIÓN..	44
1.3.7.1. EICOSANOIDES.....	46
1.3.7.2. CITOCINAS.....	49
1.4. PLANTEAMIENTO TERAPÉUTICO EN LA ENFERMEDAD CEREBROVASCULAR.....	52
1.4.1. PREVENCIÓN.....	52
1.4.1.1. PREVENCIÓN PRIMARIA DEL ICTUS ISQUÉMICO....	52
1.4.1.2. PREVENCIÓN SECUNDARIA DEL ICTUS ISQUÉMICO.....	53
1.4.2. TRATAMIENTO.....	53
1.4.2.1. TRATAMIENTO DEL ICTUS ISQUÉMICO EN FASE AGUDA.....	53
1.5. DIETA MEDITERRÁNEA: ACEITE DE OLIVA.....	57
1.5.1. ÁCIDO OLEÍCO.....	57
1.5.2. ESCUALENO.....	58
1.5.3. COMPONENTES FENÓLICOS.....	58
1.5.3.1. HIDROXITIRO SOL.....	59
2. OBJETIVOS.....	63
3. MATERIAL Y MÉTODOS.....	67
3.1. TIPO DE ESTUDIO.....	67
3.1.1. EXPERIMENTOS <i>EX VIVO</i> EN ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN.....	67
3.2. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN.....	67

3.3. GRUPOS DE ANIMALES.....	68
3.4. TEJIDO DE ESTUDIO.....	68
3.5. COMPUESTO DE ESTUDIO.....	69
3.6. MÉTODO DE INDUCCIÓN Y MANTENIMIENTO DE LA DIABETES EXPERIMENTAL.....	69
3.6.1. PREPARACIÓN DE LA ESTREPTOZOTOCINA	69
3.6.2. INDUCCIÓN DE LA DIABETES EXPERIMENTAL.....	69
3.6.3. MEDICIÓN Y CONTROL DE LAS CIFRAS DE GLUCEMIA.....	70
3.7. TIPOS DE EXPERIMENTO.....	71
3.8. VARIABLES ANALÍTICAS.....	73
3.9. DESCRIPCIÓN DE LAS TÉCNICAS ANALÍTICAS.....	74
3.9.1. MUERTE CELULAR: ACTIVIDAD LACTATO DESHIDROGENASA (LDH).....	74
3.9.2. DETERMINACIONES DE MEDIADORES INFLAMATORIOS CEREBRALES.....	75
3.9.2.1. EXTRACCIÓN Y DETERMINACIÓN DE PROSTAGLANDINAS E ₂	75
3.9.2.2. EXTRACCIÓN Y DETERMINACIÓN DE INTERLEUCINA 1 β	76
3.9.3. ESTATUS OXIDATIVO.....	76
3.9.3.1. DETERMINACIÓN DE LA PEROXIDACIÓN LIPÍDICA.....	76
3.9.3.2. DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE GLUTATIÓN.....	81
3.9.4. ESTRÉS NITROSATIVO.....	83
3.9.4.1. DETERMINACIÓN DE NITRITOS Y NITRATOS.....	83

3.9.4.1. DETERMINACIÓN DE LA NITRACIÓN DE PROTEÍNAS.....	83
3.10. MÉTODO ESTADÍSTICO.....	83
4. RESULTADOS.....	85
4.1 VARIABLES ZOOMÉTRICAS.....	85
4.2. VARIABLES DETERMINADAS EN EL MODELO DE HIPOXIA- REOXIGENACIÓN CEREBRAL.....	88
4.3. VALORACIÓN DEL EFECTO NEUROPROTECTOR DE LA ADMINISTRACIÓN DE HIDROXITIRO SOL EN RATAS DIABÉTICAS.....	91
4.4. VALORACIÓN DE LA ADMINISTRACIÓN DE HIDROXITIRO SOL EN RATAS DIABÉTICAS SOBRE VÍAS BIOQUÍMICAS RELACIONADAS CON EL DAÑO CEREBRAL EN EL MODELO DE HIPOXIA- REOXIGENACIÓN.....	93
4.4.1. VÍA DEL ESTRÉS OXIDATIVO.....	93
4.4.2 VÍA DEL ÓXIDO NÍTRICO.....	96
4.4.3 MEDIADORES INFLAMATORIOS.....	98
5. DISCUSIÓN.....	101
6. CONCLUSIONES.....	111
7. PROSPECTIVA.....	113
8. BIBLIOGRAFÍA.....	115

1. INTRODUCCIÓN

1.1. DIABETES MELLITUS

1.1.1. DEFINICIÓN

La diabetes mellitus (DM) es un grupo de enfermedades metabólicas caracterizadas por hiperglucemia crónica, que se acompaña en diferente medida de alteraciones en el metabolismo de los lípidos y proteínas.

El origen y la etiología pueden ser muy diversos pero conllevan alteraciones en la secreción de insulina, en la sensibilidad a la acción de esta hormona sobre los tejidos, o ambas.

Según la clasificación de la ADA, la diabetes mellitus puede ser:

- DM tipo 1: Se produce la destrucción de las células β pancreáticas, por lo que se deja de secretar la insulina necesaria para el metabolismo. Es más frecuente en niños y adolescentes. Puede aparecer de forma idiopática o como resultado de una lesión autoinmune.
- DM tipo 2: Se produce por la aparición de resistencia de los órganos diana a la insulina secretada por el páncreas. Es la más común y frecuente en adultos. La mayoría de estos pacientes suelen ser obesos, lo que causa o agrava la resistencia a la insulina.
- Otros tipos específicos de diabetes asociados a defectos genéticos de la célula β , defectos genéticos en la acción de la insulina, enfermedades asociadas a procesos que afectan al páncreas exocrino, endocrinopatías, fármacos o sustancias químicas, infecciones, formas infrecuentes de diabetes autoinmunes y a otros síndromes que a veces se asocian a la enfermedad.
- DM gestacional: Intolerancia a la glucosa que aparece en la mujer gestante sin DM previa.

1.1.2. COMPLICACIONES CRÓNICAS

La importancia de la Diabetes Mellitus se debe, en cierta medida, a las complicaciones crónicas que conlleva, a nivel macro y microvasculares. (De la cruz et al, 2004).

1.1.2.1. MACROANGIOPATÍA

La macroangiopatía diabética no difiere de la que padecen personas no diabéticas, aunque aparece antes que en éstas, sobre todo en quienes padecen la Diabetes Mellitus tipo 2. La principal causa de muerte en los pacientes con Diabetes Mellitus tipo 1 es la enfermedad coronaria, debido a que el aumento del estrés oxidativo constituye uno de sus principales factores de riesgo.

Asimismo, los pacientes diabéticos tienen el doble de riesgo de sufrir un accidente cerebral isquémico que los no diabéticos debido a numerosas causas: glicación de proteínas tisulares que aumenta la aterogénesis, aumento de la agregación plaquetaria, del fibrinógeno y del factor VII, y disminución de la actividad fibrinolítica. La prevalencia de la macroangiopatía constituye el doble comparada con la microangiopatía.

1.1.2.2. MICROANGIOPATÍA

La microangiopatía diabética se relaciona con el aumento de glucosa intracelular, por lo que no aparece en tejidos como el adiposo o muscular, que requieren insulina para transportar la glucosa al citoplasma celular sino que penetra en la célula por los transportadores de membrana, produciendo alteraciones como la retinopatía, neuropatía y nefropatía diabéticas.

1.1.3. EPIDEMIOLOGÍA

El aumento de la esperanza de vida y la introducción de hábitos de vida poco saludables, como el sobrepeso, la obesidad y la inactividad física, son factores que están incrementando tanto el número de diabéticos como, a la larga, las complicaciones de esta enfermedad.

La diabetes se ha convertido en una de las mayores causas de enfermedad y muerte prematura en la mayoría de los países, sobre todo en los desarrollados, debido principalmente al incremento del riesgo de enfermedades cardiovasculares (ECV) responsables de entre el 50% y el 80% de las muertes de personas con diabetes.

Según estimaciones de la OMS, en el mundo hay más de 347 millones de personas con diabetes y se prevé que se convierta en la 7ª causa de muerte a nivel mundial.

1.2. FISIOPATOLOGÍA DE LAS COMPLICACIONES DE LA DIABETES MELLITUS

En la etiopatogenia de las complicaciones vasculares de la diabetes mellitus distinguimos tres fases consecutivas, aunque realmente se imbrican en todo momento en el tiempo:

- En primer lugar, la hiperglucemia mantenida produce un “reajuste” bioquímico intracelular importante, observándose una serie de cambios en ciertas vías de control y metabolismo bioquímico celular.
- Una de las células más afectadas por estos cambios bioquímicos es la del endotelio vascular, en la que se alterán prácticamente todas sus funciones, describiéndose lo que se denomina disfunción endotelial, punto clave y condicionante de todo el proceso de vasculopatía diabética.
- Por último, debido a estos cambios (bioquímicos en general y endoteliales en particular) se altera la función y la morfología de los vasos sanguíneos, produciendo las denominadas vasculopatías micro o macroangiopáticas en la diabetes.

La hiperglucemia crónica es el efecto subyacente sobre el que giran todas las alteraciones implicadas en el desarrollo del ACV. Se producen las siguientes alteraciones en el metabolismo celular:

1. Activación de la vía de los polioles.

2. Activación de la vía de la hexosamina.
3. Activación de la vía del diacilglicerol-proteincinasa C.
4. Formación de productos finales de la glicación de proteínas.
5. Estímulo del estrés oxidativo celular.

Normalmente, la glucosa se metaboliza por la vía de las pentosas, pero en la diabetes, por la hiperglucemia sostenida, se sobrepasa la capacidad de dichas vías y la glucosa acumulada se metaboliza por vías alternativas normalmente poco activas (sorbitol y hexoquinasa) y, además, produce glicación no enzimática de proteínas y estimula la vía diacilglicerol-proteincinasa C (DAG-PKC). Los anteriores mecanismos, incrementan la producción de radicales libres por la cadena de transporte electrónica mitocondrial, que ocasionan lesiones oxidativas de las proteínas. Además, los cambios bioquímicos anteriores estimulan la síntesis de factores de crecimiento.

Las vías bioquímicas que se alteran son las siguientes:

1.2.1. LA VÍA DE LOS POLIOLES

En condiciones fisiológicas normales, la glucosa se metaboliza a glucosa-6-fosfato por la hexoquinasa y después es dirigida hacia la vía de la glicolisis o de las pentosas. En la diabetes, cuando la concentración de glucosa aumenta, la hexoquinasa se satura y la glucosa en exceso es metabolizada por la vía de los polioles. Esta vía hace intervenir dos enzimas sucesivamente: la aldosa reductasa y el sorbitol deshidrogenasa. La aldosa reductasa, que solo se activa con altas concentraciones de glucosa por su débil afinidad por esta, reduce la glucosa a sorbitol (Figura 1.1). El donante del hidrógeno es la nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido (NADPH) que se oxida a NADP^+ . Esta enzima, está regulada por la hiperosmolaridad (Smardo y cols., 1992), y su expresión está aumentada en la diabetes (Ghahary y cols., 1989; Shimizu y cols., 2000). La segunda enzima de la vía de los polioles, sorbitol deshidrogenasa, oxida una pequeña parte del sorbitol en fructosa utilizando el NAD^+ como cofactor (Figura 1.1).

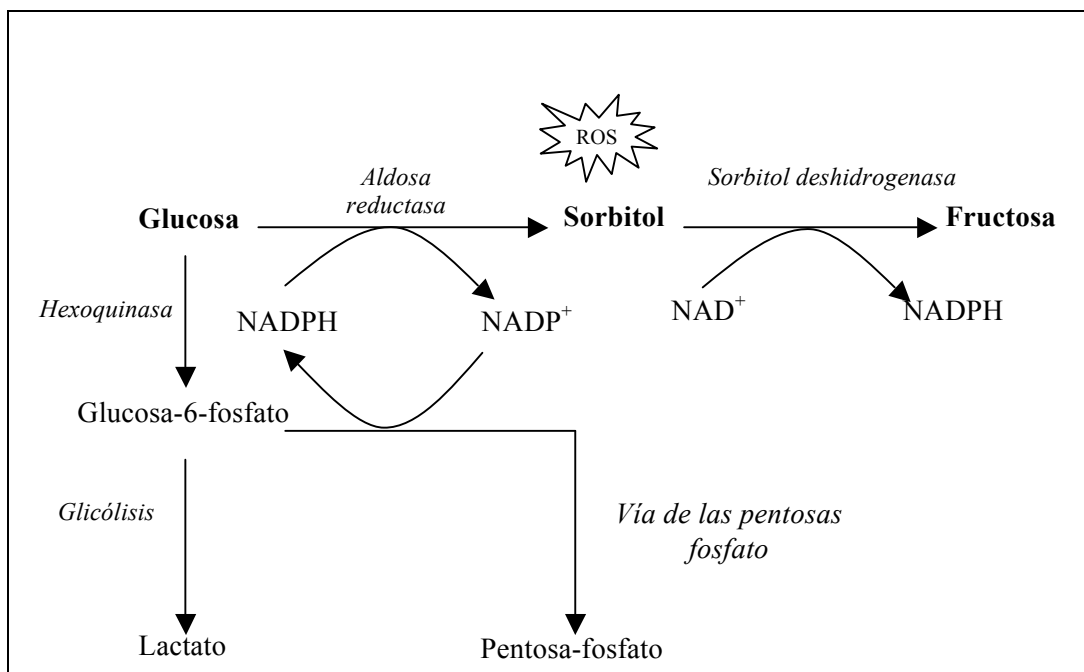


Figura 1.1. Diferentes vías de la metabolización de la glucosa

La metabolización de la glucosa en exceso por la vía de los polioles tiene dos consecuencias principales:

- Un aumento del estrés osmótico intracelular.
- Una alteración del potencial redox de las células.

Como el sorbitol formado atraviesa con dificultad las membranas, este se acumula en la célula. La hiperosmolaridad celular resultante podría ser responsable de la depleción de otros osmolitos orgánicos como el mioinositol o la taurina. La depleción intracelular del mioinositol conlleva una disminución de la síntesis de fosfoinosidos, teniendo consecuencias negativas, un aumento del calcio intracelular (que es inductor de la apoptosis), la activación de la proteínacinas C (PKC) y la actividad alterada de la bomba Na^+/K^+ ATPasa (Tomlinson y cols., 1994). Pero la principal consecuencia de la activación de la vía de los polioles parece ser la modificación del potencial redox de las células. Así, la vía de los polioles consume NADPH y del NAD^+ , en detrimento de otras reacciones que requieren igualmente estos cofactores (Figura 1.2). En particular, la glutatión reductasa, enzima fundamental para la regeneración del glutatión reducido, utiliza niveles elevados de NADPH. La disminución de reservas del NADPH para el

ciclo redox del glutatión podría aumentar el estrés oxidante. La vía de los polioles compite con otras reacciones que necesitan NADPH, como la síntesis de NO por la NO sintetasa. Como ha sido demostrado la producción de NO es deficiente en los pacientes diabéticos (Calver y cols., 1992).

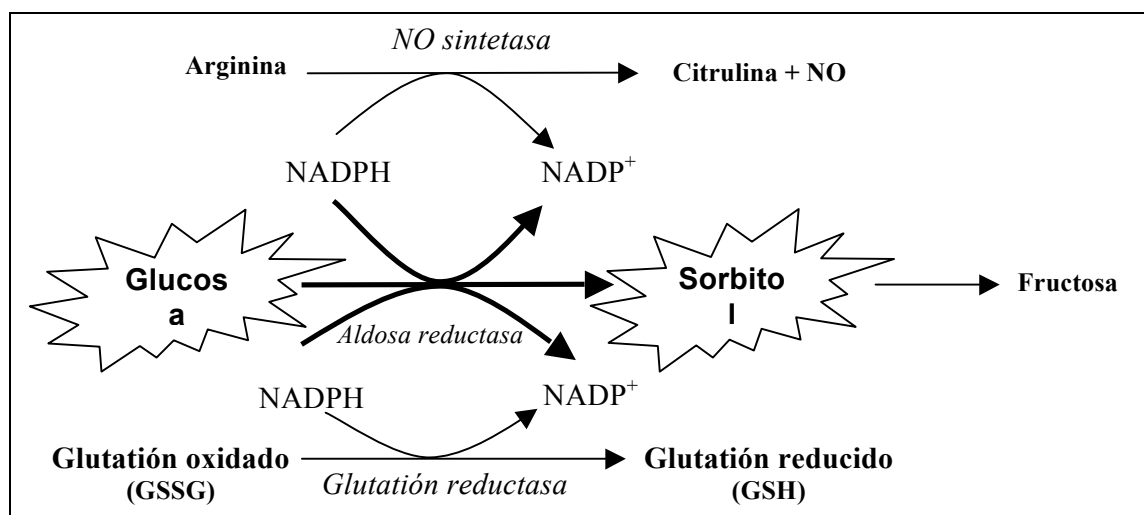


Figura 1.2. Competición de las diversas reacciones por el NADPH.

1.2.2. VÍA DE LA HEXOSAMINA

En individuos sanos solo un 3% de la glucosa es metabolizada por esta vía y los productos finales sirven de síntesis de cadenas glucosílicas laterales de proteínas y lípidos.

La fructosa-6-fosfato, formada a partir de la glucosa puede ser convertida en glucosamina-6-fosfato por la glutamina fructosa-6-fosfato amidotransferasa, antes de ser transformada en UDP-N-acetilglucosamina (Figura 1.3). Se ha demostrado que esta enzima está presente en numerosos tejidos y células y que la hiperglucemia conduce al aumento de UDP-N-acetilglucosamina en diferentes células como las células vasculares (Nerlich y cols., 1998; Wu y cols., 2001), que a su vez provoca la glicosilación del factor de transcripción SP1, lo que permite la activación de genes como los del Transforming Growth Factor (TGF α) (Nerlich AG y cols., 1998; Sayeski y cols, 1996).

Este aumento parece tener dos consecuencias principales:

- La modificación de la glicosilación de glucoconjugados.
- La expresión de diferentes genes vía activación de factores de transcripción.

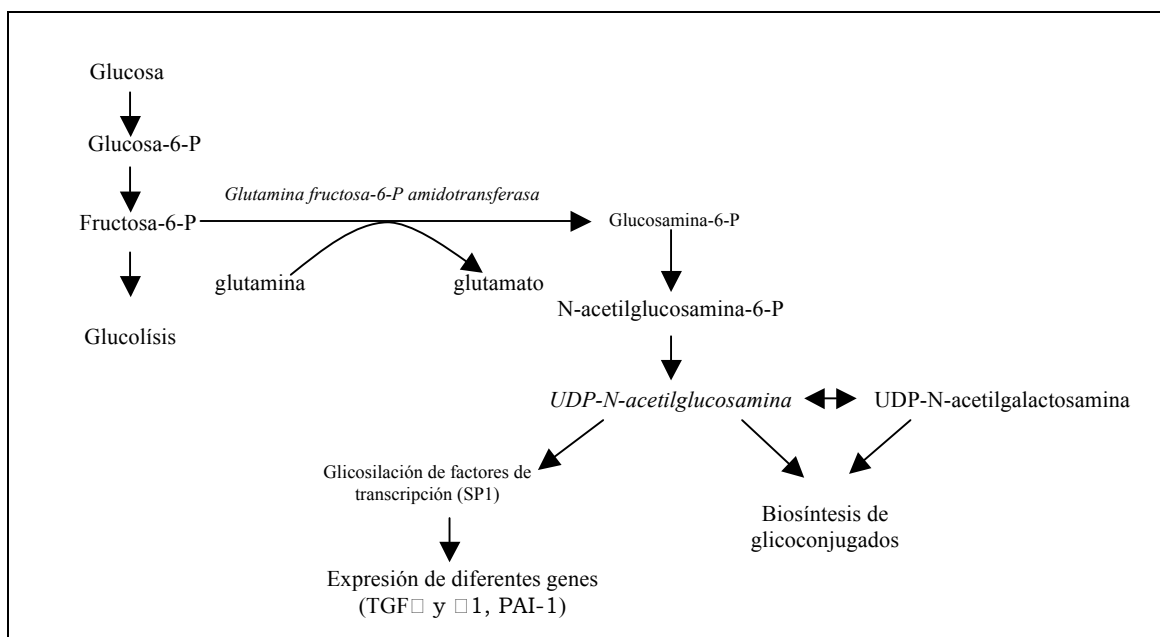


Figura 1.3. Vía de la hexosamina

1.2.3. VÍA DEL DIACILGLICEROL-PROTEINCINASA C

Tras dos fosforilaciones sucesivas en la glucólisis, la cadena de 6 carbonos se rompe en 2 moléculas de 3 carbonos: fosfato de dihidroxiacetona y D-gliceraldehído 3-fosfato, de los que solo éste último puede continuar en las siguientes etapas de la glucólisis. El fosfato de dihidroxiacetona puede convertirse, de modo rápido y reversible, en D-gliceraldehído 3-fosfato por medio de la enzima isomerasa de los fosfatos de triosa. Niveles altos de glucosa estimulan la síntesis *de novo* de diacilglicerol (DAG), potente estimulador de la proteincinasa C (PKC) (King and Brownlee, 1996) (Figura 1.4).

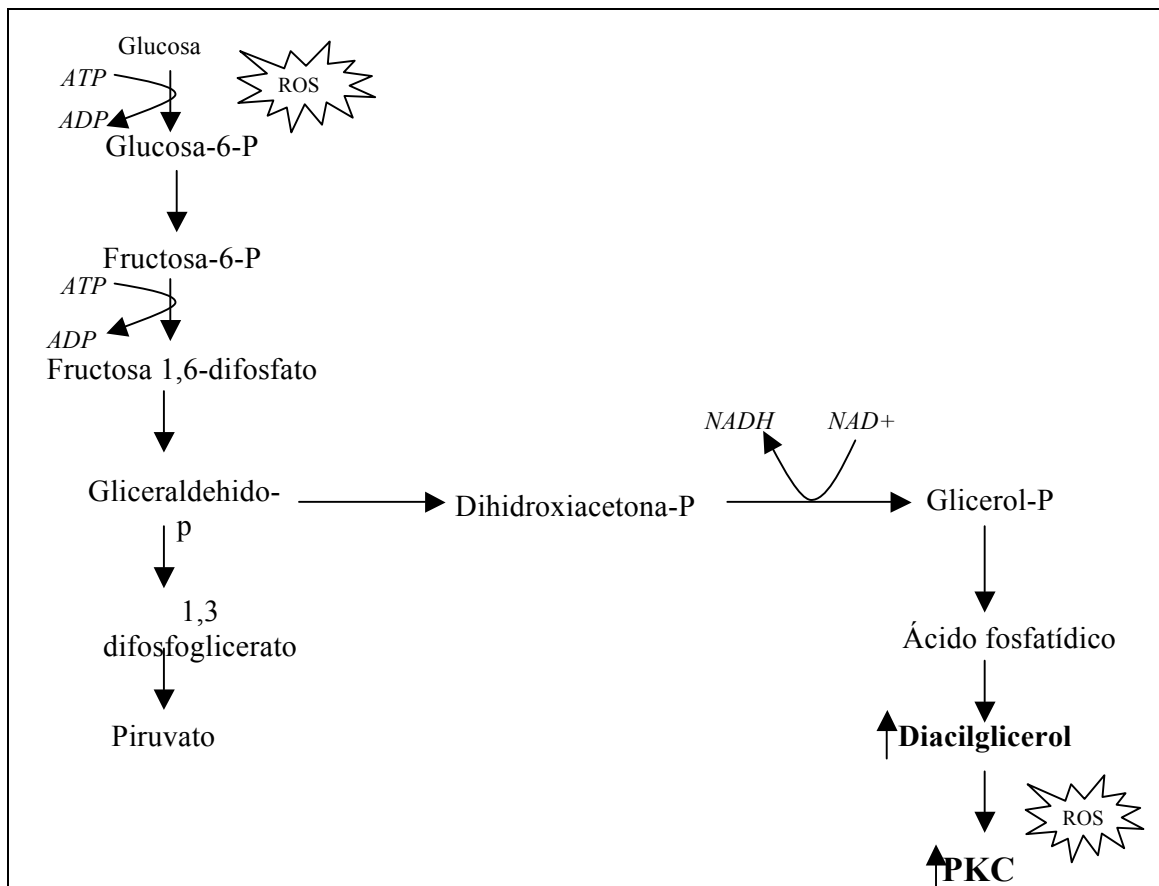


Figura 1.4. Vía del diacilglicerol-proteincinasa C

El incremento en la síntesis del DAG y la prolongada activación de la PKC pueden favorecer la liberación de factores de crecimiento celular, como el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) (De La Cruz y cols., 2004).

La PKC también se encuentra incrementada en la diabetes a través de otras vías, como la activación del inositol trifosfato (IP3) o del desequilibrio NADH/NAD⁺ (Williamson y cols., 1993).

La familia de la proteincinasa C comprende 15 isoformas, 9 de las cuales son activadas por el diacilglicerol. La actividad de la PKC-β aumenta con la isquemia y tras la exposición del endotelio vascular al estrés oxidativo (Taher y cols., 1993). También se ha descrito una activación de la fosfolipasa A₂ citosólica lo que conlleva la liberación de ácido araquidónico, la formación de prostaglandina E₂ y la inhibición de bombas Na⁺/K⁺ ATPasas (Xia y cols., 1995). El estrés oxidativo puede no solo ser causa de activación de la PKC sino también consecuencia: se ha observado un mecanismo de

producción de radicales libres mediante la activación de PCK dependiente de la NADPH oxidasa (Inoguchi y cols., 2000).

1.2.4. FORMACIÓN DE PRODUCTOS FINALES DE LA GLICACIÓN

Los productos finales de la glicación (AGEs) son el resultado de un conjunto de reacciones agrupadas bajo el término de glicosilación no enzimática. Un glúcido reductor como la glucosa puede reaccionar con los grupos aminos de las proteínas y formarse una base de Schiff, estabilizándose a continuación en producto de Amadori. Esta primera etapa es reversible y depende de la concentración de glucosa y proteínas.

Un producto de Amadori muy conocido es la hemoglobina glicosilada (HbA_{1c}), medida en los pacientes diabéticos como índice del control de la glucemia.

Los AGEs pueden también formarse a partir de:

- La unión de dos productos de Amadori.
- La reacción de un dicarbonilo con un producto de Amadori.

La formación de los AGEs es irreversible y se asocia a la producción de radicales libres. La glicosilación no enzimática tiene efectos en la estructura y función de las moléculas modificadas principalmente de las proteínas, pero también de lípidos y ácidos nucleicos. En la diabetes, las moléculas más afectadas son las directamente expuestas a la glucosa sanguínea o de larga vida media como proteínas y células circulantes, y las proteínas de la matriz extracelular. Por otro lado, los AGEs pueden formarse en el interior de las células. También son capaces de unirse a receptores de membrana e inducir diferentes respuestas celulares (Stitt, 2003).

1.2.5. ESTRÉS OXIDATIVO

Todas las vías anteriores producen especies reactivas del oxígeno (ERO) en la cadena mitocondrial de transporte electrónico (peróxido y superóxido) que provocan lesiones oxidativas vasculares. Se forman por autooxidación de la glucosa y por cualquiera de las vías bioquímicas mayores descritas antes.

Se considera que una célula sufre de estrés oxidativo cuando se supera el límite máximo de formación de especies reactivas de oxígeno. Esto puede ocurrir cuando se forman muchos radicales libres, cuando disminuyen las defensas antioxidantes endógenas (fundamentalmente el glutatión) o, lo más frecuente, ambas cosas a la vez. Un exceso de glucosa origina una autooxidación de la misma, formando aniones hidroxílicos. En la diabetes se ha observado a la vez una disminución de las defensas antioxidantes endógenas y un aumento de la producción de radicales libres causando un aumento de los marcadores del estrés oxidativo como los marcadores de la peroxidación lipídica. Asimismo, las arterias de los animales diabéticos son más sensibles a los radicales libres que la de los animales normales. Un exceso de producción de radicales libres puede dañar a cualquier estructura celular, ya sean las membranas (peroxidación lipídica), proteínas (polimerización anómala) o el núcleo celular (daño en la estructura del ADN). Asimismo, estos radicales libres pueden reaccionar con el óxido nítrico y formar peroxinitritos, que son más lesivos aún que el propio anión hidroxilo. También se ha demostrado que el acumulo de radicales libres descrito en la diabetes, puede originar glicación no enzimática de las proteínas y acumulo de sorbitol en las células endoteliales.

La hiperglucemia puede inducir una producción incrementada de radicales libres por varios mecanismos:

1. La glucosa puede ser auto-oxidada mediante una reacción catalizada por metales de transición (durante la cual se producen aniones superóxido (O_2^-)) (Wolff and Dean, 1987). Estos son precursores del peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y del radical hidroxilo (OH), muy reactivo, que puede dañar proteínas, lípidos o ácidos nucleicos. La auto-oxidación de la glucosa parece ser la principal fuente de radicales libres (Maritim y cols., 2003).

2. La hiperglucemia induce también un aumento de la relación NADH/NAD^+ principalmente por la activación de la vía de los polioles. Así pues el NADH es cofactor o sustrato de diferentes enzimas catalizadoras de reacciones que generan radicales libres. Es el caso, por ejemplo, de la prostaglandina hidroxiperoxidasa y de la NADH oxidasa (Ellis y cols., 1998; Kukreja y cols., 1986).

3. También se pueden liberar radicales libres como resultado de la glicación no enzimática de proteínas, lípidos o ADN o como resultado de la unión de AGEs a su receptor.

Se ha descrito una disminución de la capacidad antioxidante plasmática total (antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos) en los pacientes con diabetes tipo 2 (Ceriello y cols., 1997), aunque menos acentuada en los pacientes tipo 1 (Seghrouchni y cols., 2002). Asimismo, otro estudio ha demostrado la disminución de la superóxido dismutasa cobre/zinc dependiente (SOD Cu/Zn) en los individuos diabéticos no insulino-dependientes, así como una reducción de las tasas de vitaminas E y C (Rema y cols., 1995). La disminución de la actividad de las enzimas antioxidantes podría explicarse por la glicación como la descrita para la glutatión peroxidasa y la superóxido dismutasa eritrocitarias (Arai y cols., 1987; Baldwin y cols., 1995), la catalasa (Yan and Harding, 1997) y la glutatión reductasa (Blakytyn and Harding, 1992). Por el contrario, varios trabajos muestran un aumento de las enzimas antioxidantes como la catalasa o la glutatión peroxidasa en los pacientes diabéticos (Al-Abrash y cols., 2000; Rema y cols., 1995), en ratas diabéticas (Sechi y cols., 1997) o en células endoteliales incubadas en presencia de altas concentraciones de glucosa (Ceriello y cols., 1996). Estos resultados sugieren un mecanismo compensatorio de los tejidos frente a una producción elevada de radicales libres.

La producción de radicales libres en los sistemas biológicos es difícilmente medible. El aumento del estrés oxidativo en la diabetes ha sido demostrado principalmente por un aumento de los daños causados por los radicales libres sobre proteínas y lípidos. El principal marcador del aumento de radicales libres es el aumento de la peroxidación lipídica. Varios estudios han evidenciado el aumento de productos de la peroxidación lipídica en la diabetes como los TBARS (thiobarbituric acid reactive substances) o los isoprostanos (Aydin y cols., 2001; Gopaul y cols., 1995). El aumento

de productos de peroxidación se ha correlacionado con la presencia de microangiopatías (Jennings y cols., 1987).

1.3. ENFERMEDAD CEREBROVASCULAR

1.3.1. EPIDEMIOLOGÍA

La enfermedad cerebrovascular o ACV constituye la segunda causa de muerte a nivel nacional y mundial, así como una de las principales causas de demencia e incapacidad. Es uno de los motivos más frecuentes de asistencia urgente y es considerada un grave problema de salud pública, por las repercusiones sociales y económicas que conlleva (Alvarez Sabin y cols., 2006).

1.3.2. DEFINICIÓN

El accidente cerebrovascular (ACV) o ictus es un trastorno neurológico originado por la interrupción brusca del aporte sanguíneo cerebral, hasta unos niveles insuficientes para mantener el metabolismo y funcionamiento normal de las células cerebrales.

La Organización Mundial de la Salud (O.M.S.) define la enfermedad cerebrovascular o ACV como 'el desarrollo rápido de signos clínicos de disturbios de la función cerebral o global, con síntomas que persisten 24 horas o más, o que llevan a la muerte con ninguna otra causa evidente que el origen vascular. Esta definición incluye la hemorragia subaracnoidea y excluye los accidentes isquémicos transitorios, los hematomas subdurales y los infartos isquémicos de otra etiología como embolias sépticas o neoplásicas.

Según la clasificación del NINDS, la Enfermedad Cerebrovascular, por su naturaleza, se presenta de dos formas (Diez-Tejedor y cols., 2001):

- ACV isquémico: constituye el 85% de los ACVs, debido a la oclusión vascular por una trombosis o una embolia o por la reducción del flujo sanguíneo sistémico al parénquima encefálico.

- ACV isquémico transitorio: déficit neurológico que se recupera antes de las primeras 24 horas.
- ACV isquémico de lesión definitiva del parénquima cerebral siendo la principal causa la hipertensión.
- ACV hemorrágico: rotura de un vaso sanguíneo encefálico con extravasación de sangre fuera del lecho vascular.

La causa última del ACV es la falta de irrigación sanguínea hasta niveles insuficientes para el mantenimiento de la función normal de las células produciéndose una alteración de la función cerebral y por tanto, las manifestaciones clínicas de la enfermedad. Esta disminución del flujo sanguíneo cerebral es resultado de una alteración del equilibrio hemodinámico, ocasionando una serie de alteraciones metabólicas en las neuronas, que finalizan en procesos de apoptosis y necrosis celular.

Dependiendo del grado de afectación del tejido cerebral y en función del tiempo transcurrido desde el inicio del evento, se distinguen diferentes zonas. La zona de tejido isquémico pero no infartado se conoce como zona de penumbra isquémica, que con tratamientos recanalizadores y cuidados adecuados es potencialmente salvable. Es muy importante conocer el mecanismo causante del evento para instaurar el tratamiento adecuado y aplicar una prevención secundaria eficaz.

Dada la multitud de mecanismos y vías implicadas en el accidente cerebrovascular, se ha investigado muchos compuestos que actúen en determinados momentos del evento cerebrovascular. El planteamiento terapéutico por tanto se centra en la prevención, intentando evitar o modificar los factores de riesgo implicados, y recientemente en la citoprotección, interviniendo en la cascada isquémica y protegiendo a las células vulnerables, con el fin de reducir las consecuencias y el grado de incapacidad.

1.3.3. FACTORES DE RIESGO

Los factores que predisponen un mayor riesgo de padecer un accidente cerebrovascular o AVC se clasifican en modificables y no modificables.

Factores de riesgo no modificables:

- Edad: de entre los factores de riesgo no modificables es el que presenta mayor importancia ya que la incidencia de esta enfermedad se duplica cada década a partir de los cincuenta y cinco años de edad.
- Sexo: existe una mayor incidencia en hombres que en mujeres. La predisposición genética es menos importante aunque también hay que tenerla en consideración.
- Raza: existe una mayor incidencia de enfermedad oclusiva extracraneal en raza blanca y de lesiones en la carótida supraclinoidea y en la arteria cerebral media en la raza negra.

Factores de riesgo modificables:

- Hipertensión arterial y enfermedad cardíaca: de entre los factores modificables éste es el más importante y prevalente. La muerte cardiovascular es la causa de deceso en los supervivientes de un accidente cerebro vascular, lo cual enfatiza la necesidad de realizar una evaluación cardíaca sistemática en todos los pacientes con patología cerebrovascular con y sin sintomatología cardiopática.
- Diabetes mellitus: se trata de un factor independiente de riesgo para la isquemia cerebral, en el que nos hemos centrado por la disfunción endotelial y el aumento del estrés oxidativo que conlleva.
- Tabaquismo: el cese del hábito tabáquico reduce el riesgo cerebrovascular al alcanzar a los cinco años del cese el valor de riesgo de ACV de no fumadores.
- Dislipemias: aumenta el riesgo de enfermedad carotídea-ateromatosa.
- Alcohol: su consumo con moderación (unos 45g/día) tiene un efecto protector sobre la circulación cardíaca y cerebral. El consumo en exceso presenta un efecto inverso por hemoconcentración, aumento de la viscosidad sanguínea, arritmias cardíacas en intoxicaciones agudas, trombocitosis en abstinencia y anomalía en la función plaquetaria.

- Aumento de la viscosidad sanguínea: el flujo sanguíneo es inversamente proporcional a la viscosidad.
- Evento isquémico transitorio o ACV previo.
- Estenosis carotídea: en el caso de la estenosis asintomática el riesgo anual es del 1,1% y del 2,3% cuando la estenosis es severa (mayor del 70% de obstrucción de la luz arterial). Este riesgo se incrementa 8 veces cuando la estenosis carotídea es severa y sintomática, con presencia de un riesgo del 16,2% por año durante los dos años posteriores al evento vascular cerebral.
- Soplo carotídeo sintomático: es un importante marcador de enfermedad ateromatosa, pero carece en sí mismo de valor. Su prevalencia aumenta con la edad, la hipertensión arterial y la diabetes.
- Sedentarismo: su eventual rol en los ACV ha sido sugerido, pero no probado. La inactividad física mostró tener un correlato positivo con el engrosamiento progresivo de la pared arterial.
- Obesidad: ha sido asociada a la aparición temprana de fenómenos arterioscleróticos en la pared de los vasos extracraneanos y favoreciendo la presencia de hipertensión arterial e intolerancia a la glucosa.
- Hormonoterapia: la administración exógena de hormonas ha sido reconocida como un factor de riesgo adicional para la enfermedad cerebrovascular y cardíaca. Si bien el uso de anticonceptivos orales y anabólicos se identifica con una población más joven, el riesgo persiste con el uso de terapia hormonal sustitutiva durante la menopausia y el tratamiento estrogénico del cáncer de próstata. Los estrógenos han mostrado poseer un efecto vasoconstrictor sobre el músculo liso vascular y favorecer el desarrollo de un estado protrombótico.

Otros factores de riesgo son la adicción a las drogas, migraña, y placa ulcerada en la aorta.

1.3.4. ASPECTOS FISIOPATOLÓGICOS DE LA ENFERMEDAD CEREBROVASCULAR

La formación de un trombo es el origen más frecuente de la isquemia cerebral. Esta interrupción en la circulación sanguínea provoca un daño tisular, por lo que desde un punto de vista fisiopatológico, debemos tener en cuenta dos hechos fundamentales: la trombogénesis y los mecanismos de daño tisular por la isquemia. Del mismo modo, el tiempo transcurrido hasta que se restablece el flujo sanguíneo juega un papel muy importante en la evolución de la lesión.

1.3.4.1. TROMBOGÉNESIS

El desarrollo de un trombo en la luz de la arteria puede deberse a la interrupción de la continuidad de la superficie endotelial por traumatismo, aterosclerosis o ulceración. Este trombo puede producir una trombosis oclusiva, o fragmentarse desembocando en una embolización trombótica.

La sangre, tras la pérdida de continuidad de la íntima, entra en contacto con el colágeno subendotelial. Se activan las plaquetas circulantes, que experimentan alteraciones morfológicas, forman pseudópodos y se adhieren a la pared vascular. Estas plaquetas activadas liberan diversas sustancias (ADP, tromboxano, serotonina, etc.), que hacen que otras plaquetas adyacentes se les adhieran. El agregado plaquetario se retrae y los factores de coagulación lo consolidan al producir una red de fibrina. También pueden quedar incluidos en el agregado fibrinoplaquetario hematíes, obteniéndose un trombo rojo más elaborado.

El colágeno activa la síntesis de tromboxano A_2 (TXA_2), un potente agregante y vasoconstrictor producido por las plaquetas y de prostaciclina (PGI_2), un potente inhibidor de la agregación y vasodilatador que es sintetizado en el endotelio vascular, ambos productos se originan tras la conversión de ácido araquidónico en endoperóxidos intermediarios por la enzima ciclooxigenasa. El equilibrio entre ellos desempeña un papel clave en el mantenimiento de la hemostasis normal y en la prevención de formación de trombos.

En la formación de un trombo intervienen tres elementos importantes:

- pared vascular
- plaquetas
- factores de la coagulación

El trombo puede aumentar de tamaño y bloquear la luz vascular, o puede fragmentarse y embolizar ramas arteriales distales.

Aunque un vaso esté realmente obstruido, en el desenlace final del proceso isquémico influyen varios factores como son la circulación colateral, la duración de la isquemia, el tamaño y la localización del ictus. Según la capacidad de la circulación colateral, una estenosis notable de una de las arterias extracraneales puede provocar isquemia en el territorio vascularizado por ella o carecer de consecuencias. A su vez, en función de la duración del episodio isquémico cabe observar un verdadero infarto o no apreciar lesión hística alguna. De forma similar, según el tamaño y la localización, un infarto puede carecer de manifestaciones o generar un déficit neurológico permanente.

1.3.4.2. FISIOPATOLOGÍA DEL DAÑO TISULAR POR LA ISQUEMIA

La isquemia cerebral se produce como consecuencia de una disminución del flujo sanguíneo hasta un nivel que condiciona alteraciones en la función del sistema nervioso. Por su falta de sistemas de almacenamiento de sustratos energéticos, el cerebro humano depende absolutamente del aporte continuado de sangre. Bastan 10 segundos de isquemia cerebral global para que un humano pierda la consciencia; después de 20 segundos cesa la actividad eléctrica, y al cabo de unos pocos minutos se manifiestan déficits neurológicos que pueden persistir durante toda la vida del individuo e, incluso, ocasionar la muerte (Torregrosa G. y cols., 2007). Este decremento del flujo sanguíneo es el resultado de la alteración del equilibrio de numerosos factores hemodinámicos y puede conducir a la aparición, en las neuronas y en la glía, de una serie de alteraciones metabólicas y bioquímicas que concluirán con la necrosis celular (Weinberger, 2000).

Entre los factores que pueden condicionar la aparición del infarto cerebral se encuentran:

Introducción

- **Hipoxia.** Una disminución moderada de la presión parcial de oxígeno conlleva un ligero aumento del flujo cerebral, pero cifras inferiores a 40 mmHg originan confusión y por debajo de los 20 mmHg coma. La hipoxia aislada, sin la presencia simultánea de isquemia o acidosis, no es responsable de daño cerebral agudo (Castillo y cols., 1996). La persistencia de la hipoxia durante unos minutos, sobre todo si se asocia a shock o parada cardiorrespiratoria, produce un daño cerebral irreversible, con afectación preferente de la sustancia gris, de las zonas vasculares fronterizas y de los territorios arteriales más distales (Siesjö BK, 1984).
- **Hipoglucemia.** La presencia de hipoglucemia marcada produce alteraciones funcionales y estructurales del sistema nervioso central; concentraciones inferiores a 20 mg/dl de glucemia originan confusión, apareciendo el coma por debajo de los 10 mg/dl. Mientras el cerebro consume los escasos depósitos de glucosa y glucógeno, la situación es reversible, sin secuelas neurológicas. Al cabo de algún tiempo, el cerebro comienza a metabolizar otras sustancias y aparecen lesiones estructurales que consisten en una necrosis neuronal cortical selectiva, con preservación del tejido glial. Esta situación se acompaña de una disminución del consumo de oxígeno por el cerebro.
- **Alteraciones del flujo sanguíneo cerebral.** El flujo sanguíneo cerebral es una variable del gradiente de presión de la perfusión sanguínea y de la resistencia vascular. Esta variable puede afectarse de forma compleja durante el desarrollo de la isquemia cerebral, la cual, a su vez, también dependerá del estado y desarrollo individual de la circulación colateral, así como de la reactividad del tejido cerebral circundante (Jorgensen y cols., 1997).

En situaciones fisiológicas, la regulación del flujo cerebral es independiente de variaciones amplias de presión de perfusión gracias a un mecanismo de autorregulación de circulación cerebral, en el que intervienen factores miogénicos, bioquímicos, neurogénicos y peptidérgicos (Siesjö, 1984). En situaciones de isquemia se produce una alteración en los mecanismos de autorregulación y de regulación funcional del flujo cerebral. El mecanismo de autorregulación desaparece del territorio isquémico y la presión de perfusión se hace dependiente de la tensión arterial sistémica. Esta dependencia se hace más intensa con la disminución que con el aumento de la tensión arterial debido a que en el tejido isquémico, la presión de perfusión está por debajo del límite inferior de la capacidad autorreguladora del lecho vascular, y por esta razón los

vasos están dilatados al máximo; una disminución de la presión arterial no puede, en este caso, compensarse con una mayor reducción de la resistencia vascular (Paulson y cols., 1990).

La regulación funcional del flujo cerebral también está alterada durante el infarto cerebral produciéndose una abolición de la reactividad al anhídrido carbónico en el centro del territorio afectado. En ocasiones, se llega a generar una disminución del flujo al aumentar la concentración de anhídrido carbónico por un fenómeno de “robo intracerebral” originado por la vasodilatación de las arterias normales como respuesta a la hipercapnia, que roba sangre del tejido isquémico donde los vasos ya están dilatados al máximo (Powers y cols., 1992). La hiperventilación origina vasoconstricción en el tejido sano, con disminución de la presión intracraneal; ambos factores conducen a un aumento del flujo sanguíneo en el territorio isquémico, conocido con el nombre de “fenómeno de robo invertido”. El área con abolición del mecanismo de autorregulación en la isquemia cerebral focal es mayor que la zona de arreactividad del anhídrido carbónico; ello origina en la periferia del infarto un desequilibrio entre el control hemodinámico y metabólico responsable de la “circulación de lujo” o perfusión superflua. En la circulación de lujo existe un flujo cerebral aumentado por encima de los requerimientos tisulares de oxígeno, lo que conduce a una extracción de oxígeno reducida y a la aparición de una red de sangre venosa (Iadecola y cols., 1999).

Las alteraciones del flujo cerebral después del infarto persisten en algunos pacientes durante varias semanas e incluso meses; este hecho contribuye al fenómeno de hipoperfusión post-isquémica responsable de la afectación neuronal secundaria a la isquemia global, o a la progresión del infarto (Clavier y cols., 1994).

Aunque la isquemia afecta predominantemente a la sustancia gris, hasta un 20% de los infartos cerebrales tienen lugar en la sustancia blanca, como resultado de la oclusión de las pequeñas arterias penetrantes que irrigan las áreas más profundas de los hemisferios cerebrales (Mohr y cols., 1994).

La fisiopatología de la isquemia cerebral es diferente en la sustancia gris y en la sustancia blanca del cerebro, dado que ésta no contiene cuerpos neuronales ni sinapsis, pero sí axones mielinizados con una compleja estructura especializada (Waxman y cols., 1999).

La isquemia persistente produce alteraciones bioquímicas y morfológicas que inicialmente son reversibles, pero se transforman en irreversibles al cabo de un tiempo variable, según el tipo de célula, puesto que no todas responden por igual al insulto isquémico y existe una vulnerabilidad selectiva en razón de la densidad neuronal, de la diferente perfusión regional y distinto metabolismo. Las neuronas de la corteza cerebral, del hipocampo (en especial las de CA1), núcleo amigdalino y cerebelo son más sensibles a la isquemia y sufren cambios estructurales más precozmente que las neuronas de otras localizaciones y que las células gliales (Castillo & Rodríguez., 2004).

1.3.5. BIOQUÍMICA DE LA ISQUEMIA CEREBRAL

La disminución del flujo sanguíneo cerebral por debajo de 55-60 mL/100 g de tejido/min origina una rápida deplección energética, altera la función cerebral y desencadena una compleja cascada de alteraciones bioquímicas que condicionan la muerte celular (Deseano-Estudillo y cols., 2003).

El cerebro obtiene su energía de la oxidación de la glucosa, utilizando vías metabólicas comunes al resto del organismo. No obstante, para el cerebro la glucosa es el único sustrato metabólico. Incluso en situaciones de ausencia de aporte de glucosa, sus niveles se mantienen a través de un proceso de neoglucogénesis (convirtiendo aminoácidos en glucosa) y por la inhibición del consumo de glucosa en otros órganos.

Más de la mitad de la energía consumida por el cerebro es usada en el aporte iónico a través de las membranas celulares. Las bombas iónicas de membrana generan gradientes iónicos que son utilizados por las células como indicadores químicos y eléctricos.

En la isquemia cerebral destacamos cuatro fases fisiopatológicas, claves para explicar en el ser humano el desarrollo clínico del ictus isquémico:

1. Origen del proceso. La inflamación vascular, con posterior disfunción endotelial y fallo de los mecanismos antitrombóticos, junto al desarrollo de la placa de ateroma, suele ser el inicio del proceso isquémico, en el cual participa el vaso sanguíneo (endotelio, subendotelio y capa de fibras musculares lisas), los leucocitos (origen del

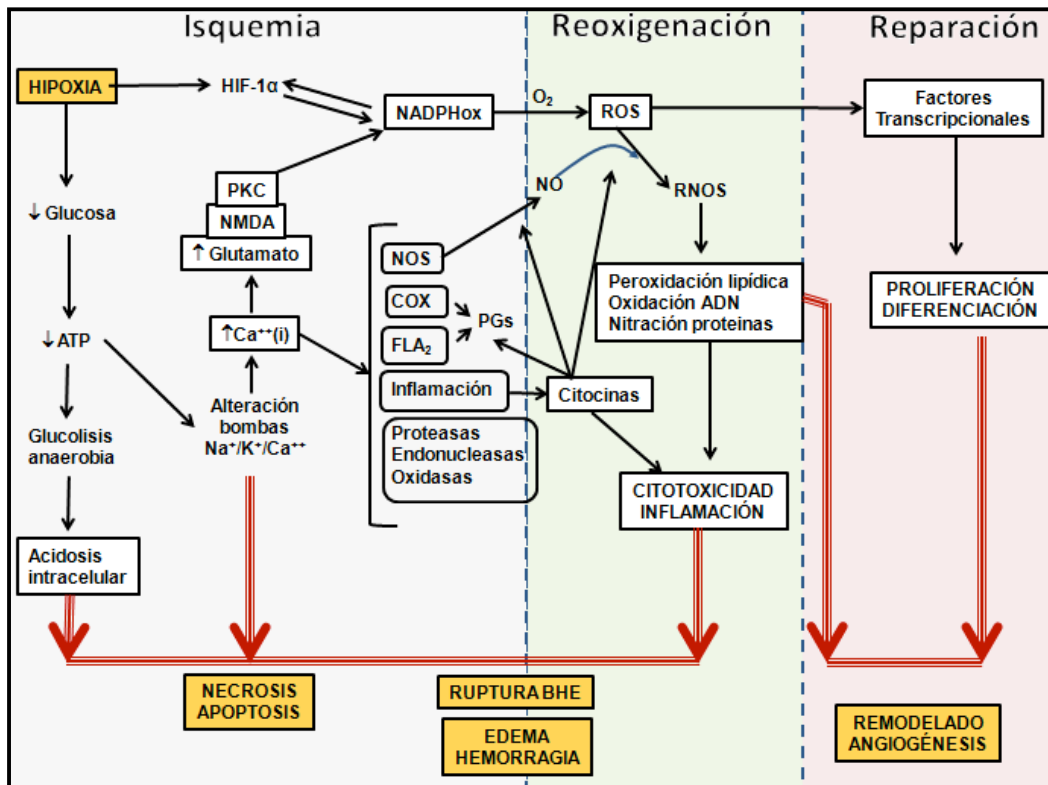
proceso de inflamación vascular) y las plaquetas (responsable inicial de la trombogénesis). En términos generales, éste es el inicio de la isquemia: la formación de un trombo arterial.

2. Fase de isquemia tisular. Se inicia con la falta de aporte de oxígeno y glucosa, entre otros elementos, al tejido cerebral. Esto origina una serie de cambios primarios de tipo metabólico (falta de ATP) y de activación de sensores moleculares de dicha falta de oxígeno, las cuales ponen en marcha una cascada de eventos bioquímicos (el acúmulo de calcio citoplasmático es el punto principal) que se encaminan hacia el daño celular y en último extremo, hacia la muerte neuronal.

3. Fase de reoxigenación. El área que rodea a la zona isquémica se puede considerar de baja perfusión de oxígeno. Asimismo, los mecanismos de compensación vascular y/o intervenciones terapéuticas de revascularización, producen una entrada, mayor o menor, de oxígeno a una zona que ya sufre daños por su falta. Entre otras consecuencias, la aparición de los radicales libres y del estrés oxidativo y nitrosativo, condiciona toda una cascada de eventos bioquímicos, entre ellos la estimulación de las vías inflamatorias, que incrementan el daño tisular.

4. Fase de reparación. Al final, el tejido cerebral tiende a reparar el daño, de igual forma que ocurre con cualquier foco inflamatorio orgánico. Esta reparación requiere la activación de factores de transcripción que generen síntesis de moléculas estimulantes de la proliferación celular y de la angiogénesis.

Estas fases las podemos resumir en el siguiente esquema:



1.3.5.1. ALTERACIONES PRIMARIAS DE LA ISQUEMIA

Inicialmente, el efecto lesivo de la isquemia a nivel celular resulta del fracaso en la producción de energía, que condiciona la pérdida de la homeostasis iónica y del potencial de membrana. Posteriormente, esto desencadena una cascada de reacciones responsables de la progresión del daño, que se potencian si no ocurre la reperfusión de manera precoz. El desarrollo de una reacción inflamatoria y el daño secundario de la microcirculación contribuyen a perpetuar el proceso.

El efecto final producido por los mediadores del daño por isquemia sería la destrucción de componentes funcionales y estructurales de la célula y el daño secundario a la microcirculación que, por diferentes mecanismos (edema y lesión endotelial, formación de agregados celulares, alteración de la reactividad y permeabilidad vascular), ocasiona el denominado “fenómeno de no-reflujo” (Ames y cols., 1968), cerrando el círculo y perpetuando el proceso.

Es lógico suponer que el restablecimiento del flujo cerebral debe ser uno de los pasos fundamentales a seguir en el tratamiento de la isquemia cerebral. No obstante, se ha comprobado que esta maniobra de forma aislada sólo es capaz de evitar la progresión del infarto cuando tiene lugar muy precozmente (antes de la primera hora) (Arnold, 2005), pues de no ser así, la cascada de mediadores del daño isquémico no sólo resulta imparable, sino que además se ve potenciada en la fase de reperfusión (Iadecola, 1999). De este modo, la reperfusión de tejidos sometidos a isquemia es responsable de efectos lesivos que se añaden al daño isquémico primario y que deben ser considerados para intentar evitar de manera total la extensión del infarto. Igual que para el daño por isquemia, el daño por reperfusión depende del tiempo que se haya mantenido la reducción del flujo sanguíneo cerebral.

1.3.5.2. MECANISMOS DE DAÑO CELULAR EN LA REPERFUSIÓN

En la producción del daño por reperfusión participan diversos mecanismos:

- La reperfusión favorece el aporte y la diseminación de metabolitos producidos durante la isquemia como H^+ , agentes con acción vasoactiva, sustancias osmóticas y agua, induciendo la formación de edema.
- Aumento en la producción de radicales libres consecuencia de la normalización del aporte de oxígeno. La hiperoxia sobre moléculas reducidas durante la isquemia favorece la oxidación de las mismas y la formación de radicales de oxígeno.
- Durante la reperfusión aumenta la producción de óxido nítrico (NO), pues la NO sintasa (NOS) requiere oxígeno para mantener su acción oxidante. Por otra parte la producción de radicales libres a partir de NO es más importante durante la reperfusión, ya que aumenta la producción de ión superóxido.
- Las sustancias quimiotácticas acumuladas durante la isquemia pueden actuar sobre las células inflamatorias aportadas por el flujo sanguíneo durante la reperfusión.

Los leucocitos activados por estas sustancias se adhieren al endotelio vascular, forman agregados que dificultan el flujo sanguíneo normal (fenómeno de no-reflujo) y

liberan de sus lisosomas radicales libres, fundamentalmente H_2O_2 y O_2^- , así como proteasas y lipasas que lesionan no sólo células parenquimatosas, sino también endoteliales, con lo que se trastorna la microcirculación y se perpetúa el daño.

En resumen, durante la reperfusión se pueden agravar o facilitar los fenómenos desencadenados por la isquemia, por lo que se habla de daño por isquemia-reperfusión.

1.3.5.3. CONSECUENCIAS A NIVEL CELULAR DE LA ISQUEMIA-REPERFUSIÓN

El flujo sanguíneo cerebral (FSC) normal en un adulto joven es de 60ml/min/100g. En el infarto cerebral se distinguen principalmente dos regiones bien diferenciadas, el “núcleo necrótico” o *core* y la zona de penumbra. Desde un punto de vista anatómo-patológico se van a diferenciar tres zonas en el área isquémica:

- 1- Zona central de infarto (FSC>10ml/min/100g), Es una región de daño tisular irreversible, en la que se produce una muerte celular aguda principalmente por necrosis (Castillo y cols., 1999). Por ello en los pacientes con isquemia cerebral, la orientación terapéutica se centra en procurar limitar la extensión de esta área de infarto (Martínez-Vila y cols., 1990).
- 2- Zona de penumbra o zona intermedia de isquemia parcial (FSC<22ml/min/100g), en la que se encuentra preservado el metabolismo energético, sin destrucción celular, y con una inactivación sináptica las neuronas; (Hossmann, 1994). La supervivencia de esta zona depende de la circulación colateral.
- 3- Zona periférica de hiperemia compensadora (FSC>22ml/min/100g), en la que el riesgo de convertirse en infarto sólo sucede en circunstancias especialmente adversas.

La viabilidad de las células en la zona de penumbra tiene un tiempo limitado ya que la disminución de las reservas de oxígeno y glucosa desencadena diversos procesos patológicos que pueden conducir a la muerte celular (Hossmann, 2006). Esta zona de penumbra puede evolucionar hacia necrosis definitiva o hacia la recuperación. La

viabilidad de esta zona está en relación inversa con la intensidad de la reducción del flujo sanguíneo y por tanto con la severidad de la isquemia, así como con la duración de la misma (Pulsinelli, 1992). De ser sobrepasado este umbral, siempre dependiendo del tiempo que se mantenga la reducción del flujo, se producirá extensión de la zona de infarto a expensas de muerte celular en el área de penumbra. Los valores de flujo entre estos umbrales límite, condicionados por el factor tiempo, caracterizan la lesión funcional, aún reversible, propia de las células en el área de penumbra isquémica. A esto hay que añadir la vulnerabilidad selectiva de los diversos grupos celulares del SNC ante la isquemia. El desajuste entre la demanda metabólica y el reducido aporte energético confiere a estos tejidos una especial sensibilidad.

La reperfusión precoz del tejido isquémico es fundamental para restaurar la función alterada, pero al mismo tiempo puede tener un efecto negativo al acentuar la destrucción de las células isquémicas aún no destruidas, es decir, las células de la zona de penumbra. La extensión de la lesión isquémica, por tanto, puede continuar después de que la circulación sanguínea haya sido restaurada. Esta lesión retardada o aplazada se llama también lesión secundaria por reperfusión.

El periodo de tiempo durante el cual persiste la penumbra, representa una “ventana potencial de oportunidad terapéutica” (Hill & Hachinski, 1998; Castillo y cols., 1999), sobrepasada la cual, cualquier medida para evitar la extensión del infarto resultará inútil. De manera que la zona de penumbra constituye el blanco principal para la mayoría de las intervenciones médicas agudas aplicadas entre las 3 y 6 horas post-ictal (Kwakkell y cols., 2004), aunque existen estudios donde sugieren que la ventana terapéutica puede ser mayor de 6 horas.

Numerosas evidencias clínicas y experimentales indican que pasadas las primeras 3-6 horas del inicio de los síntomas isquémicos es difícil detener la cascada isquémica y evitar una lesión tisular irreversible.

1.3.6. MEDIADORES FUNDAMENTALES DEL DAÑO CELULAR EN LA ISQUEMIA-REPERFUSIÓN

Son muchos los mediadores implicados en las vías bioquímicas que modulan el daño celular en la isquemia-reperfusión cerebral, pero podemos asegurar que los siguientes constituyen posiblemente el eje central de las alteraciones observadas en este proceso.

1.3.6.1. FALTA DE APORTE SANGUÍNEO

El efecto lesivo inmediato de la isquemia cerebral acontece como resultado de la perturbación del metabolismo energético celular:

- Pérdida de la capacidad de los canales de membrana dependientes de ATP para mantener la homeostasis iónica, originando salida de K^+ con el consiguiente aumento citosólico de Na^+ y de agua, así como de Ca^{++} . Esto se traduce en la imposibilidad para mantener el potencial de membrana y la actividad eléctrica neuronal normal; cuya persistencia desemboca en muerte celular (White y cols., 2000).
- Abolición de los mecanismos de síntesis y reparación de macromoléculas esenciales para el mantenimiento de la estructura y función de la célula.
- Aumento de los procesos de degradación.

Estos sucesos afectan tanto a neuronas como a células gliales o de la pared vascular, especialmente a células endoteliales teniendo como resultado la pérdida de sus funciones. Sin embargo, no todas las células del sistema nervioso central presentan la misma vulnerabilidad frente a la isquemia, siendo las neuronas más sensibles que las células gliales, por lo que el desarrollo de muerte celular e infarto puede tardar horas (Robbins y cols., 2000).

En la pared arterial se traduce en ruptura de la barrera hematoencefálica y en abolición de la reactividad vascular normal y, por lo tanto, de la capacidad de regulación de la circulación cerebral por cualquiera de sus mecanismos: físico-mecánico, metabólico humorales y neurógenos.

Esta alteración, aunque se produce con máxima expresión en el foco de infarto, también tiene lugar en el área de penumbra, siendo posible reducir el daño producido por la isquemia en esta zona mediante intervención terapéutica específica sobre los trastornos fisiopatológicos concretos.

1.3.6.2. ACIDOSIS INTRACELULAR

La disminución del aporte de oxígeno condiciona el metabolismo energético celular anaerobio de la glucosa y consecuentemente un aumento de H^+ (en relación directa con los niveles previos de glucemia), a la vez que el desacoplamiento de la fosforilación oxidativa origina un descenso en la producción de ATP (Belayev y cols., 1997; Hoehn-Berlage y cols., 1995) y otros nucleótidos energéticos.

Se ha observado que en situaciones de hiperglucemia el daño cerebral consecuente a la isquemia es mayor y de evolución más rápida debido a la mayor severidad de la acidosis, consecuencia de la hiperproducción de ácido láctico por el metabolismo anaerobio de la glucosa. Otros estudios sin embargo, han podido demostrar un cierto efecto protector de la acidosis, siempre que sea moderada, al prevenir el exceso de flujo de calcio por cualquiera de sus vías, especialmente por inhibición de los receptores N-metil-D-aspartato (NMDA) del glutamato. En el caso de que la acidosis sea suficientemente severa puede agravar la lesión isquémica por varios mecanismos:

1. Aumentando el edema intracelular: Un aumento de H^+ puede ser intercambiado por Na^+ extracelular, induciendo así, en un intento de regular el contenido en H^+ , la entrada de Na^+ con H_2O osmóticamente obligada.
2. Inhibiendo la fosforilación oxidativa.
3. Alterando la microcirculación, a través del daño a la célula endotelial por los mecanismos anteriormente mencionados y por inducción de vasodilatación.
4. Incrementa el acúmulo intracelular de calcio al desplazarlo de su unión a proteínas intracelulares.

1.3.6.3. ACÚMULO INTRACELULAR DE CALCIO

Aunque el ión calcio es fundamental para gran cantidad de reacciones intracelulares, un aumento de sus niveles por encima de lo normal puede tener consecuencias nefastas.

En situaciones fisiológicas la concentración de Ca^{++} intracelular es muy baja respecto a la concentración de calcio extracelular, que es cuatro veces mayor. Las neuronas al igual que otras células contienen calcio fundamentalmente en el retículo endoplásmico y en las mitocondrias. La entrada de calcio en las mitocondrias y su salida del retículo endoplásmico está controlada en parte por los receptores metabotrópicos de membrana mientras que la salida de calcio de las mitocondrias es un proceso energía-dependiente. Para mantener este gradiente a través de la membrana celular existe un movimiento de calcio (Erecinska y cols., 1994) a través de un complicado mecanismo.

Parece que los fenómenos iniciales desencadenados por la isquemia a nivel celular, además de la acidosis, sería la salida de K^+ al espacio extracelular, originando una despolarización incipiente, responsable de una corriente inicial de entrada de calcio, y el progresivo aumento de calcio citosólico como consecuencia de la liberación desde depósitos intracelulares.

El aumento de Ca^{++} unido a la despolarización inicial condicionaría una cascada de reacciones cuyo efecto sería amplificar estos trastornos para perpetuar el proceso de lesión isquémica:

1. El proceso isquémico junto al aumento de Ca^{++} citosólico favorece la permeabilidad de la membrana a los iones y esto contribuye al consumo de ATP en un intento de mantener la homeostasis. Cuando éste se agota, el fallo de la bomba favorece más el aumento de permeabilidad para alterar la homeostasis iónica y mantener la despolarización de membrana. Por otra parte, en situaciones de sobrecarga citosólica de calcio, las mitocondrias derivan la producción de energía a la recaptación del mismo con el consiguiente descenso en la producción de ATP.

2. En la terminal presináptica, la despolarización ocasionada por la pérdida de la homeostasis permite la entrada de calcio a través de canales dependientes de voltaje y el aumento de calcio citosólico induce la liberación de aminoácidos excitatorios como el glutamato, que además se ve favorecido a través de la inversión de su mecanismo de

recaptación, que se lleva a cabo, en condiciones normales, en intercambio con Na^+ . Esta inversión tiene lugar como consecuencia de la despolarización y la pérdida del gradiente de Na^+ .

3. En la neurona postsináptica, el glutamato activa los receptores ácido α -amino-3 -hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico (AMPA), N-metil-D-aspartato (NMDA) (desinhibido por la despolarización de membrana) y kainato, aumentando aún más la entrada de calcio y facilitando la corriente iónica a favor del gradiente (Meldrum y cols., 1992).

4. Todos estos fenómenos desembocarían en un aumento masivo de calcio citosólico por los siguientes mecanismos:

a) En función de la inversión del transporte acoplado a Na^+ , debido a la pérdida del gradiente del mismo.

b) Apertura de canales voltaje dependientes en la célula despolarizada.

c) Efecto de la acidosis creciente, que lo desplaza de su unión a proteínas.

d) Entrada a través del receptor NMDA.

e) Como consecuencia de la activación de fosfolipasa C (a través de glutamato), que mediante la producción de fosfatidil inositol favorecería la liberación de Ca^{2+} desde el retículo sarcoplásmico.

5. Además de glutamato, se liberan otros aminoácidos (GABA y glicina) y aminas biógenas (dopamina, noradrenalina, serotonina). Las aminas biógenas, concretamente la noradrenalina y la serotonina, tienen acción vasoconstrictora sobre las arterias cerebrales y contribuyen, al liberarse en cantidad excesiva, a favorecer el desarrollo de hipoperfusión secundaria en el área de penumbra. Por otra parte, actúan como inductores de agregación plaquetaria y promueven la formación de agregados intravasculares que dificultan aún más el flujo sanguíneo. Finalmente, aumentan la demanda metabólica neuronal.

1.3.6.4. ACÚMULO DE EICOSANOIDES

El severo aumento de la concentración citoplasmática de calcio durante la isquemia cerebral constituye un estímulo no fisiológico para la puesta en marcha de una serie de reacciones enzimáticas que, fuera de control, son altamente nocivas: proteasas que destruyen proteínas del citoesqueleto, endonucleasas que atacan a los ácidos nucleicos, proteinquinasas que produciendo su fosforilación alteran la función de receptores y canales iónicos, y finalmente fosfolipasas, cuya activación tiene importantes consecuencias, además de producir la lesión estructural de membrana.

La activación de las fosfolipasas A₂ y C, a través de su acción sobre fosfolípidos de membrana, conduce a la formación de ácido araquidónico (Burch y cols., 1987) que, por vía de la ciclooxigenasa y la lipooxigenasa, da lugar a la formación de eicosanoides, implicados en la regulación de muchos procesos fisiológicos y se encuentran entre los mediadores y los moduladores de la reacción inflamatoria.

Los eicosanoides principales son las prostaglandinas, los prostanoides (prostaciclina y tromboxano), leucotrienos y lipoxinas. El ácido araquidónico libre se metaboliza por medio de diversas vías, mediante la ciclooxigenasa (isoformas 1 y 2) de ácidos grasos que inician la biosíntesis de las prostaglandinas y de los prostanoides y por diversas lipooxigenasas que inician la síntesis de los leucotrienos y las lipoxinas.

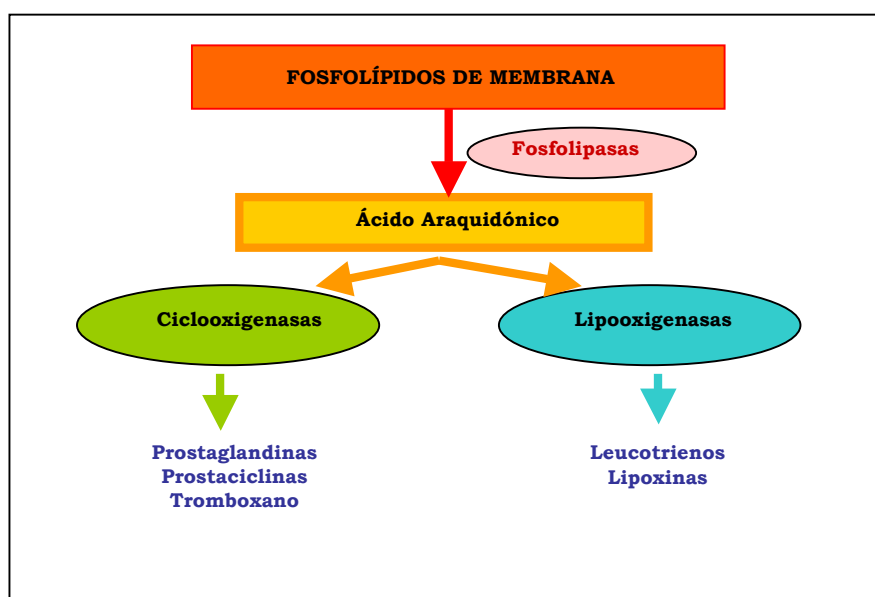


Figura 1.5. Esquema de la vía del ácido araquidónico.

Durante la isquemia cerebral, la expresión y la actividad de las fosfolipasas y sus eicosanoides está aumentada, por lo que se inicia una cadena de eventos que es responsable del desarrollo del daño neuronal. Esto sugiere que las estrategias terapéuticas encaminadas a inhibir fosfolipasas, ciclooxigenasas y lipooxigenasas, reduciría la morbilidad subsecuente al daño producido por isquemia (Phillis y cols., 2003).

1.3.6.5. MEDIADORES INFLAMATORIOS

El aumento de la concentración intracelular de Ca^{++} también desencadena la puesta en marcha de la denominada cascada inflamatoria de la isquemia cerebral, que se inicia con la expresión local de citocinas inflamatorias como el factor de necrosis tumoral (TNF- α) y la interleucina 1 β (IL-1 β), que a su vez estimulan la liberación de otras citocinas (IL-6 e IL-8), así como de factores quimiotácticos y de moléculas de adhesión leucocitarias como las selectinas (P-selectina, E-selectina y L-selectina), la molécula de adhesión intercelular (ICAM-1), la molécula de adhesión celular vascular (VCAM)-1 y la molécula de adhesión celular plaquetaria endotelial (PECAM) (Feuerstein y cols., 1998). La liberación de estas moléculas promueven el reclutamiento y la migración de leucocitos polimorfonucleares (LPMN) hacia la zona isquémica. Aunque los datos en humanos son escasos, mediante técnicas de marcaje isotópico de leucocitos se ha demostrado un elevado número de estas células en zonas cerebrales hipoperfundidas, entre 6-12 horas después del episodio ictal (Akopov y cols., 1996).

Durante mucho tiempo se creyó que los leucocitos ejercían una función de limpieza del tejido necrótico infartado en fases tardías de la isquemia cerebral, sin embargo, en el momento actual se considera que desempeñan un papel fundamental en la lesión neuronal secundaria a la isquemia y en la posible extensión del área de infarto. De hecho, en modelos experimentales de isquemia cerebral se ha demostrado que los LPMN se encuentran ya en los microvasos cerebrales a los 30 minutos de evolución de la isquemia (García y cols., 1994). Este dato también ha sido comprobado después de la oclusión de la arteria cerebral media (MCAO). La migración es mediada por 3 clases de moléculas de adherencia celular: selectinas, integrinas e

inmunoglobulinas, muestra de una regulación tanto intracelular como por citoquinas (Huang y cols., 2006). El reclutamiento de neutrófilos en el cerebro isquémico comienza con el deslizamiento del mismo sobre células endoteliales de la pared vascular, mediado por selectinas, seguido de la activación y adhesión del mismo, mediada por integrinas e inmunoglobinas. Cuando están adheridos a las paredes del vaso sanguíneo, los neutrófilos emigran al parénquima cerebral, en un proceso facilitado por la interrupción de barrera hematoencefálica (BHE). (Huang y cols., 2006)

Existen diferentes mecanismos a través de los cuales los LPMN pueden ejercer su efecto deletéreo en la isquemia cerebral. En primer lugar, los LPMN pueden obstruir la microvasculatura cerebral originando lo que se conoce como fenómeno de no reflujo o imposibilidad para la recuperación completa del flujo sanguíneo cerebral en el área isquémica tras la recanalización del trombo fibrinoplaquetario que se produciría fundamentalmente como consecuencia de la interacción de los LPMN con las células endoteliales mediada por moléculas de adhesión leucocitaria. Por otro lado, los leucocitos pueden estimular la liberación de sustancias vasoconstrictoras con alteración secundaria de la vasorreactividad cerebral, así como de enzimas proteolíticos citotóxicos que pueden dañar el endotelio vascular facilitando el paso de agua y eritrocitos, lo que puede contribuir a la aparición de edema cerebral y transformación hemorrágica del infarto cerebral, respectivamente (Hamann y cols., 1996).

1.3.6.6. OXIDO NÍTRICO

Existe evidencia de que el aumento de calcio citosólico conduce a la estimulación de la oxido nítrico sintasa (NOS), un enzima dependiente de calmodulina, con el consiguiente acumulo de óxido nítrico (NO) (Kontos, 1993; Nishikawa y cols., 1993). El NO, que en condiciones normales es un mediador fisiológico de vasodilatación, así como inhibidor de la agregación plaquetaria y citoprotector, aunque resulta muy tóxico cuando existe en grandes cantidades, pues conduce a la formación de radicales libres muy reactivos (Nishikawa y cols.; 1994), como los peroxinitritos.

En resumen, en los procesos de isquemia-reoxigenación cerebral se dan los siguientes fenómenos:

- Un aumento de la actividad y expresión de la eNOS (isoforma constitutiva endotelial) a los pocos minutos de producirse la hipoxia, en un intento urgente de regular por medio de una vasodilatación el flujo sanguíneo cerebral.
- Un aumento de la actividad y expresión de la nNOS (isoforma constitutiva neuronal) que produciría un incremento de NO, contribuyendo a medio plazo al daño isquémico en el cerebro.
- Un aumento de la actividad y expresión de la iNOS (isoforma inducible), que tiene lugar después de varias horas de iniciarse el estímulo hipóxico, con la producción de niveles incontrolados de NO, contribuyendo al progreso de la neuropatología.

Los efectos tóxicos del NO están relacionados con una serie de mecanismos entre los que destaca la producción de peroxinitritos (ONOO^-), radical que se genera mediante la reacción del NO con el anión superóxido, reacción favorecida por las altas concentraciones de NO que en estas condiciones reacciona más rápidamente con el anión, que éste con su enzima detoxificadora. El ONOO^- es el responsable de los efectos deletéreos del NO sobre las principales moléculas (peroxidación lipídica, daño a proteínas por nitración de tirosinas y daño al ADN) e induce la liberación de neurotransmisores excitatorios. El NO también produce la inhibición de enzimas tan fundamentales como la glutatión peroxidasa y la citocromo c oxidasa mitocondrial y, al igual que los peroxinitritos, contribuye al daño por excitotoxicidad al liberar neurotransmisores como el glutamato (Torregrosa G. y cols. 2007).

1.3.6.7. FACTOR INDUCIDO POR HIPOXIA (HIF)

Los factores inducibles por hipoxia (HIFs) son un conjunto de factores transcripcionales que regulan la respuesta en una situación de hipoxia codificando la expresión genética involucrada en los procesos de glicólisis, eritropoyesis, angiogénesis, proliferación y función de las células madre (Hongxia y cols., 2010).

El factor HIF es un complejo heterodímero de unión al ADN compuesto por dos proteínas de doble hélice básicas (Wang y cols., 1995):

Introducción

- Una forma constitutiva expresada como HIF- β o hidrocarburo receptor nuclear translocador (ARNT).
- Y una forma sensible a los niveles de oxígeno, HIF- α . Ésta forma presenta tres isoformas: HIF-1 α , HIF-2 α , y HIF-3 α ³, que heterodimeriza con ARNT (HIF-1 β), ARNT2, o la subunidad ARNT3 a través de su doble hélice y proteínas de ritmo circadiano, ARNT, y proteínas de un solo propósito.

En condiciones de hipoxia, el proceso adaptativo de supervivencia celular está coordinado por el factor de transcripción HIF sensible al oxígeno y está mediado por la transcripción de más de 200 genes diana (Satwat y cols., 2012).

En condiciones normales el factor HIF es rápidamente degradado por enzimas proli-4-hidroxilasa (PHDs) y por la proteína supresora de tumor von-Hipper-Lindau (VHL), mientras que en condiciones de hipoxia, el factor HIF es estabilizado mediante la inhibición de PHDs y la producción mitocondrial de radicales libres (Sang-Ging Ong y cols., 2012).

En condiciones normales, la hidroxilación de dos residuos propilo por propil-hidroxilasas ocurre en la degradación dependiente de oxígeno de la subunidad α , lo que provoca la interacción del factor supresor tumoral con-Hipper Lindau con la subunidad α orientándola a una proteólisis por la vía del protosoma ubiquitina (Maxwell y cols., 1999; Ohh y cols., 2000). Por tanto, el subunidad HIF- α tiene una vida media corta (Jewell y cols., 2001) y las células la sintetizan y degradan constantemente.

En condiciones de hipoxia, hay una inhibición de PHD, el factor HIF- α escapa de la degradación proteosomal, se transloca al núcleo y se dimeriza con HIF-1 β . Este complejo se une al elemento de respuesta a la hipoxia con el objetivo de mejorar secuencias de genes diana resultando en su transcripción (Weidemann y cols., 2008). La subunidad HIF- α también es degradada por el factor sensible al oxígeno inhibiendo el factor HIF-1 α , la asparaginil hidroxilasa que detiene la interacción entre HIF-1 α y coactivadores p300/CBP y transcripciones impares (Webb y cols., 2009; Mahon y cols., 2001).

El factor HIF-1 α está involucrado en respuestas fisiopatológicas de una gran variedad de enfermedades como cáncer, inflamación e isquemia. Existe evidencia

científica que demuestra el papel protector del factor HIF- α en la fisiopatología cardiovascular (Majmundar y cols., 2010).

1.3.6.8. NADPH OXIDASA

El complejo enzimático de la NADPH oxidasa constituye la mayor fuente de especies reactivas de oxígeno en la vasculatura, cataliza el transporte de electrones desde ésta al O₂ del espacio extracelular produciendo O₂⁻ (Griendling y cols., 2000, Cave y cols., 2006).

Inicialmente se determinó la estructura y función de la NADPH oxidasa en neutrófilos, más tarde a nivel vascular en las células endoteliales y en el músculo liso vascular (Touyz y cols., 2002, Cai y cols., 2003). Existen 7 isoformas de las subunidades catalíticas de la NADPH oxidasa, NOX1-5 y DUOX1-2, y todas ellas contienen dos grupos hemo, un FAD y un sitio de unión al NADPH (Rivera y cols., 2010).

Son producidas no sólo ante determinadas enfermedades sino de forma fisiológica (Cave y cols., 2006). Fisiológicamente la NADPH oxidasa participa en la regulación de la función endotelial y el tono vascular, pero cuando se sobrepasa la capacidad de defensa orgánica antioxidante producen estrés oxidativo, lo que causa disfunción endotelial, inflamación, apoptosis, migración, fibrosis, hipertrofia y angiogénesis (Landmesser and Harrison 2001).

Entre los inductores que la activa, por una parte destacamos los factores metabólicos como la hiperglucemia, la hiperinsulinemia y el aumento de los productos de glicación y por otro lado, los procesos de hipoxia-reoxigenación. Diversos estudios han demostrado el acúmulo de EROS producidas tras la reperfusión por la NADPH oxidasa, entre otros, juega un papel muy perjudicial en la viabilidad y mantenimiento del tejido cerebral, aunque tras la fase de reperfusión ejercen un efecto beneficioso al estar implicadas en la proliferación celular y diferenciación, necesaria para la angiogénesis (Cave y cols., 2006).

La angiogénesis es inducida por las ERO a través de la activación del VEGF y del HIF (Maulik y cols., 2002). Las interacciones entre la NADPH oxidasa y las proteínas HIF han sido mostradas por diferentes isoformas NOX. Hay datos que indican que las isoformas NOX 2 y 4 juegan un papel en la regulación de los niveles de HIF-1 α en células endoteliales.

1.3.6.9. ESTRÉS OXIDATIVO Y NITROSATIVO

En comparación con otros órganos, el cerebro parece particularmente vulnerable al estrés oxidativo por diferentes motivos:

1- aun constituyendo un 2% del peso corporal, las células del cerebro humano utilizan un 20% del oxígeno consumido por el organismo completo; esto indica que el cerebro genera muchos más radicales libres y ROS que otros órganos

2- varias regiones cerebrales contienen altas concentraciones de hierro, con lo que se cataliza la generación de radicales libres

3- el cerebro es rico en lípidos con ácidos grasos insaturados, los cuales constituyen diana para la peroxidación lipídica

4- en comparación con otros órganos, como el riñón o el hígado, el cerebro posee una capacidad antioxidante protectora más bien baja o moderada (Torregrosa G. y cols. 2007).

1.3.6.9.1. ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO Y ESPECIES REACTIVAS DE NITRÓGENO (ROS Y RNS)

La presencia de radicales libres parece representar uno de los factores más importantes de la lesión cerebral durante la reperfusión post-isquémica. Durante la hipoxia/isquemia y por diferentes mecanismos, se produce un aumento en la liberación de especies reactivas del oxígeno. Así pues, en situaciones de déficit de O₂, el superóxido es producido por la microglía activada, el ácido araquidónico es liberado desde la membrana celular por la fosfolipasa A₂, y se produce colateralmente hidroperóxidos lipídicos y radicales libres.

Diferentes fuentes de radicales libres han sido propuestas, incluyendo células inflamatorias, xantina oxidasa, ciclooxigenasa y mitocondrias. El gran incremento de

glutamato y aspartato que acompaña a la isquemia contribuye a la generación de radicales libres por mecanismos excitotóxicos. (Mariani E. y cols., 2005)

En estas circunstancias tiene lugar la entrada de Ca^{++} como consecuencia a la despolarización de membranas, pudiéndose convertir la xantina deshidrogenasa en oxidasa, para utilizar como receptor oxígeno de electrones y liberar también el superóxido.

Como otra fuente de especies reactivas de oxígeno se ha descrito a la propia NOS, que en concentraciones subóptimas de L-arginina puede producir el superóxido y el peróxido de hidrógeno.

Por último, se admite que la disminución de la actividad de la citocromo C oxidasa de la cadena respiratoria mitocondrial que se produce tras la isquemia, puede llevar a la liberación de especies reactivas de oxígeno. La mitocondria no es sólo una fuente principal de generadores intracelulares de ROS, sino también los objetivos del ataque de especies reactivas del oxígeno (D.G. Nicholls y cols., 2004). También la producción de NO se incrementa, como ya hemos visto, en el periodo de isquemia por la sobreexpresión de las tres isoformas de la NO sintasas.

La activación persistente de receptores de glutamato puede disminuir considerablemente el nivel de glutatión intracelular (GSH). Las especies reactivas de oxígeno se acumulan sorprendentemente en muy poco tiempo al igual que la disminución de GSH. (Sato T. y cols., 2004)

Para todos estos procesos es necesaria la presencia de oxígeno, lo cual nos lleva a pensar que estos fenómenos se producen a partir del período reperusión/reoxigenación con un tejido dañado (Maier y cols., 2006), pero como hemos visto, su inicio acontece en la fase de isquemia-hipoxia aunque sea posteriormente cuando alcance una mayor importancia, y donde los sistemas de defensa antioxidante son desbordados por la gran producción de estos radicales lo que conduce a la muerte celular.

1.3.6.9.2. SISTEMAS DE DEFENSA DEL DAÑO OXIDATIVO

Nuestro organismo posee distintos mecanismos por los que contrarrestar el ataque oxidativo de las moléculas anteriormente citadas; a saber:

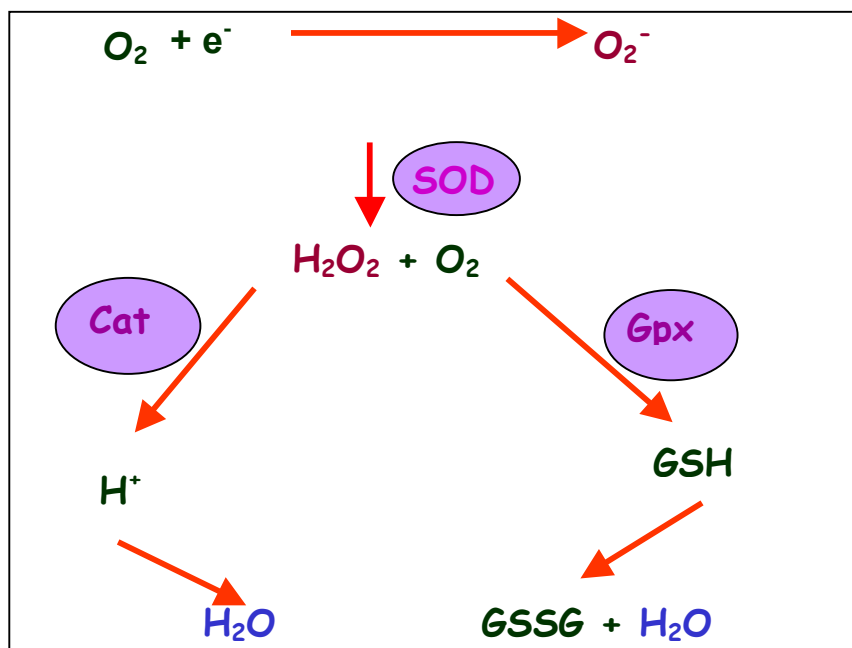


Figura 1.6. Sistema de defensa antioxidante.

Por un lado dispone de mecanismos enzimáticos (catalasas, superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa, y NADPH), y por otro de mecanismos no enzimáticos (Vitamina E, C, carotenos, selenio), para neutralizar estas sustancias tóxicas naturales:

➤ Superóxido Dismutasa

Sea cual sea el origen del electrón aportado, cuando se incorpora a la molécula de oxígeno, se forma el ya conocido radical superóxido (O_2^-) (Clark, 1984). Este radical puede reaccionar rápidamente con moléculas orgánicas y producir un daño reductor al liberarse del electrón sobrante, pero existe una enzima la superóxido-dismutasa (SOD), que acelera 10 veces la dismutación espontánea del anión. Esta enzima, en presencia de protones, facilita el paso de dicho anión a peróxido de hidrógeno (H_2O_2) (Dalsing y cols., 1983).



El peróxido de hidrógeno no es un verdadero radical, pero si se dejase reaccionar libremente daría paso a otros radicales mucho más reactivos.

➤ Sistema de la Catalasa

Esta enzima degrada al peróxido de hidrógeno transformándolo en agua (Otani, 1986). Está presente en el citosol, en las mitocondrias y otros gránulos, encontrándose en concentraciones bajas o ausentes en el plasma. La vida media de esta enzima al igual que la de la SOD es muy corta, por lo que deben ser fabricadas continuamente para mantener su concentración plasmática.

➤ Sistema de la glutatión-peroxidasa

El glutatión constituye un elemento central en la defensa antioxidante (Viña y cols., 1992). Es un pequeño tripéptido constituido por ácido glutámico, cisteína y glicina. Es el grupo sulfhidrilo de la cisteína, el responsable de la capacidad neutralizadora de los radicales libres. Se encuentra prácticamente en todas las células pero la mayor parte es sintetizada en el hígado. Es posible que el glutatión inhiba enzimáticamente la peroxidación, actuando a nivel de la glutatión peroxidasa, que reduce los hidroperóxidos fosfolipídicos.

Son varios los sistemas enzimáticos que han aprovechado el enorme potencial reductor de este péptido: glutatión peroxidasa, glutatión reductasa y glutatión transferasa:

- Actividad glutatión peroxidasa. Fue descrita por primera vez por Mills en 1957. Esta familia de enzimas cataliza la oxidación de glutatión reducido (GSH), a glutatión oxidado (GSSG) a expensas de ROOH⁻



Estas enzimas pueden reducir tanto H₂O₂ como peróxidos orgánicos libres como los peróxidos de ácidos grasos. Existen 2 átomos de selenio ligados al centro activo en forma de selenio-cisteína. Tienen alta afinidad por sus sustratos pero baja capacidad de reacción. La glutatión peroxidasa está localizada en el citosol de las células, diferenciándose dos tipos:

- Glutatión peroxidasa dependiente de selenio, que es un tetrámero de cuatro subunidades presente en el citoplasma de las células eucariotas mayoritariamente, y en

Introducción

menor grado dentro de las mitocondrias. Es posible localizarla en varios órganos aunque su actividad más alta es en el hígado.

▪ A la actividad glutatión peroxidasa independiente de selenio también se le puede denominar glutatión transferasa. Constituye un grupo de isoenzimas diméricas cuya distribución es citosólica y mitocondrial. Tienen baja actividad frente a los peróxidos orgánicos, y nula frente al H_2O_2 . Su papel parece estar más relacionado con reacciones de biotransformación de xenobióticos y detoxificación de carcinógenos.

• Otras enzimas relacionadas pero de menor importancia son la glutatión reductasa y la glucosa 6-P deshidrogenasa, que contribuyen al sistema defensivo antioxidante, proporcionando GSH para la actividad glutatión peroxidasa la primera, y NADPH para la actividad glutatión reductasa la segunda. La localización de la glutatión reductasa es idéntica a la de la glutatión peroxidasa; la de la glucosa 6-P deshidrogenasa es citosólica.

Estos sistemas antioxidantes son insuficientes en condiciones que dan lugar a la producción de radicales libres en gran cantidad como la exposición ionizante, infecciones, determinadas toxinas y en la isquemia, sobre todo si ésta se sigue de reperfusión. En estos casos, los radicales libres son un importante mecanismo productor de daño tisular, siendo uno de los principales órganos diana la fracción lipídica de la membrana.

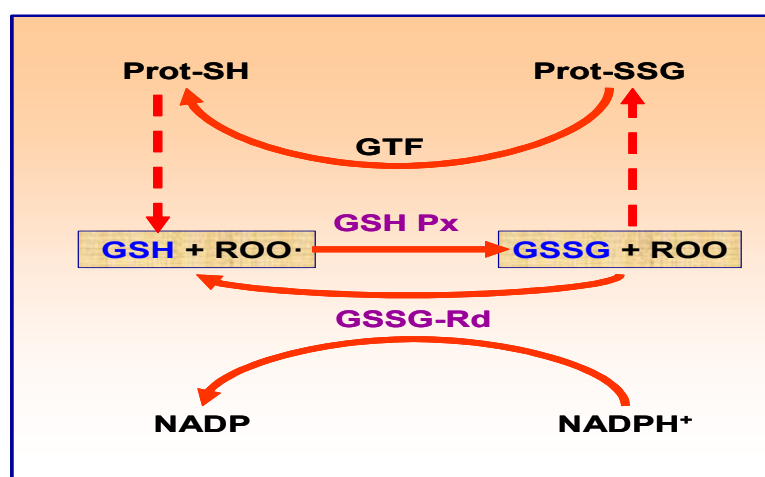


Figura 1.7. Sistema enzimático del glutatión

1.3.6.9.3. DAÑOS PROVOCADOS POR RADICALES LIBRES

En términos generales, un radical libre puede reaccionar con cualquier molécula orgánica, si bien son los lípidos los puntos de acción de dichos radicales con mayor trascendencia fisiopatológica.

Las lesiones producidas por los radicales pueden ser de muy diversa naturaleza, pero en general actúan por uno de los siguientes mecanismos:

- Captando un hidrogenión de una molécula.
- Introduciéndose el radical libre como tal en la molécula diana, siendo éste el principal mecanismo del anión hidroxílico (OH).
- Transfiriendo un electrón.

En cualquiera de los tres casos, la reacción de un radical con otra molécula origina la formación de un nuevo radical que puede o no, ser tan reactivo como la especie original.

Estas acciones afectan a diversos grupos de sustancias:

a.) Proteínas. La oxidación de proteínas puede ser reversible o irreversible. La oxidación reversible constituye, en ocasiones, una forma de activar o desactivar proteínas, como en el caso de la formación de puentes disulfuro entre grupos tioles de cisteínas cercanas dentro de la conformación tridimensional de una proteína. Otras formas de oxidación reversible son la glutationilación y la S-nitrosilación. La oxidación irreversible de proteínas se da principalmente por el mecanismo de la carbonilación (Díaz-Acosta y cols., 2006). La carbonilación ocurre principalmente en los residuos prolina, arginina y lisina (Nyström, 2005).

Todas las proteínas son potenciales blancos de oxidación. Dentro de las principales modificaciones que sufren ante la oxidación son la pérdida de la actividad catalítica, modificaciones en aminoácidos, formación de grupos carbonilo, alteración de la estabilidad térmica, cambio en la viscosidad, fragmentación, formación de enlaces covalentes inter o intraproteicos, formación de puentes disulfuro y mayor susceptibilidad a proteólisis (Cabiscol y cols., 2000).

Introducción

Entre las proteínas sometidas a un mayor riesgo de afectación por esta acción de los radicales libres, se encuentran alfa-1-antiproteasa, calmodulina, ATP-asa- Ca^{++} -dependiente, glucosa-6-P deshidrogenada y gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa entre otras.

b) Ácidos nucleicos. Fundamentalmente en la estructura del ADN, los radicales libres alteran la secuencia de azúcares / fosfatos que forman la cadena del ácido desoxirribonucleico directamente o bien pueden unirse a las bases púricas o pirimidínicas convirtiéndolas en inestables y altamente reactivas. Este es el caso de la acción del radical hidroxílico. Los radicales libres de bases púricas o pirimidínicas formados pueden perpetuar la reacción en cadena, así como inducir deleciones cromosómicas con la consiguiente aparición de mutaciones o de muerte celular (Mariani y cols., 2005).

c) A nivel de la matriz extracelular. A este nivel los radicales libres provocan la fragmentación de los polipéptidos proteoglicanos e impiden la formación de las hélices de colágeno.

d) Lípidos de membrana. En este caso originan la producción de peroxidación lipídica que describiremos con más detalle a continuación.

Los radicales libres pueden afectar pues a cualquier estructura celular. De entre estas afectaciones cabe destacar la acción lesiva que estas moléculas realizan sobre las membranas celulares, y que va a especificarse fundamentalmente a tres niveles: peroxidación lipídica, perturbación de la cascada metabólica del ácido araquidónico y alteración del equilibrio iónico a través de la membrana. Todas estas lesiones se canalizan a través de un punto común, el estímulo de la peroxidación lipídica.

1.3.6.9.4. PEROXIDACIÓN LIPÍDICA

Los radicales libres actúan sobre los ácidos grasos poliinsaturados presentes en los fosfolípidos, para producir su peroxidación no enzimática. Los radicales más reactivos, fundamentalmente OH^{\cdot} , captan protones de los residuos de carbono del ácido graso dejando un electrón desapareado que puede reaccionar con oxígeno (fundamentalmente durante la reperfusión), para formar un radical perhidroxilo que a su vez es muy reactivo, pudiendo llevar a cabo la peroxidación de otros ácidos grasos. La

peroxidación de los lípidos de membrana también es iniciada por acción enzimática (activación de la lipooxigenasa y ciclooxigenasa). Los peróxidos lipídicos son muy tóxicos para componentes celulares por sí mismos o a través de su descomposición en aldehídos, que tienen lugar por acción del calor o de iones metálicos (Cu y Fe).

Las membranas celulares están constituidas por una doble capa lipídica formada por fosfolípidos y proteínas; los fosfolípidos son por lo general ácidos grasos poliinsaturados y son los que en términos generales confieren las propiedades fisicoquímicas a esta membrana. Estos ácidos grasos se caracterizan por presentar gran cantidad de enlaces dobles, lo que los hace especialmente susceptibles a la acción de los radicales libres. La peroxidación lipídica es la destrucción de la porción hidrofóbica o interna de la membrana de los ácidos grasos poliinsaturados por oxidación de sus componentes, rindiendo en la reacción hidroperóxidos, en un sistema de propagación en cadena.

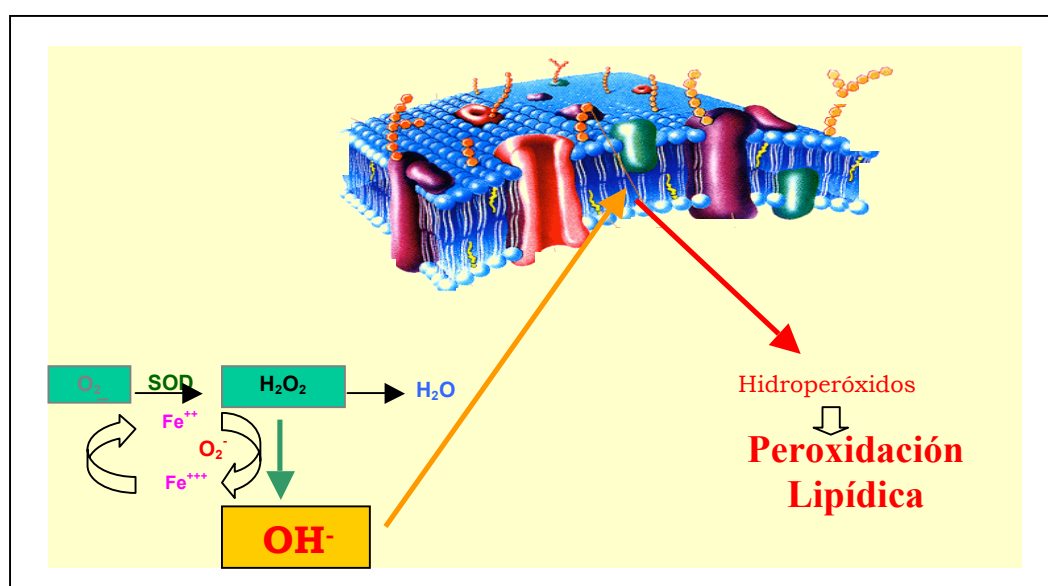


Figura 1.8. Peroxidación lipídica

Unas células especialmente susceptibles a la peroxidación lipídica son las del sistema nervioso central, dado el alto grado de insaturación de los ácidos grasos que integran sus membranas (McCall y cols., 1987).

Como consecuencia de la afectación de las membranas en el proceso de peroxidación lipídica, se altera secundariamente el metabolismo en cascada del ácido araquidónico y el flujo iónico a través de la membrana.

1.3.7. DAÑOS BIOQUÍMICOS: ESTÍMULO DE LA INFLAMACIÓN

Cuando se lesiona un tejido, ya sea por la acción de bacterias, traumatismos, sustancias químicas, calor u otros fenómenos, el tejido lesionado libera múltiples sustancias que provocan cambios secundarios en los tejidos. Todo el complejo de cambios tisulares se denomina inflamación y junto a la respuesta inmunitaria se activan como mecanismo de defensa (Guyton and Hall, 2007).

La inflamación se caracteriza por:

- 1) la vasodilatación de los vasos sanguíneos locales, con el consiguiente exceso de flujo sanguíneo local.
- 2) el aumento de la permeabilidad de los capilares, lo que permite la fuga de grandes cantidades de líquido hacia los espacios intersticiales.
- 3) a menudo la coagulación del líquido de los espacios intersticiales por cantidades excesivas de fibrinógeno y otras proteínas que salen de los capilares.
- 4) la migración de un gran número de granulocitos y monocitos al tejido.
- 5) la tumefacción de las células tisulares.

Algunos de los muchos productos tisulares que provocan estas reacciones son la histamina, la bradicinina, la serotonina, las prostaglandinas, varios productos de reacción diferentes del sistema del complemento, los productos de reacción del sistema de coagulación de la sangre y múltiples sustancias llamadas linfocinas. Varias de estas sustancias activan el sistema macrofágico y en pocas horas los macrófagos comienzan a devorar los tejidos destruidos, y en ocasiones también lesionan las células tisulares aún vivas.

Uno de los primeros resultados de la inflamación es “aislar” la zona lesionada del resto de tejidos. Los espacios tisulares y los linfáticos de la zona inflamada se bloquean con coágulos de fibrinógeno de manera que durante algún tiempo apenas fluye líquido a través de los espacios. Este proceso de tabicación retrasa la diseminación de bacterias y residuos tóxicos. La intensidad del proceso inflamatorio suele ser proporcional al grado de lesión tisular. Por ejemplo, en el caso de infecciones, cuando un microorganismo muy lesivo (toxinas,...) ocasiona un daño, el organismo reacciona rápidamente evitando su diseminación por el cuerpo. En el caso de agentes que no produzcan una destrucción tisular local intensa, el proceso de tabicación se desarrolla de manera más lenta, lo que a veces permite que se diseminen y así un microorganismo menos lesivo ocasiona un daño más grave.

Aunque en la patogénesis de la isquemia cerebral se hallan implicados diferentes mecanismos, existen evidencias crecientes según las cuales el proceso inflamatorio es una de las principales causas por las que la patología progresa, al menos en fase aguda. Tras el aumento de Ca^{2+} intracelular posterior al proceso isquémico, se produce la activación de diversas enzimas como la fosfolipasa A_2 , ciclooxigenasas y de la lipólisis. Seguidamente, se induce la activación de diferentes intermediarios de señales de transducción como el NO, productos de la peroxidación de lípidos, radicales libres de oxígeno, la enzima inducible de la NO sintasa y otras moléculas inducibles por hipoxia que producen daño tisular y necrosis celular. En las células dañadas de la glía, células endoteliales, leucocitos y células del sistema inmunitario, se induce la expresión de genes de respuesta temprana que producen un aumento de la expresión de citocinas inflamatorias y quemoquinas. El factor nuclear de transcripción $NF\kappa B$, uno de los principales genes protagonistas, activa al factor de necrosis tumoral ($TNF\alpha$), la interleucina 1β ($IL-1\beta$) y la interleucina 6 ($IL-6$). Otras moléculas, como la prostaglandina E_2 , también pueden inducir inflamación mediante la regulación al alza del $TNF\alpha$ y de la $IL-6$. La regulación positiva de citocinas induce la expresión de moléculas de adhesión, incluidas las moléculas de adhesión intercelular ($ICAM-1$), la molécula de adhesión celular plaqueta-endotelio ($PECAM-1$) y la molécula de adhesión de leucocitos-endotelio ($ELAM-1$). Esto hace que los neutrófilos se unan a las células endoteliales y migren hacia el parénquima cerebral, donde se internan, al igual que macrófagos y monocitos, inducidos por la producción de quemoquinas, entre las que se encuentran la $IL-8$ y la $MPC-1$ (proteína 1 quimioatrayente de monocitos) producidas

por el daño de células cerebrales. En este proceso también colaboran moléculas como las integrinas y las selectinas. Una vez los neutrófilos penetran en el cerebro se convierten en una amenaza para las células del parénquima cerebral ya que liberan radicales libres y enzimas proteolíticas. (Krupinski J. y cols. 2007).

Se ha demostrado que la proteína quinasa C desempeña un papel significativo en la adherencia, degranulación, y generación de radicales superóxido por el neutrófilo. En los ratones que son deficientes para la proteína quinasa C ha disminuido el volumen del territorio infartado cuando son sometidos a una isquemia cerebral transitoria. (Chou W. y cols., 2004; Huang y cols., 2006).

1.3.7.1. EICOSANOIDES

Entre los fenómenos que acontecen en un proceso inflamatorio, los eicosanoides juegan un papel fundamental. Esta denominación engloba a un conjunto de sustancias (prostaglandinas, tromboxanos, prostaciclina, leucotrienos, isoprostanos, lipoxinas, etc...), sintetizadas a partir de ácidos grasos poliinsaturados esenciales de 20 átomos de carbono que contienen 3,4 o 5 enlaces dobles: ácido 8, 11, 14-eicosatrienoico (ácido dihomo- δ -linolénico), ácido 5,8,11,14-eicosatetranoico (ácido araquidónico) y ácido 5,8,11,14,17-eicosapentaenoico (Esplugues J.V., 2008).

El ácido araquidónico es el precursor más abundante en el ser humano y se ingiere con la dieta o deriva del metabolismo del ácido linoleico. Se almacena formando parte de los fosfolípidos de la membrana celular y se libera mediante la acción de la fosfolipasa $A_{2\alpha}$ ($PLA_{2\alpha}$), de la cual se han identificado diversas isoformas con propiedades, localizaciones, funciones o requerimientos diferentes: citosólica ($cPLA_{2\alpha}$), secretora ($sPLA_{2\alpha}$), independiente de calcio (Ca^{2+} -independent $PLA_{2\alpha}$ o $iPLA_{2\alpha}$). También puede ser liberado por la acción de la fosfolipasa C y digliceridolipasa, esta vía no es sensible a los corticoides y sus detalles e importancia son poco conocidos.

Tras ser movilizado, el ácido araquidónico es rápidamente oxigenado por cuatro sistemas: a) la ciclooxigenasa (COX) 1 y 2, de cuya actuación proceden las prostaglandinas (PG) y los prostanoides, término que engloba los tromboxanos (TX) y la prostaciclina (PGI_2); b) las diversas lipooxigenasas (LOX) que median la producción,

entre otras sustancias, de los leucotrienos (LT) y las lipoxinas; c) el citocromo P450, que origina los denominados productos de la vía de la epooxigenasa o epóxidos, y d) la vía del isoprostano. Con la excepción de los derivados de la vía de la epooxigenasa, los eicosanoides no se almacenan y son sintetizados de forma inmediata en la mayoría de las estructuras biológicas como respuesta a estímulos de naturaleza variada, ejerciendo acciones muy localizadas de gran potencia y variedad.

Las prostaglandinas, los tromboxanos y las prostaciclina están formadas por un anillo ciclopentano y dos cadenas laterales. La estructura del anillo, con diversas sustituciones, es designada por las letras mayúsculas A, B, C, etc.; la posición del OH en el carbono 9 da origen a dos formas: α y β . Los subíndices 1, 2, y 3 señalan el número de enlaces dobles en las cadenas laterales e identifica el ácido graso precursor. Los leucotrienos son sustancias que carecen de anillo.

Vía de la ciclooxigenasa

La COX, también denominada PGH sintasa, se encuentra en la mayoría de las células de los mamíferos y fue la primera enzima microsómica descrita con capacidad de actuar sobre el ácido araquidónico libre. Se han descrito dos isoformas, la COX-1 y la COX-2.

La COX-1 es una enzima constitutiva encargada de la síntesis de PG implicadas en la homeostasis general y, en consecuencia, está expresada en la mayoría de los tejidos, si bien los niveles de dicha expresión pueden variar entre los distintos tipos celulares. Los valores de esta enzima se mantienen constantes dentro de una misma población celular, aunque pueden aparecer pequeños incrementos (de dos a cuatro veces) por estímulos hormonales o factores de crecimiento.

Originalmente se pensó que la COX-2 estaba localizada en células inflamatorias e inmunológicas, donde su presencia se inducía en respuesta a citocinas, endotoxinas, factores de crecimiento, etc. Y era responsable de la producción de prostanoídes durante la inflamación y el cáncer. Se comprobó que era una enzima que limita la síntesis de prostaglandinas, y que era rápidamente inducida por citoquinas proinflamatorias *in vitro*. También ha sido demostrada su mediación en la inducción de la síntesis de prostaglandinas durante la respuesta inflamatoria *in vivo* (Willoughby D.A., 2000).

Introducción

Sin embargo, cada día existen más ejemplos de una expresión constitutiva de la COX-2 en diversos tejidos.

La COX tiene una acción doble sobre el ácido araquidónico. Primero se encarga de su ciclación y oxigenación, formando la PGG₂, y después reduce la misma originando la PGH₂. Ambas PG son denominadas de forma genérica endoperóxidos intermedios y, aunque químicamente inestables (semivida de 5 min.), poseen una intensa actividad biológica. La mayoría de los tejidos son capaces de sintetizarlos, pero su abundancia relativa o la presencia de uno o de varios de sus derivados está determinada por la dotación enzimática particular existente en la célula. A partir de la PGH₂ las endoperóxido isomerasas sintetizan PGE₂ y PGD₂, mientras que por reducción se origina PGF_{2α}.

Los eicosanoides son liberados en respuesta a múltiples estímulos agresivos y en su mayoría contribuyen a los síntomas de la inflamación. Tanto los derivados de la vía de la ciclooxigenasa (COX), fundamentalmente las PG de tipo E y la prostaciclina (PGI₂), como algunos de la vía de la lipooxigenasa (LOX), como el LTB₄, LTD₄ y LTE₄, favorecen la vasodilatación aguda, incrementan la permeabilidad vascular y la subsiguiente infiltración de leucocitos y células fagocíticas.

Prostaglandina E₂ es la prostaglandina predominante en el cerebro de rata y la más utilizada como marcador de la actividad COX en neuronas (especialmente en la corteza) (Bishai & Cocean, 1992). La PGE₂ se consideró como el principal eicosanoide en la respuesta inflamatoria (Murata T. y cols., 1997; Portanova J.P., 1996).

En ratones, la COX-1 y COX-2 tienen un distinto papel en la biosíntesis cerebral de prostaglandinas, con una producción de prostaglandinas fundamentalmente relacionada con COX-2 y una producción de tromboxano asociada a COX-1. (Sang-Ho Choi y cols., 2006)

Frente a estas acciones claramente proinflamatorias, cabe destacar las acciones antiinflamatorias de algunas prostaglandinas del tipo E (inhibición de la producción de interleucina 1 y de la formación de leucotrienos y radicales superóxido) y de las lipoxinas que, liberadas en un proceso inflamatorio, actúan inhibiendo la quimiotaxis y adhesión al endotelio.

La mayoría de las PG, así como las lipoxinas ejercen importantes acciones vasodilatadores sin modificar mucho el funcionalismo cardíaco. En cuanto al posible papel desarrollado por estas sustancias en el inicio o en la evolución de los procesos isquémicos cerebrales, muchos son los datos que se han ido apuntando en este sentido.

Los importantes incrementos en los niveles de prostaglandina E_2 en el área de peri-infarto han sido demostrados después de 24 h de isquemia cerebral. La producción de prostaglandina así como la expresión de COX 2 en tejidos isquémicos en ratas dependió del grado y duración de la reducción del flujo cerebral de sangre (Chiaki Yokota y cols., 2004).

Diversos estudios que utilizaban diferentes modelos de isquemia en roedores sugirieron que COX-2 desempeña un importante papel en el desarrollo del daño isquémico (Collaco-Moraes Y. y cols., 1996; Hara K. y cols., 1998; Nogawa S. y cols., 1997).

Un proceso isquémico cerebral global transitorio (5 min) en jerbos da como resultado un incremento bifásico de la actividad COX, que incluye un temprano incremento de la actividad COX-1 con la consiguiente producción de PGE_2 y una posterior elevación de la actividad COX-2. El aumento de la actividad COX-2 y la producción tardía de PGE_2 preceden al inicio de los cambios morfológicos en el área hipocampal más vulnerable, el sector CA1. El aumento tardío de la actividad COX-2 está relacionada en el daño tardío sobre la homeostasia del sistema de glutation y el daño oxidativo en el hipocampo y relaciona la actividad inducible de la COX-2 a la neurodegeneración que sigue a un proceso de isquemia cerebral global (Candelario-Jalil y cols., 2003).

1.3.7.2. CITOCINAS

Se denominan interleukinas a los autacoides de carácter polipeptídico que desempeñan un papel en la respuesta inmunológica, la reacción inflamatoria y la hematopoyesis (Morcillo E., 2008). El origen celular de las interleukinas es muy diverso. Las producidas por los linfocitos T y monocitos activados por estimulación antigénica se denominan linfocinas y monocinas, respectivamente. La complejidad de

Introducción

sus acciones intercelulares sobre los diversos tipos de leucocitos -y no sólo de linfocitos y monocitos- justifica la denominación de interleukinas. El hallazgo de que algunas de ellas son producidas por otros tipos celulares y pueden actuar sobre ellos (células endoteliales y epiteliales, fibroblastos, astrocitos, etc.), ha conducido a la denominación más genérica de citocinas.

Se trata de hormonas locales genuinas (sistema auto/paracrino), aunque algunas tienen además una función endocrina. Se han descrito más de 50 citocinas con escasa relación estructural entre ellas, aunque por lo general son moléculas monocatenarias de 8 a 25kD. Algunas citocinas son glucoproteínas cuyo tamaño molecular no excede los 80kD. No están preformadas (es decir, no se expresan de forma constitutiva), sino que su síntesis se induce en respuesta a estímulos activadores, se liberan y actúan sobre receptores específicos de membrana celular, cuya expresión es también a veces un fenómeno transitorio de up-regulation. Las citocinas ejercen su actividad de un modo secuencial, coordinado y están sometidas a una compleja interregulación destinada a mantener la homeostasia de procesos de proliferación, diferenciación y reparación celulares. Están muy implicadas en el proceso isquémico, se demostró que algunas de ellas contribuían al daño cerebral ocasionado por el infarto (Gong y cols., 1998).

Durante el proceso isquémico, las citoquinas, como la IL-1, IL-6 y TNF- α son producidas por monocitos activados, pero también por una gran variedad de otros tipos celulares activados como células endoteliales, microglia, neuronas, plaquetas, leucocitos, y fibroblastos (Huang y cols., 2006).

La IL-1 tiene una gran diversidad de funciones biológicas, como sugiere el hecho de que la mayoría de células de nuestro organismo puede expresar receptores para esta citocina. Así, la IL-1 es primordial en la respuesta inmunitaria (mitógeno de linfocitos T y B) e inflamatoria, tanto local (promueve la síntesis de mediadores lipídicos, óxido nítrico y otras citocinas, y de moléculas de adhesión leucocitaria) como sistémica (estimula la síntesis de proteínas de fase aguda, causa neutrofilia y fiebre). El aumento de selectinas, ICAM-1, ICAM-2, y VCAM-1 en células endoteliales cerebrales y la inducción de estas moléculas de adherencia se puede explicar porque los niveles de IL-1 están elevados después de la isquemia y aumenta la infiltración neutrofílica (Yamasaki y cols., 1997 y Huang y cols., 2006).

Del factor de necrosis tumoral (TNF) existen dos formas, α y β denominándose a esta última como linfotóxina, produce prostanoídes, citocinas y moléculas de adhesión en células endoteliales, es quimiotáctico de neutrófilos y macrófagos, y activa fibroblastos. La IL-1 actúa a modo sinérgico con TNF- α .

TNF- α se ha mostrado como una molécula neurodegeneradora, ya que niveles elevados en pacientes con isquemia cerebral se asocian con una mayor gravedad de la neuropatía isquémica (Krupinski J. y cols. 2007). La administración de anticuerpo anti-TNF α reduce el daño cerebral después de una isquemia focal en ratas y así, TNF α se postula como una esperanzadora diana en la terapia en el infarto cerebral (Kristian P.D. y cols., 2008).

La IL-6 (19-30 kD) es un mediador inflamatorio que funciona también como hormona circulante (pirógeno y proteínas de fase aguda) y está implicada en la proliferación y diferenciación de linfocitos T y B, así como en la hematopoyesis. La actividad biológica de IL-6 se solapa con los de IL-1, y datos de estudios en humanos sugieren un papel proinflamatorio para IL-6 en el infarto, pero, sin embargo, IL-6 también tiene propiedades antiinflamatorias debido a su capacidad de inducir la síntesis de antagonistas del receptor IL-1. Así, es confuso si el efecto total de IL-6 es beneficioso o perjudicial en el contexto del infarto (Kristian P.D. y cols., 2008).

Algunas interleukinas tienen un carácter inhibitorio; así, la IL-10 inhibe la producción de varias citocinas (IL-1, IL-6, TNF- α , IFN- γ) y la expansión clonal de linfocitos T, también la IL-11 posee actividad antiinflamatoria.

La IL-10 es principalmente liberada por linfocitos y monocitos/macrófagos. Se han demostrado aumentos transitorios de concentración de IL-10 tanto en el plasma como en líquido cefalorraquídeo de pacientes con infarto cerebral agudo, sin embargo los niveles bajos de IL-10 aumentaron el riesgo de sufrir esta patología y se asociaron con el empeoramiento temprano de los síntomas neurológicos en el infarto isquémico agudo. Éstos estudios sugieren un efecto neuroprotector de la IL-10 (Jun Oto y cols., 2008).

1.4. PLANTEAMIENTO TERAPÉUTICO EN LA ENFERMEDAD CEREBROVASCULAR

En el abordaje terapéutico de esta patología es fundamental resaltar distintos aspectos: prevención primaria, prevención secundaria y tratamiento del ictus en la fase aguda. La muerte celular tras un infarto es resultado de la compleja interacción de excitotoxicidad, acidosis, inflamación, estrés oxidativo, despolarización de la zona de peri-infarto y necrosis/apoptosis. Sobre la base de la complejidad de acontecimientos en la isquemia cerebral y los resultados decepcionantes en los estudios con un sólo agente, es poco realista esperar que una medicina -monoterapia- demuestre un efecto neuroprotector en el infarto en humanos. Es probable que la terapia del infarto requiera un acercamiento combinado de varias sustancias (Kristian P.D. y cols., 2008).

1.4.1. PREVENCIÓN

La identificación y actuación sobre los factores de riesgo modificables como la diabetes mellitus, hipertensión arterial, dislipemia, obesidad, inactividad física y el consumo de tabaco son esenciales como medida de actuación.

1.4.1.1. PREVENCIÓN PRIMARIA DEL ICTUS ISQUÉMICO

La prevención se basa en la identificación de individuos con factores de riesgo para sufrir un ictus ya que la actuación sobre los mismos revierte indudablemente en un beneficio. Un manejo óptimo de los factores de riesgo es crucial para reducir el primer ictus, los ictus recurrentes y cualquier evento o muerte de origen cerebrovascular.

También existe la posibilidad de emplear antiagregantes, pero en contraste con la demostrada eficacia del ácido acetilsalicílico (AAS) en prevención secundaria, en los pacientes de bajo riesgo sin historia de enfermedad cardiovascular (prevención primaria), la evidencia no es tan clara.

1.4.1.2. PREVENCIÓN SECUNDARIA DEL ICTUS ISQUÉMICO

La prevención secundaria va dirigida a prevenir la recurrencia en pacientes que ya han sufrido algún evento cerebrovascular agudo. Las estrategias son: incidir sobre los factores de riesgo, terapia antitrombótica (antiagregantes -AAS, clopidogrel, AAS combinado con dipiridamol de liberación retardada- y anticoagulantes orales), anticolesterolémicos y tratamiento quirúrgico eventual (en la actualidad se circunscribe a la angioplastia carotídea, con o sin prótesis intraarterial -stent-).

1.4.2. TRATAMIENTO

1.4.2.1. TRATAMIENTO DEL ICTUS ISQUÉMICO EN FASE AGUDA

En las dos últimas décadas, el abordaje del ictus en la fase aguda ha sufrido un cambio radical pasando de cierto abstencionismo diagnóstico y terapéutico a considerarla emergencia médica. Ésto se ha debido al progreso en el conocimiento de la fisiopatología del ictus.

Teniendo en cuenta la fisiopatología del ictus se pueden derivar tres posibles estrategias en el tratamiento orientadas a minimizar las consecuencias del accidente cerebrovascular isquémico:

- 1) Incrementar las reservas energéticas de las células (tratamiento profiláctico exclusivamente).
- 2) Minimizar el daño restableciendo la perfusión lo antes posible mediante terapias trombolíticas.
- 3) Neuroprotección propiamente dicha.

En el ictus, existe un volumen de tejido donde la magnitud de la isquemia no es tan intensa, penumbra isquémica, lo que nos permite un breve margen de acción llamado ventana terapéutica, para poder recuperarlo (Martín González, 1999). Durante la ventana terapéutica, la restauración temprana (tres primeras horas tras el ictus) de la reperusión del área afectada mediante la terapia trombolítica con el activador tisular del

Introducción

plasminógeno recombinante (rt-PA), ha demostrado ser una terapia farmacológica efectiva tanto en modelos animales como en ensayos clínicos (NINDS rt-PA stroke study group, 1995), y la única aprobada por la U.S. Food and Drug Administration, para su uso en clínica. En estudios recientes se ha demostrado una igual efectividad de la terapia trombolítica con este producto tras administrarlo incluso 4,5 horas posteriores a la instauración del episodio isquémico (Matijevic V y cols, 2012). En algunas comunidades españolas, se ha implantado el sistema “Código Ictus” que es un procedimiento de actuación prehospitalaria basado en el reconocimiento precoz de los síntomas y signos de un ACV de posible naturaleza isquémica, con la consiguiente priorización de los cuidados y traslado inmediato a un centro hospitalario capacitado, de aquellos pacientes candidatos a beneficiarse de una terapia de reperfusión mediante fibrinólisis con rt-PA (Molina T y cols, 2011).

Además de esta restauración del flujo, se hace necesario el uso de los neuroprotectores, ya que cabe la posibilidad de modificar la cadena de acontecimientos que determinan la muerte celular naciendo el término neuroprotección.

Neuroprotección

La neuroprotección significa aumentar la tolerancia de las neuronas y la glía, evitando su destrucción o necrosis y favoreciendo su recuperación. En los pacientes con isquemia cerebral mejoran el metabolismo celular como consecuencia de la isquemia y evitan o retardan su conversión en tejido infartado o necrótico.

Se han estudiado muchos neuroprotectores y aunque gran parte de estas sustancias evidencian efectos terapéuticos en estudios preclínicos con modelos de isquemia (ratas, ratones, o conejos), no ocurre lo mismo para los estudios clínicos. Las causas probables por las cuales esto sucede son variadas: la elección del modelo animal específico donde se planea evaluar el agente farmacológico, la ventana terapéutica y la dosis empleada.

Una de las mayores dificultades a las que se enfrenta el desarrollo de un neurofármaco para su aplicación es que llegue al SNC, es decir, que sea permeable a la barrera hematoencefálica (BHE). Una estrategia lógica para encontrar una solución a esta dificultad pudiera ser el uso de las mismas moléculas que el cerebro utiliza ante diferentes injurias con el objetivo de mantener la homeostasis (Dirnagl y cols., 2003;

García Salman, 2004). Otra posible estrategia podría ser sintetizar sustancias de análogo parecido estructural con moléculas de nuestro organismo que sí que atreviesen la BHE.

Es importante que se utilicen a nivel experimental combinaciones de sustancias neuroprotectoras, aunque no hayan demostrado eficacia clínica por separado, ya que la complejidad del proceso de la isquemia cerebral reduce sensiblemente las posibilidades de éxito en solitario (Fisher, 1999; Ginsberg, 2008).

Para un futuro próximo no sólo puede precisarse de la combinación de sustancias neuroprotectoras, sino de su asociación con fibrinolíticos, al objeto de optimizar su eficacia y permitir una mayor acción del efecto neuroprotector en el tejido recanalizado, reduciendo el posible daño por reperfusión y posiblemente, ampliando en el tiempo la ventana terapéutica.

▪ *Neuroprotección endógena*

En la isquemia también se activan mecanismos endógenos protectores (García Salman, 2004; Dirnagl y cols., 2003). Hace más de una década se descubrió el preconditionamiento isquémico que se define como el efecto protector frente a la isquemia de larga duración experimentado por el cerebro si previamente ha sido sometido a cortos períodos de isquemia, constituyendo dicho fenómeno un mecanismo neuroprotector en sí mismo. Otros estímulos, como la hipoxia y la depresión propagada cortical, provocan respuestas similares. Todos tienen en común la inducción selectiva de genes específicos que actúan de forma concertada para incrementar el potencial de supervivencia de las células nerviosas y promover la recuperación funcional. La administración de algunos de estos genes o de las proteínas que codifican, entre las que se destacan los factores neurotróficos, ha permitido la obtención de resultados interesantes en modelos experimentales de isquemia global y focal que se relacionan, sobre todo, con la inhibición de la apoptosis neuronal inducida por la isquemia.

Esta protección incompleta sugiere que hay otros mecanismos que también juegan un papel esencial en el preconditionamiento de la isquemia, tales como antiexcitatorios, antiinflamatorios, antiapoptóticos y programas de regeneración y reparación celular (Dirnagl y cols., 2003).

Introducción

En los últimos años se ha progresado de forma importante en el conocimiento de sustancias que actúan en diferentes puntos de la cascada que conllevan a la muerte por necrosis o por apoptosis y que interfieren con estos procesos prolongando la vida de la neurona (Cardona-Gómez y cols., 2004; García-Galloway y cols., 2003). Estos compuestos parecen prometedores como neuroprotectores y son el objeto de estudio en animales de experimentación y ensayos clínicos en el humano (Arango-Dávila y cols., 2004).

▪ *Neuroprotección primaria*

La neuroprotección primaria se produce cuando se utiliza un fármaco que incrementa la resistencia de la neurona al daño isquémico, hipóxico, excitotóxico o metabólico. A este nivel se han postulado el uso de diversas sustancias como los antagonistas de receptores NMDA de glutamato, moduladores de la activación del receptor NMDA, inhibidores de la liberación presináptica de glutamato, agonistas GABA, antagonistas de canales de calcio y de sodio.

▪ *Neuroprotección secundaria*

La neuroprotección secundaria se refiere a la intervención farmacológica que interfiere con los procesos patogénicos que se desencadenan después de que se haya instaurado la lesión isquémica, hipóxica, excitotóxica o metabólica. Estos procesos más tardíos son responsables de la muerte neuronal de forma necrótica o apoptótica. En este grupo, se incluyen sustancias que pueden disminuir la muerte necrótica tardía como los fármacos antioxidantes que constituyen un grupo farmacológico especial que engloban aquellas sustancias que intentan impedir la acción perjudicial del oxígeno fruto de la reoxigenación, actuando en distintos niveles de producción-efecto de los radicales libres. Entre ellas encontramos aquellas que actúan sobre los radicales libres, ya sea impidiendo su formación, acelerando su destrucción o impidiendo sus acciones. También a este nivel secundario encontramos a los fármacos antiinflamatorios, sustancias moduladoras de la respuesta inflamatoria y sustancias que actúan sobre mecanismos de apoptosis.

▪ *Neuroprotección terciaria*

La neuroprotección terciaria se dirige a potenciar la capacidad de recuperación del tejido nervioso previamente lesionado y disminuir la hipoperfusión e hipofunción en áreas distantes (diasquisis). En este aspecto se han contemplado algunas sustancias como los reparadores de la membrana plasmática, factores neurotróficos y las anfetaminas.

1.5. DIETA MEDITERRÁNEA: ACEITE DE OLIVA

La dieta mediterránea (DM) lleva despertando un gran interés en los investigadores en las últimas dos décadas debido a su asociación a un mayor longevidad, a una baja incidencia de enfermedad cardiovascular, cáncer, y deterioro cognitivo. Esta dieta se caracteriza por la ingesta de alimentos como el pescado, las frutas, los cereales, el consumo moderado de vino y el aceite de oliva (AO).

El aceite de oliva constituye la principal fuente de aporte de grasas de la dieta Mediterránea, destacando su valor nutritivo y su alto contenido vitamínico. Entre sus numerosos compuestos, destacan tres por sus efectos beneficiosos sobre la salud de las personas; el ácido oleico, el escualeno y los compuestos fenólicos (Owen y cols., 2000).

1.5.1. ÁCIDO OLEÍCO

Las propiedades beneficiosas del aceite de oliva se han atribuido inicialmente a su contenido en ácidos grasos monoinsaturados (MUFA) cuyo máximo exponente, el ácido oleico, presenta propiedades cardiosaludables al disminuir la concentración de colesterol LDL en sangre y la oxidabilidad de lipoproteínas de baja densidad, comparado con las grasas saturadas (Visser y cols. 2001).

El ácido oleico constituye el 70% del aceite de oliva y al ser monoinsaturado presenta sólo un doble enlace, lo que lo hace menos susceptible a la oxidación y contribuye a la acción antioxidante, alta estabilidad y mayor vida útil del aceite de oliva, frente a los ácidos grasos poliinsaturados.

Se ha demostrado que el ácido oleico juega un papel en la prevención del cáncer (Giacosa y cols. 2013). Si esto es un efecto secundario de los ácidos grasos en la estabilidad del aceite o un efecto anticancerígeno directo, sigue siendo discutible. Los datos relativos a los beneficios en la salud del ácido oleico son contradictorios. La preferencia hacia la última teoría se basa en el hecho de que, aunque se encuentra en alta concentración en el aceite de oliva, también se encuentra en niveles relativamente altos en los productos alimenticios que forman una parte importante de las dietas de países no mediterráneos. Por ejemplo, carne de res y aves de corral contienen de un 30-45% de ácido oleico, mientras que los aceites como la palma, cacahuete, soja y girasol contienen un 25-50%. Sin embargo, estos países no tienen la baja incidencia de enfermedad cardiovascular y de ciertos tipos de cáncer.

1.5.2. ESCUALENO

El escualeno es un hidrocarburo triterpénico, importante intermediario en la biosíntesis de colesterol. Se encuentra en plantas y animales pero las cantidades pueden llegar a ser muy diferentes. Mientras que el aceite de oliva está compuesto de aproximadamente un 0,7% de escualeno, otros alimentos y aceites suelen estar en el rango de 0,002-0,03% (Waterman y cols. 2007).

1.5.3. COMPONENTES FENÓLICOS

Existen investigaciones que han demostrado que estos compuestos poseen propiedades antioxidantes, citoprotectoras, antiinflamatorias, antiaterogénicas así como anticancerígenas (Suárez y cols., 2011; Ruano y cols., 2005). La publicación del proyecto EUROLIVE ha puesto de relieve que el incremento de los niveles de colesterol HDL y la disminución de los niveles de colesterol LDL tras el consumo de aceite de oliva virgen se relacionaba de forma directa con su contenido en compuestos fenólicos. Hoy día se considera el aceite más saludable frente al resto de aceites vegetales, por la presencia de estos compuestos fenólicos (Visser y cols. 2001).

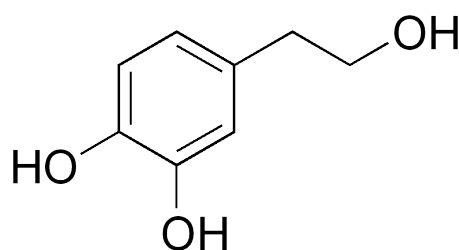
Los compuestos fenólicos que destacan y se encuentran en mayor cantidad son: el glucósido oleuropeína, tirosol e hidroxitirosol. Los tres compuestos son muy

parecidos estructuralmente. De hecho, tirosol e hidroxitirosol son idénticos excepto que hidroxitirosol posee un grupo hidroxilo extra en posición meta. Oleuropeína es un éster de hidroxitirosol y ácido elenólico. La oleuropeína es el más abundante en la aceituna mientras que hidroxitirosol es el más abundante en el aceite de oliva. (Amito y cols., 1996). A medida que la aceituna madura decrece el contenido de oleuropeína y aumenta el de hidroxitirosol, producto de la hidrólisis de la oleuropeína (Cimato y cols., 1990; Ryan y cols., 1999).

1.5.3.1. HIDROXITIRO SOL

El hidroxitirosol (HT) es un polifenol fitoquímico procedente de la hidrólisis de la oleuropeína. En su forma pura es un líquido transparente e inodoro. En la naturaleza se encuentra presente en el olivo, concentrándose principalmente en las hojas, y en cantidades pequeñas y variables de un aceite a otro. El HT se encuentra en el aceite de oliva virgen extra bien en forma libre o en forma de éster, contribuyendo en un 70 - 80% a la fracción fenólica total.

Químicamente el HT es un orto-difenol. Su fórmula molecular es $C_8H_{10}O_3$, y su peso molecular es 154,166 g/mol.



3,4-dihidroxifeniletanol

La principal actividad del HT se basa en sus propiedades antioxidantes así como aditivo alimentario para estabilizar alimentos funcionales ricos en los ácidos grasos poliinsaturados ω -3.

HT ha demostrado un gran número de propiedades beneficiosas para la salud, entre ellas:

- Se ha demostrado que reduce el riesgo de aterosclerosis y enfermedad coronaria (Grignaffini y cols., 1994; Salami y cols., 1995).

- Es un importante barredor de radicales libres, posee efecto quelante sobre el catión hierro, hecho que previene la formación de especies reactivas de oxígeno como es el radical hidroxilo, mucho más reactivas (Covas, 2007). HT y oleuropeína muestran mayor protección antioxidante frente al daño por hipoclorito y mayor capacidad de eliminación del anión superóxido *in vitro*. Además el HT *in vitro* muestra una mayor potencia antioxidante que la vitamina E, al ataque por radicales hidroxilos sobre el ácido salicílico (De la Fuente y cols. 2004). Los resultados de estos estudios han sido confirmados por otros *in vivo* (en humanos y ratas) al determinar la secreción urinaria de la 8-ISO-PGF2 α , un marcador biológico de estrés oxidativo (Pérez-Jiménez y cols. 2012).
- Previene la oxidación de lipoproteínas de baja densidad (Fito y cols. 2007). Se cree que HT además ejerce dicho efecto por otros mecanismos adicionales, inhibiendo o frenando la vía inflamatoria (Bitler y cols. 2005).
- Por otra parte HT no solo participa en las fases iniciales del proceso aterogénico, sino también en sus consecuencias, fundamentalmente en el proceso trombótico. Se ha demostrado que inhibe la agregación plaquetaria por inhibición del Tromboxano B₂, debido a una inhibición de la enzima ciclooxigenasa y por un aumento en la vida media del óxido nítrico (González-Correa y cols. 2008; 2009).
- Se ha comprobado que HT presenta efecto anticancerígeno, atenuando la proliferación de células en cultivos celulares humanos de adenocarcinoma colo-rectal, un efecto presumiblemente relacionado con su actividad antiinflamatoria (Terzuoli y cols.2010).
- Se han identificado propiedades antimicrobianas atribuidas al HT, acetato de hidroxitirosilo y oleuropeína en infecciones de tracto respiratorio e intestinal. (Waterman y cols. 2007)
- HT y acetato de hidroxitirosol presentan propiedades neuroprotectoras, demostrado en experimentos *in vitro* y *ex vivo*, este último tras administración oral en ratas y en ambos casos, tras someter el tejido a un proceso de hipoxia-reoxigenación. (González-Correa y cols., 2007, 2008; Cabrerizo y cols., 2013).
- HT ha mostrado un efecto citoprotector (Schaffer y cols., 2007, 2010) en experimentos *in vitro* y *ex vivo* en cultivos celulares PC12 y células

cerebrales de ratones tras administración oral subcrónica. Se identificó la importancia de las propiedades antioxidantes de esta sustancia en el efecto neuroprotector mostrado.

- También se ha identificado el efecto beneficioso de hidroxitirosol y tirosol en patologías neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer, a través de su exposición conjunta con un inductor tóxico A β en cultivos celulares de neuroblastoma N2, en los que provocan una disminución de la muerte celular mediante la atenuación de la traslocación del factor nuclear NF- κ B. (St-Laurent-Thibault y cols.2011)

Cabe destacar la ausencia de toxicidad que se ha observado en los datos científicos disponibles, incluso a altas concentraciones, tanto *in vitro* como *in vivo*. (Granados-Principal y cols. 2010).

2. OBJETIVOS

Entre los mecanismos inductores del daño vascular, y por tanto de la disfunción endotelial, y las enfermedades asociadas a ésta, se encuentra la diabetes y el estrés oxidativo (Esteller, 2005; Cachofeiro et al., 2006).

El endotelio es el principal órgano antitrombótico en el ser humano y es el principal regulador del flujo sanguíneo del tejido, a través de la liberación de sustancias antiagregantes, sustancias anticoagulantes, y estimuladores de la fibrinólisis (Lorenzi and Cagliero, 1991). Estas funciones se deterioran en la Diabetes Mellitus, y numerosos estudios han constatado la creciente activación plaquetaria en la fase de la coagulación, con una actividad fibrinolítica deficiente (Ferris y cols., 1999; De Vriese y cols., 2000; Chakrabarti y cols., 2000; Lorenzi and Cagliero, 1991; Stehouwer and Schaper, 1996). También, se ha demostrado que en la diabetes se produce una disminución de la síntesis y funcionalidad de la prostaciclina (De La Cruz y cols., 1997; De La Cruz y cols., 2001), y un aumento en actividad del iNOS (Bardell and MacLeod, 2001).

Estos cambios tienden a favorecer un estado protrombótico en los pacientes diabéticos, situación que conlleva un aumento en la incidencia de accidentes trombóticos (Clements and Bell, 1985).

Por otra parte, es conocido que el incremento del estrés oxidativo es un fenómeno primordial en la patogénesis del daño endotelial en las personas que padecen Diabetes Mellitus (Halliwell y cols., 2004). Este estrés oxidativo está producido por la hiperglucemia crónica, que conlleva una sobreproducción de especies reactivas de oxígeno debido a la formación de productos finales de la glicación (AGEs) y a una hiperactividad del complejo aldosa reductasa-proteína quinasa C.

Así, la confluencia de estos factores, la disfunción endotelial, la producción creciente de radicales libres (Wolff and Dean, 1987) y el incremento de la agregación plaquetaria (De La Cruz y cols., 1997; De La Cruz y cols., 2001; Moreno y cols., 1995), conlleva a un estado vascular que favorece una reducción del flujo sanguíneo tisular y una tendencia a la formación de trombos vasculares (De Vriese y cols., 2000; Moncada y cols., 1990).

Objetivos

Diversos estudios experimentales han demostrado que los cambios bioquímicos responsables del daño cerebral tras un infarto se ven aumentados en animales diabéticos. También se ha demostrado como el tejido cerebral de rata diabética es más susceptible al daño que el de no diabéticas (González y cols, 2006), así como la transmisión sináptica fue menor en animales diabéticos que en no diabéticos (Tekkok S y cols, 1998).

Por otro lado, la reperfusión post-isquémica produce un gran incremento de radicales libres, que es mayor en los animales diabéticos frente a los no diabéticos, lo que implica un aumento del estrés oxidativo y también nitrosativo, debido a que se produce un incremento del NO por la activación de la iNOS lo que proporciona un ambiente ideal para la formación de los radicales peroxinitritos. Además la iNOS va a facilitar la liberación de mediadores inflamatorios como la interleucina 1β y el factor de necrosis tumoral α (TNF α) (Cosenzi y cols., 2002; Ellis y cols., 2002), contribuyendo al daño inflamatorio. Con respecto a estas sustancias, se ha demostrado que la expresión del iNOS y el contenido en radicales libres están elevados en las arterias de ratas diabéticas (Bardell and MacLeod, 2001; Wolff and Dean, 1987).

Entre las terapias farmacológicas, el empleo de antioxidantes es de gran importancia. Numerosos estudios han reportado los beneficios del aceite de oliva virgen, y de sus polifenoles, entre los que destaca el hidroxitirosol (Covas, 2007).

Hidroxitirosol ha demostrado ejercer acción sobre dos pilares en el desarrollo y evolución del ictus. Respecto a la función plaquetaria ha demostrado:

- En primer lugar, su capacidad antioxidante, lo cual explicaría el efecto demostrado del aceite de oliva sobre procesos oxidativos, tales como la oxidación de la LDL (Fitó y cols., 2007) o el propio estrés oxidativo tisular (González-Correa y cols., 2007).
- Por otra parte se ha descrito un efecto antiinflamatorio de estos polifenoles, hecho fundamental en la génesis y evolución de la aterogénesis, considerada como una enfermedad inflamatoria vascular (Bitler y cols, 2005).
- Asimismo se ha descrito que hidroxitirosol presenta un efecto antiagregante plaquetario en plaquetas aisladas y lavadas (Petroni y cols, 1995; Dell'Agli y cols.,

2008). También se ha demostrado que hidroxitirosol y acetato de hidroxitirosilo presentan un efecto antiagregante plaquetario en sangre total humana (González-Correa y cols. 2008).

Estos mecanismos son comunes a las vías bioquímicas de daño tisular como consecuencia del proceso isquémico que la enfermedad cardiovascular origina. Así, está reconocida la participación del estrés oxidativo, la síntesis de eicosanoides y prostaglandinas o el acúmulo de óxido nítrico y mediadores inflamatorios en el proceso de daño/muerte celular en los tejidos afectados por la isquemia trombótica. Es decir, aquellas vías que son modificadas por la administración de aceite de oliva virgen o por hidroxitirosol.

Respecto al posible efecto neuroprotector, se ha demostrado que la administración de aceite de oliva virgen y de hidroxitirosol a animales de experimentación tras un proceso de isquemia-reoxigenación ejerce un efecto preventivo sobre la muerte neuronal (González-Correa y cols., 2007, 2008; Cabrerizo y cols., 2013).

También se ha demostrado este efecto neuroprotector en animales diabéticos tratados con aceite de oliva. Así como una disminución de los parámetros referentes al estrés oxidativo/nitrosativo y al acúmulo de mediadores inflamatorios en animales diabéticos tratados con aceite de oliva virgen (González-Correa y cols., 2007).

Demstrado este efecto neuroprotector con hidroxitirosol en animales sanos, nos planteamos como hipótesis de trabajo si esta molécula presentará un efecto neuroprotector en ratas diabéticas, con un daño endotelial y estado proinflamatorio mayor, tras un proceso de hipoxia-reoxigenación respecto a ratas diabéticas no tratadas con este polifenol.

OBJETIVO PRINCIPAL:

1. Valorar el efecto neuroprotector de hidroxitirosol en un modelo experimental de hipoxia-reoxigenación en tejido cerebral de ratas estreptozotocin-diabéticas.

OBJETIVOS SECUNDARIOS:

2. Cuantificar el efecto neuroprotector del hidroxitirosol a diferentes dosis.
3. Evaluar la posible relación entre el efecto neuroprotector y su acción sobre el estrés oxidativo/nitrosidativo cerebral y los mediadores inflamatorios.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. TIPO DE ESTUDIO

Realizamos un estudio experimental *ex vivo* en tejido cerebral de ratas estreptotocin-diabéticas.

3.1.1. EXPERIMENTOS *EX VIVO* EN ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

Durante un periodo de dos meses se les administro a los animales de experimentación el compuesto de estudio a diferentes dosis mediante canulación orogástrica. Tras este periodo, obtuvimos el tejido cerebral e inmediatamente se sometió a un proceso hipoxia-reoxigenación.

3.2. ANIMAL DE EXPERIMENTACIÓN

Se emplearon ratas machos de la cepa Wistar con un peso comprendido entre 250-350g, que permanecieron bajo condiciones estándar de laboratorio, con un ciclo alternante de luz/oscuridad de 12 h, temperatura ambiente de 22°C y con libre acceso a comida y agua.

A los animales de experimentación se les indujo la diabetes con estreptozotocina (40mg/kg), mediante la infusión de la misma a través de la vena femoral, considerando diabético al animal que presentó cifras de glucemia superiores a 200mg/dl en dos determinaciones consecutivas espaciadas 24 horas.

Los animales fueron estabulados de acuerdo con la normativa de uso, manejo y cuidado de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos (RD 1201/2005, de 10 de octubre), según lo dispuesto en la Directiva 2003/65/CE del Parlamento Europeo y el Consejo, de 22 de julio de 2003. El protocolo de estudio fue aprobado por el Comité de Ética Animal de la Universidad de Málaga.

3.3. GRUPOS DE ANIMALES

Para realizar este estudio utilizamos un total de 84 animales que establecimos en 7 grupos de 10 animales cada uno. Establecimos dos grupos controles, uno no diabético y uno diabético, a los que se les administró suero fisiológico. Al resto de grupos de animales diabéticos se les administró diversas concentraciones de hidroxitirosol (0,5, 1, 2.5, 5 y 10 mg/kg/día).

El tratamiento de las diferentes dosis se realizó diariamente mediante canulación orogástrica. Tras dos meses de tratamiento con el compuesto, se procedió al sacrificio de los animales y a la obtención del tejido cerebral (4 cortes/cerebro) para ser sometido a un proceso de hipoxia-reoxigenación.

3.4. TEJIDO DE ESTUDIO

El órgano objeto de estudio fue el cerebro. Una vez sacrificado los animales mediante decapitación, habiendo sido previamente anestesiados con pentobarbital sódico y diazepam, se procedió a la disección de la piel y el tejido muscular de la región occipital para facilitar el decalotaje. Se realizaron dos osteotomías longitudinales sobre los huesos temporales hasta el frontal, levantándose con cuidado la escama resultante; de esta forma el cerebro queda libre de la calota.

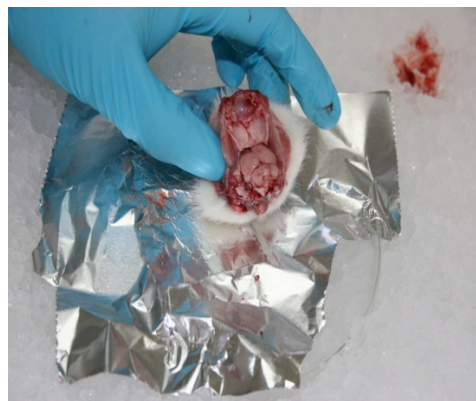
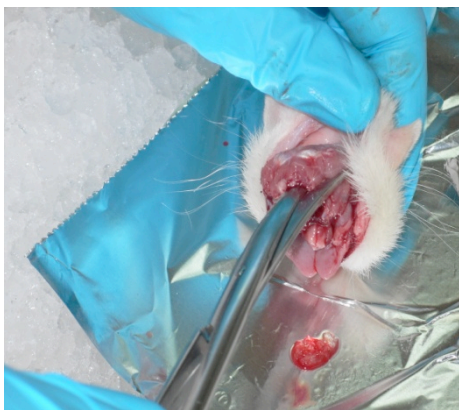


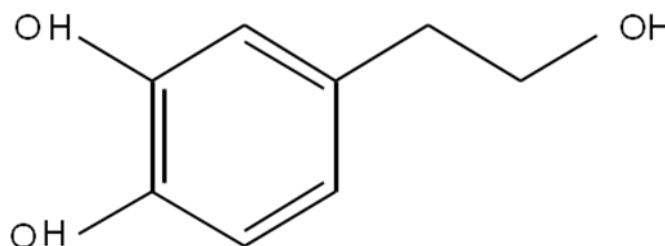
Imagen 1 y 2: imágenes del proceso de extracción del cerebro.

Se cortaron los tubérculos olfatorios y los pares craneales, siendo extraído el cerebro y el cerebelo, del total de tejido se aisló el cerebro medio, que se mantuvo en hipotermia inducida por hielo, con el fin de retardar la autólisis del órgano.

3.5. COMPUESTO DE ESTUDIO

El compuesto de estudio fue el siguiente:

HIDROXITIRO SOL: 3,4-dihidroxifeniletanol (Cayman Chem. Co. Ann Arbor, MI, USA).



3.6. MÉTODO DE INDUCCIÓN Y MANTENIMIENTO DE LA DIABETES EXPERIMENTAL

3.6.1. PREPARACIÓN DE LA ESTREPTOZOTOCINA

Para inducir la diabetes experimental, se utilizó una única dosis intravenosa de 40 mg/kg de estreptozotocina disuelta en tampón citrato. El tampón citrato se preparó mezclando dos soluciones: la solución A es una preparación de ácido cítrico 2,1 g/100 ml de agua destilada; la solución B se preparó con fosfato sódico (Panreac, Barcelona, España) 2,8 g/100 ml de agua destilada. El tampón citrato lo obtuvimos mezclando 11,2 ml de la solución A con 8,8 ml de la solución B. Se conservó en el frigorífico a 4°C.

3.6.2. INDUCCIÓN DE LA DIABETES EXPERIMENTAL

Los animales de experimentación fueron anestesiados mediante una inyección intraperitoneal de 20 mg/kg de diazepam (Valium[®], Roche Farma, S.A. Madrid-España). Una vez anestesiados, se procedió a realizar una incisión longitudinal en el pliegue inguinal (afectando a la piel, el tejido celular subcutáneo y las aponeurosis musculares). Tras la localización del paquete vasculonervioso femoral, se inyectó la estreptozotocina en la vena femoral con una jeringa U-40 de insulina (0.33x13mm/29G

Becton Dickinson, Madrid-España). Finalizada la administración, se procedió a suturar la piel con seda trenzada de 4 ceros.



Imagen 3: Canulación de la vena femoral del animal de experimentación.

3.6.3. MEDICIÓN Y CONTROL DE LAS CIFRAS DE GLUCEMIA

Se localizó la vena safena externa, se realizó una punción con una aguja desechable. Obtenida la gota de sangre, la toma de muestra se hizo por capilaridad (Figura 2). Se utilizó una determinación electroquímica de glucosa en sangre total con las tiras reactivas Glucocard™ G Sensor (Barcelona-España) con las cuales se utilizó el analizador de glucosa para sangre capilar Glucocard™ Gmeter (Barcelona-España).



Imagen 4: Medición de las cifras de glucemia.

Una vez obtenida la muestra sanguínea se realizó el control de glucemia con la siguiente pauta temporal:

- Antes de anestesiar el animal e inducirle la diabetes.
- A las 48 horas de la administración de estreptozotocina.
- Medición diaria hasta considerar un animal como diabético, que se definió cuando se obtuvieron dos días de manera consecutiva cifras de glucemia superior a 200 mg/dl.
- Para controlar la glucemia durante la evolución de diabetes, se realizaron mediciones cada 15 días.
- Previo al sacrificio del animal.

Igualmente se practicó un control semanal del peso de los animales a todos los grupos experimentales, ajustándose la dosis del fármaco al peso semanal del animal tratado.

Todos los animales diabéticos mantuvieron cifras de glucemia entre 200 y 500 mg/dl, mediante la inyección subcutánea de insulina Levemir FlexPen® (Bagsværd-Dinamarca) usando agujas desechables NovoFine® (Madrid-España). La dosis de insulina administrada osciló entre 4 y 6 UI dependiendo de la cifra de glucemia obtenida previamente.

3.7. TIPO DE EXPERIMENTO

Los experimentos se realizaron utilizando un modelo *ex vivo* de hipoxia-reoxigenación durante y tras los cuales se obtuvieron muestras de sobrenadante (tampón o medio de incubación) y tejido cerebral.

Este modelo experimental trata de reproducir, en condiciones *in vitro*, las distintas situaciones que suceden durante la isquemia-reperfusión, en el proceso de ictus isquémico. Ha sido aplicado tanto al tejido de los animales tratados, como al de los no tratados con los distintos compuestos de estudio.

Material y Métodos

Tras extraerse el cerebro, se introdujo en un tampón de disección: 10 mL (en mM: NaCl 120, KCl 2, CaCl₂ 0.5, NaHCO₃ 26, MgSO₄ 10, KH₂PO₄ 1.18, glucosa 11 y sacarosa 200. pH: 7.4) sumergido en hielo y con perfusión continua de oxígeno.

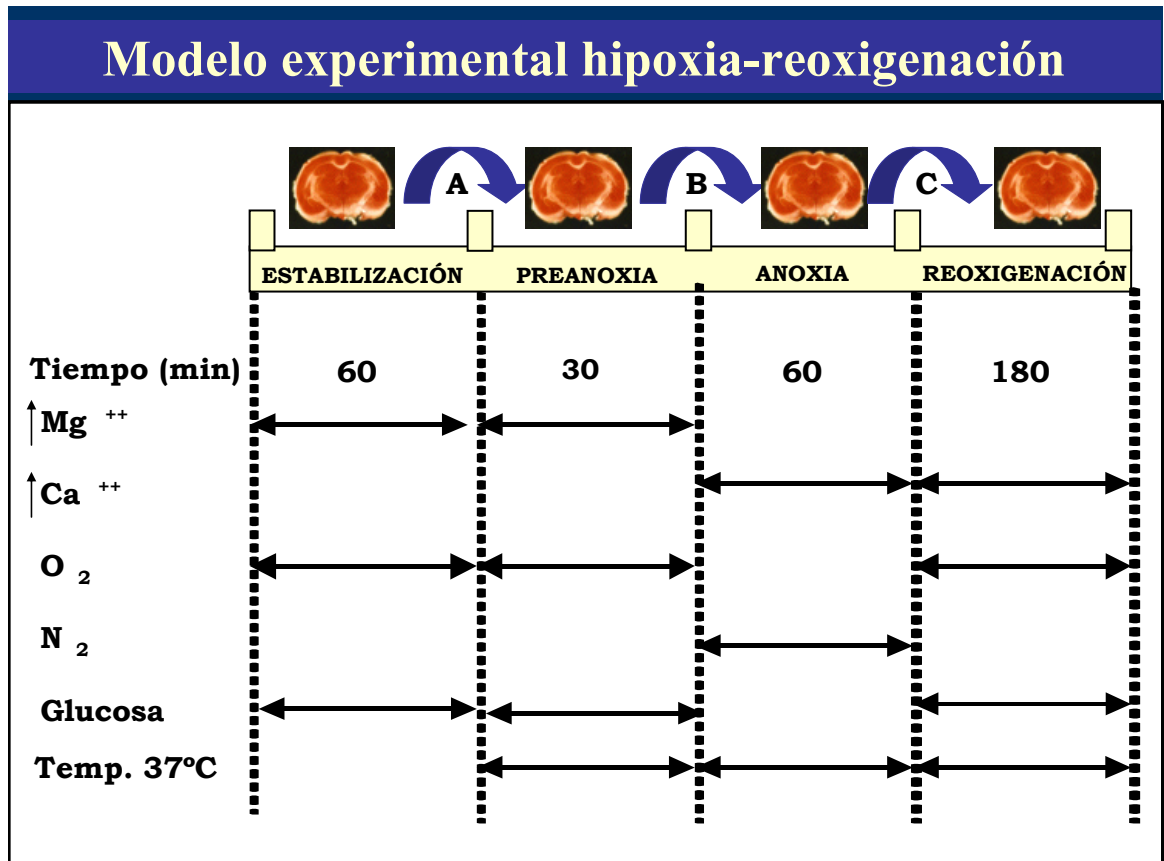
A continuación, se procedió a obtener los cortes de unas 500 micras realizadas con vibrotomo y se introdujeron durante 60 minutos en tampón de estabilización (igual al de disección pero sin sacarosa), a temperatura ambiente y sometido a una perfusión continua de oxígeno (utilizamos para cada fase donde sea necesaria una mezcla de O₂ al 95% y CO₂ al 5%, Alphagaz MIX. Air Liquide. España), etapa a la que llamamos de estabilización.

Seguidamente, iniciamos la etapa de prehipoxia, consistente en sumergir los cortes en un tampón con la misma composición que en la fase anterior y burbujeado con oxígeno durante 30 minutos a una temperatura de 37°C (baño de bloque en seco para tubos “Multiplaces” con temperatura regulable de 10-200°C. Selecta. España).

A continuación, establecemos la etapa de hipoxia en la cual sometemos al tejido durante 60 minutos a una perfusión continua de nitrógeno (Alphagaz N₂. Air Liquide. España) en un tampón de hipoxia (En mM: NaCl 120, KCl 2, CaCl₂ 2, NaHCO₃ 26, MgSO₄ 1.19, KH₂PO₄ 1.18. pH: 7.4), a 37°C.

Por último, tiene lugar la etapa de reoxigenación que dura 180 minutos, aunque metodológicamente la dividimos en tres fases de 60 minutos (R1, R2 y R3), utilizando un tampón de reoxigenación (igual al anterior añadiéndole glucosa 11 mM), a 37°C y con burbujeo continuo de oxígeno.

El tampón empleado en cada una de las etapas, es sometido previamente a su uso, a una oxigenación o nitrogenación (según proceda) continua durante 45 minutos.



Al inicio de cada fase del modelo no se añadió compuesto alguno, sino, únicamente, 5 ml del tampón correspondiente.

Al final del proceso, se obtuvieron distintas muestras: por un lado, se recogió muestra de tampón (sobrenadante) al finalizar cada una de las fases intermedias del modelo, así como tras la finalización del mismo y, por otro lado, se recogió el tejido cerebral al concluir el período de reoxigenación. Todas las muestras obtenidas se congelaron a -80°C para las posteriores determinaciones.

3.8. VARIABLES ANALÍTICAS

1. Muerte celular cerebral:

Se cuantificó la muerte celular a través de la actividad enzimática lactato deshidrogenasa (LDH) en las muestras de tampón (sobrenadante) de incubación tras las distintas fases del proceso de hipoxia-reoxigenación.

2. Mediadores inflamatorios:

Determinación de la producción de prostaglandina E₂ (PGE₂) e interleucina (IL) 1β Y 10 cerebrales. Se cuantificó en el tejido tras su obtención una vez finalizado el proceso de reoxigenación y se procesó según el parámetro a determinar.

3. Estrés oxidativo: peroxidación lipídica y defensa antioxidante:

En las muestras de cerebro, se valoró el daño oxidativo tisular a través de la determinación de la peroxidación lipídica de las membranas celulares (productos de reacción con el ácido tiobarbitúrico o TBARS, cuyo principal representante es el malondialdehído o MDA). Por otro lado, estudiamos la capacidad defensiva antioxidante del tejido mediante la cuantificación del contenido celular de glutatión total, oxidado y reducido (GST, GSSG y GSH, respectivamente).

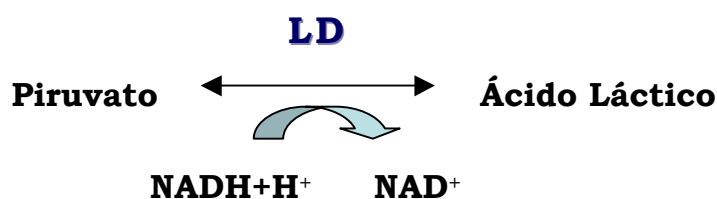
4. Estrés nitrosativo: nitritos y nitratos y 3-nitrotirosina:

La producción de óxido nítrico se determinó a través de la medición de sus productos finales, nitritos y nitratos en las muestras de sobrenadante. También se estudió la producción de 3-nitrotirosina.

3.9. DESCRIPCIÓN DE LAS TÉCNICAS ANALÍTICAS

3.9.1. MUERTE CELULAR: ACTIVIDAD LACTATO DESHIDROGENASA (LDH)

La enzima lactato deshidrogenasa (LDH), cataliza la reducción del piruvato a lactato mediante el coenzima NADH, y se utiliza como medida indirecta de muerte celular.



Para la medición de este parámetro empleamos el Cytotoxicity Detection Kit de Roche (Roche Applied Science). Este kit es una alternativa para cuantificar citotoxicidad/citolisis, basada en la medida de la actividad LDH que se libera durante el daño celular, es decir, cuando hay daño en la membrana plasmática. Para su realización previamente se centrifugan las muestras obtenidas tras el proceso de hipoxia-reoxigenación (500 μ L de sobrenadante) a 250 x g durante 10 minutos (Eppendorf Centrifuge 5415D) y, a continuación, procedemos a realizar el kit con posterior lectura en espectrofluorímetro. Los resultados obtenidos se ajustan al peso de las muestras de tejido correspondientes.

3.9.2. DETERMINACIONES DE MEDIADORES INFLAMATORIOS CEREBRALES

3.9.2.1. EXTRACCIÓN Y DETERMINACIÓN DE PROSTAGLANDINAS E₂

El tejido obtenido tras el proceso de hipoxia-reoxigenación fue homogeneizado en una disolución del 15% de metanol (Methanol. LiChrosolv. MERK. Alemania) en 0,1 M de PBS con un pH de 7.5 (100 mg de tejido en 1 mL de metanol-buffer). El resultante se ultracentrifugó en tubos de silicona (Ultracentrífuga Modelo L-80. Beckman Instrument S.A. España) a 15000 x g, a 4°C durante 15 minutos, y recogimos el sobrenadante.

Se procedió a preparar la columna de separación cromatográfica (Sep-Pak-Plus Cartridges. WATERS. Ireland), para ello se lavó la columna con 2 mL de metanol seguido de 2 ml de agua destilada-desionizada ultrapura (milliQ-biopak. Millipore USA). A continuación se pasó la muestra por la columna y ajustamos el flujo a 1 ml/minuto. La siguiente operación consistió en lavar la columna con 2 mL de metanol al 15% en agua, seguido de 2 ml de petroleum ether (Petroleum ether anhydrous, 300314 SIGMA-ALDRICH Inc USA). De esta forma, las prostaglandinas quedan fijadas en la columna. Las prostaglandinas se eluyeron con 2 mL de metilformato (Methylformate, anhydrous, 99%. 291056. SIGMA-ALDRICH Inc USA). Por último el metilformato se evaporó con nitrógeno (N₂) y el residuo obtenido está preparado para su determinación mediante kit comercial por técnica de enzimoimmunoensayo PGE₂ (PGE₂, RPN222-96 celdas. Amersham Biosciences) y posterior medición en

espectrofluorímetro.

3.9.2.2. EXTRACCIÓN Y DETERMINACIÓN DE INTERLEUCINA 1 β e IL-10

El tejido obtenido tras el proceso de hipoxia-reoxigenación se homogeneizó en un volumen comprendido entre 0,25-1 mL de un tampón de extracción a 4°C y pH de 7.2 y que contiene 50 mM de Tris, 1mM de EDTA, 6 mM de MgCl₂, 1 mM de Phenylmethylsulfonyl fluoride, 5 μ g/mL de Leupeptin, 1 μ g/mL Antipain, 1 μ g/mL de Aprotinin, 1 μ g/mL Soybean trysin inhibitor. Después de homogeneizar, las muestras se pasaron a tubos de silicona y fueron sonicadas (Vibracell VC-50T. Sonios Materials Inc. USA) durante 5-10 segundos y ultracentrifugadas (Ultracentrífuga Modelo L-80. Beckman Instrument S.A. España) durante 10 minutos a 14000 x g (4°C). Acto seguido, recogimos el sobrenadante y las procesamos mediante kits comerciales de técnica ELISA para la IL-1 β (Interleukin-1 β , Rat Biotrak ELISA System RPN2743-96 determinaciones) y la IL-10 (Interleukin-10, Rat Biotrak ELISA System RPN2739-96 determinaciones); obteniendo los resultados tras su medición en el espectrofluorímetro. Los resultados se corrigieron según las proteínas de cada muestra. El contenido total de proteínas se midió utilizando el método de Bradford. Los datos son expresados como pg de IL/100 μ g de proteína total.

3.9.3. ESTATUS OXIDATIVO

3.9.3.1. DETERMINACIÓN DE LA PEROXIDACIÓN LIPÍDICA

A) OBTENCIÓN DE FRACCIONES ENRIQUECIDAS DE MEMBRANAS

Las fracciones de los tejidos extraídos se lavaron con agua bidestilada y desionizada y se pesaron. Posteriormente se procedió a obtener fracciones enriquecidas de membranas mediante gradientes de centrifugación (fracción P2) siguiendo la técnica de Bossman (1969), posteriormente modificada por Wittaker, para lo cuál los tejidos se diluyeron en todos los casos en proporción 1:10 en una solución de incubación (NaCl 0.1 M, KCl 5x10⁻⁴ M, CaCl₂ 3.1x10⁻³ M, MgSO₄ 1x10⁻³ M, Glucosa 4.9x10⁻³ M, NaHCO₃ 2.4x10⁻² M, KH₂PO₄ 5.5X10⁻⁴ M, en agua bidestilada y desionizada), con Tris 50 mM y Sacarosa 0.32 M, a pH 7.4 y mantenida en frío mediante su inmersión en

hielo triturado.

Cada fracción de tejido se sometió a homogeneización manual. Durante todo el proceso, los recipientes que contenían los tejidos, fueron mantenidos en hielo triturado y agua.

Los distintos homogeneizados se repartieron posteriormente en alícuotas en tubos siliconados y se centrifugaron a 1000 x g durante 10 minutos a 4°C.

Al finalizar la centrifugación se procedió a la extracción, mediante una pipeta pasteur, del sobrenadante (fracción S1), el cual fue transferido a tubos de centrífuga y se desechó el pellet (fracción P1).

La fracción S1 fue centrifugada posteriormente a 10000 x g durante 20 minutos a 4°C, obteniéndose de nuevo un sobrenadante (fracción S2), que fue desechado y un pellet. Este segundo pellet o Fracción P2 fue resuspendido mediante agitación continua hasta su total dilución en la solución de incubación, pero sin sacarosa, en proporción 1:10 (peso/volumen) respecto al peso inicial. En todos los casos la dilución se realizó en proporción al peso original de cada una de las fracciones. Las diluciones obtenidas fueron congeladas a -80°C.

B) DETERMINACIÓN DE LOS PRODUCTOS DE REACCIÓN CON ÁCIDO TIOBARBITÚRICO (TBARS)

Finalidad y fundamento

El malondialdehído es un producto derivado del metabolismo del ácido araquidónico, que se produce por hidrólisis del endoperóxido cíclico PGH₂ junto al ácido 12-hidroxiheptadecatrienoico (HHT).

La determinación de este metabolito del ácido araquidónico nos indica de modo indirecto los niveles de peroxidación alcanzados por un tejido (Buege & Aust, 1978) y, aunque no es un metabolito específico del catabolismo peroxidativo, sí es un buen indicador, aceptado por muchos autores, del funcionalismo de esta vía oxidativa (Bird & Draper, 1984). Presenta también la ventaja de que puede colorearse al reaccionar con el ácido tiobarbitúrico; lo que nos permite de forma fácil cuantificar sus niveles en cualquier muestra determinando simplemente su absorbancia espectrofotométrica.

Método

Para la determinación de TBARS en tejidos, seguimos la técnica descrita previamente por nuestro grupo (Bellido y cols., 1991; De la Cruz y cols., 1992).

1.) Se procedió a la dilución de las alícuotas de tejido mediante agitación en el tampón de incubación descrito para la obtención de la fracción P2 con Tris-20 mM en proporción 1:2 (peso/volumen).

2.) Una vez obtenida la dilución de los tejidos, se repartieron las muestras en alícuotas en tubos de cristal y se acomodaron en una gradilla. Estas se mantuvieron inmersas en hielo triturado y agua durante todo el tiempo de preparación.

3.) En los casos de experimentos *in vitro* de tejido no sometido al modelo de hipoxia-reoxigenación y en las que realizamos una incubación con algún compuesto, esto se hizo con 50 μ l del mismo (de una concentración superior para obtener la adecuada al diluirlo en el volumen final). A las muestras se les añadió los inductores de la peroxidación lipídica, sulfato ferroso y ácido ascórbico, ambos en un volumen de 50 μ l también, mientras que al control se le añade el mismo volumen pero de agua (100 μ l). El volumen final de las muestras fue en todos los casos el mismo.

En los experimentos de tejido no sometido al modelo de hipoxia-reoxigenación ni a inducción química, pero si incubados con algún compuesto esto se hizo con 50 μ l del mismo (de una concentración superior para obtener la adecuada al diluirlo en el volumen final). Se les añadió, 100 μ l de agua destilada para igualar volumen, al igual que al control al que se añadió 150 μ l de agua destilada. El volumen final de las muestras fue en todos los casos el mismo.

En el caso de las muestras de tejido que ya han tomado contacto con el fármaco (tejido sometido a hipoxia-reoxigenación) y de sus controles correspondientes, el volumen añadido es siempre de 150 μ l de agua destilada a fin de igualarlos. El volumen final de las muestras fue en todos los casos el mismo.

En los casos de inducción química, la peroxidación lipídica se indujo durante un período de tiempo de 45 minutos. Durante todo el proceso, los tubos se taparon y cubrieron con papel de aluminio, para evitar su exposición a la luz, y fueron sometidos a una temperatura de 37°C y agitados continuamente a una velocidad de 100 bats/min.

4.) Tras la incubación, las muestras fueron extraídas del baño y destapadas. Se añadió, a las muestras problema y sus controles, un volumen de 500 μ L de una solución de ácido tiobarbitúrico al 0.5% en ácido tricloroacético al 20%, para colorear los TBARS formados en el paso anterior.

5.) A continuación, todas las muestras, problemas y controles, fueron introducidas en un baño termostataado a 100°C durante 15 minutos y protegidas de la luz, debido a su fotosensibilidad. Posteriormente, se enfría en hielo triturado para detener la reacción.

6.) Finalizado este tiempo, fueron pasadas a tubos de plástico siliconados y centrifugadas a 2000 x g durante 15 minutos a 4°C.

7.) Una vez obtenido el sobrenadante, se procedió a su medición mediante un espectrofluorímetro, a una longitud de onda de 532 nm en el espectro de luz visible.

Valoración de los resultados

El valor de la absorbancia resultante, fue transformado en nmoles de TBARS mediante su comparación con una curva de calibración estándar de TBARS realizada previamente con malondialdehido-bis-dietilacetal en un rango de concentraciones de 0 a 100 nmol/l y siguiendo la metodología anteriormente descrita para la determinación de TBARS en los tejidos, pero utilizando como sustituto del tejido concentraciones crecientes de TBARS.

Los datos de la curva estándar de TBARS se analizaron mediante un programa de regresión no lineal y, sobre estos datos, se compararon las absorbancias de las muestras, obteniéndose la cantidad de TBARS de las mismas en nmol/ml.

Los valores de TBARS en nmoles producidos por las muestras, se relacionaron posteriormente con los miligramos de proteínas existentes en ellas, expresando el índice de productos lipídicos reaccionantes con el ácido tiobarbitúrico en último término en nmoles de MDA/mg de proteínas.

C) DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS

Se cuantificó la tasa de proteínas según el método descrito por Bradford (1976).

Material y Métodos

1.) Se cogieron tantos tubos como muestras se obtuvieron. A cada tubo se le adicionó 50 µl de las muestras, excepto al blanco al que se le adicionó 50 µl de disolución de ClNa 5N.

2.) A continuación se añadieron 2,5 ml del reactivo de Bradford a cada tubo y se agitaron.

3.) Tras un período de incubación de 5 minutos a temperatura ambiente, se procedió a realizar la medición de las proteínas en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 595 nm. Para ello, vertimos el volumen suficiente del blanco y de las muestras en placas que introducimos en el espectrofotómetro, obteniéndose la absorbancia de cada muestra.

4.) Para hallar el valor de las proteínas, sólo restó por aplicar la ecuación de la curva patrón para las proteínas:

$$(y)= a(x) + b$$

Sustituimos "y" por su valor, que es la absorbancia de cada muestra, despejamos la "x" obteniendo así la concentración de proteínas, expresada en µg prot/100 µl.

REACTIVOS DE LA TÉCNICA PARA LA DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS SEGÚN EL MÉTODO DE BRADFORD

Su composición se detalla a continuación:

- Brillant Blue G: Pm 854,0. Lote 32H7706. SIGMA Chemical Co.USA.

La cantidad que se utiliza es 0,1g ;

- Alcohol etílico (CH₃-CH₂OH) al 96% (P/V). Densidad 0.816g/cc.

Probus. España. La cantidad utilizada es 50 ml;

- Acido ortofosfórico (H₃PO₄): Pm 98,00. Riqueza 85%. Lote 28070.

Montplet& esteban. La cantidad que se utiliza es 100 ml.

Todo ello se pone en un matraz y se completa hasta 1000 ml de agua destilada.

3.9.3.2. DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE GLUTATIÓN

La determinación de los niveles de glutatión se realizó mediante espectrofluorimetría, siguiendo la técnica descrita por Hissin & Hill (1976).

1.) Para el desarrollo de esta experiencia se tomaron entre 50 y 90 mg de tejido, que una vez pesados fueron cortados en pequeñas fracciones, las cuales se pusieron en un homogeneizador al que se adicionó un volumen fijo de 1 ml de tampón fosfato sódico 0,1 M (pH 8.0).

2.) Se realizó la homogeneización manual y una vez obtenida una mezcla homogénea, se añadió 0,25 ml de ácido fosfórico al 25%.

3.) En los casos de incubación con algún compuesto (protocolo aplicable al tejido no sometido al proceso de hipoxia-reoxigenación) éste se hizo en un volumen de 50 μ l y en las mismas condiciones expresadas para la técnica de la peroxidación lipídica. La incorporación o no de dietil maleato (DEM), se hizo conjuntamente con el compuesto y durante el mismo periodo de tiempo y condiciones. Al finalizar dicha incubación, se añadió el ácido ortofosfórico.

4.) Esta solución contenida en el homogeneizador fue vertida en un tubo siliconado para proceder a su centrifugación, la cual se realizó a 13000 x g durante 15 minutos a una temperatura de 4°C.

5.) Durante la espera de la centrifugación, se elaboró una curva patrón de GSH, a partir de una solución 1 mol/l (3,073 mg de GSH en 10 ml de tampón fosfato sódico), realizando sucesivas diluciones: 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64, 1/128, 1/256, 1/512, 1/1024 y 1/2048. Todo ello se mantuvo en frío utilizando hielo triturado y agua.

6.) Una vez finalizada la centrifugación se recoge del sobrenadante del cual 200 μ l se utilizan para la determinación de GSSG y se le añadieron 8 μ l de 4-vinilpiridina (V3204. Sigma-Aldrich. USA), con el objeto de bloquear todo paso de glutatión reducido a oxidado. Se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente.

7.) A continuación, se pusieron en tubos de plástico y según el orden que se indica, los siguientes componentes: 0,9 ml de tampón fosfato sódico a todos los tubos, 50 μ l de las muestras (ya sean de GST o de GSSG) o de la correspondiente

Material y Métodos

concentración estándar y por último a todos los tubos se les adicionó 50 μ l de o-phthaldehído (P0657. Sigma-Aldrich. USA).

8.) Se agitaron y se incubaron durante 15 minutos.

9.) Pasado este tiempo se procedió a la lectura en el espectrofluorímetro, utilizando una longitud de onda de excitación de 350 nm y de emisión de 440 nm dando lugar a los valores de la curva patrón y del glutatión total (GST) y oxidado (GSSG).

Valoración de los resultados

Una vez obtenido el dato de glutatión en nmol/100 μ l, teniendo en cuenta las diluciones realizadas y el peso del tejido añadido, se aplicó la siguiente expresión matemática (para una dilución 1:5):

$$\text{Glutatión} = \frac{\text{Glutatión (nmol/100 } \mu\text{l)} \times 273.5}{\text{mg de tejido}}$$

Expresándose los resultados, de esta forma, en μ mol/g de tejido.

Esta valoración se realizó para glutatión total (GST) y glutatión oxidado (GSSG), calculándose el glutatión reducido (GSH) mediante la diferencia:

$$\text{GSH} = \text{GST} - \text{GSSG}$$

Asimismo, se calculó el porcentaje de glutatión que se encontraba en forma oxidada, según la siguiente expresión:

$$\% \text{ GSSG} = \frac{\text{GSSG} \times 100}{\text{GSH} + \text{GSSG}}$$

3.9.4. ESTRÉS NITROSATIVO

3.9.4.1. DETERMINACIÓN DE NITRITOS Y NITRATOS

La determinación de los nitritos-nitratos se utiliza como medida indirecta de la producción de óxido nítrico, se realizó en el sobrenadante de los cortes cerebrales en el proceso de hipoxia-reoxigenación que, una vez obtenidos, se congelaron a -80°C hasta su procesamiento con el kit nitrate/nitrite colorimetric assay kit (Cayman Chemical Company) y posterior medición en espectrofluorímetro. Los resultados de la lectura se ajustaron según el peso del tejido correspondiente.

3.9.4.2. DETERMINACIÓN DE LA NITRACIÓN DE PROTEÍNAS

La formación de 3-nitrotirosina ha sido demostrada en algunos desórdenes inflamatorios, lesiones arterioscleróticas y enfermedades neurodegenerativas. La nitración de proteínas es usada como índice de la producción de peroxinitritos, por ello a través de su expresión se puede valorar el efecto tóxico del óxido nítrico.

Para la determinación de la nitrotirosina utilizamos el Nitrotyrosine Elisa Test Kit de Hycult biotechnology b.v. El tejido sobre el que se determina se obtuvo tras un proceso de hipoxia-reoxigenación donde lo incubamos con una concentración del compuesto a estudiar y tras ello congelamos a -80°C . Posteriormente se descongeló y se homogeneizó con un tampón compuesto por $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ 100mM y 0,1% de digitonina y pH de 7.4 a razón de 1mL/100mg de tejido. Tras ello lo centrifugamos 5000 x g durante 10 minutos a 4°C y en el sobrenadante obtenido aplicamos el kit.

3.10. MÉTODO ESTADÍSTICO

Los datos expresados en el texto, tablas y figuras representa la media \pm error estándar de la media (SEM) de los animales utilizados en los distintos grupos.

La valoración estadística de dichos resultados se realizó mediante la utilización del programa para ordenador personal SPSS (Social Program for Statistical Sciences) para Windows, versión 22.0 (licenciado para el Servicio Central de Informática de la Universidad de Málaga).

Material y Métodos

Las diferencias entre los distintos compuestos con respecto al grupo control, en relación con las distintas variables, se realizó utilizando el test de la T de student para muestras independientes (para variables que siguieron una distribución normal) o el test no paramétrico de U de Mann-Whitney (para variables que no seguían una distribución normal).

Las diferencias entre los distintos compuestos utilizados respecto a las distintas variables, se han establecido mediante la aplicación de test de ANOVA con posterior transformación de Bonferroni.

Con la finalidad de explicar la posible relación entre los mecanismos de acción en cuanto a la capacidad neuroprotectora de los distintos compuestos utilizados, se han obtenido los distintos coeficientes de correlación de Pearson.

Para establecer la relación entre distintas variables bioquímicas y la aparición de daño cerebral se utilizó la regresión lineal múltiple.

En todos los casos, se ha asumido significación estadística con un valor de $p < 0.05$.

4. RESULTADOS

4.1 VARIABLES ZOOMÉTRICAS

En primer lugar, valoramos si los tratamientos suministrados modificaban el peso, recuentos celulares sanguíneos y glucemia de los animales. Como podemos apreciar en la siguiente tabla, a excepción de la glucemia y el volumen plaquetario, ni el peso u otro parámetro analítico se vieron afectados tras la diabetes experimental.

Tabla 4.1.1. Peso y parámetros analíticos de los animales controles no diabéticos vs. controles diabéticos

	CND	CD
Peso (g)	420±7	387±16
Glucemia (mg/dL)	102±3	491±8†
Hematíes (X10¹²/L)	8.6±0.2	9.0±0.2
Leucocitos (X10⁶/L)	6.1±0.3	6.4±1.9
Plaquetas (X10⁶/L)	909±33	924±20
Hemoglobina (g/L)	16.0±0.4	16.7±0.5
Hematocrito (%)	46.8±1.0	46.4±1.3
Vol. plaquetario (fL)	4.9±0.1	5.9±0.1†

Los datos se expresan como la media ± EEM de 10 animales por grupo

CND: control no diabético, CD: control diabético

†P < 0.05 respecto a CND

Resultados

En la siguiente tabla (4.1.2) podemos observar que ninguna de las dosis de hidroxitirosol administrada ejerció un efecto importante sobre el peso ni los parámetros analíticos.

Tabla 4.1.2. Peso y parámetros analíticos de los animales controles diabéticos vs. controles diabéticos que recibieron las diferentes dosis de hidroxitirosol

	CD	HT-0.5	HT 1.0	HT-2.5	HT-5.0	HT10.0
Peso (g)	387±16	386±9	391±14	402±12	393±12	350±14
Glucemia (mg/dL)	491±8	507±7	512±9	487±28	474±14	496±5
Hemáties (X10¹²/L)	9.0±0.2	8.6±0.2	8.2±0.2	8.2±0.1	8.6±0.2	8.2±0.7
Leucocitos (X10⁶/L)	6.4±1.9	5.9±0.5	5.3±0.4	5.4±0.6	5.0±0.3	5.1±0.6
Plaquetas (X10⁶/L)	924±20	893±27	882±30	910±22	890±22	925±13
Hemoglobina (g/L)	16.7±0.5	15.8±0.3	16.3±0.3	16.6±0.2	16.7±0.3	16.4±0.5
Hematocrito (%)	46.4±1.3	44.3±0.8	45.8±0.8	48.5±0.7	48.4±0.7#	45.2±1.2
Vol.plaquetario (fL)	5.9±0.1	5.3±0.1#	5.3±0.1#	5.6±0.1	5.8±0.1	5.6±0.2

Los datos se expresan como la media ± EEM de 10 animales por grupo.

CD: control diabético; HT: hidroxitirosol.

#P < 0.05 respecto a CD.

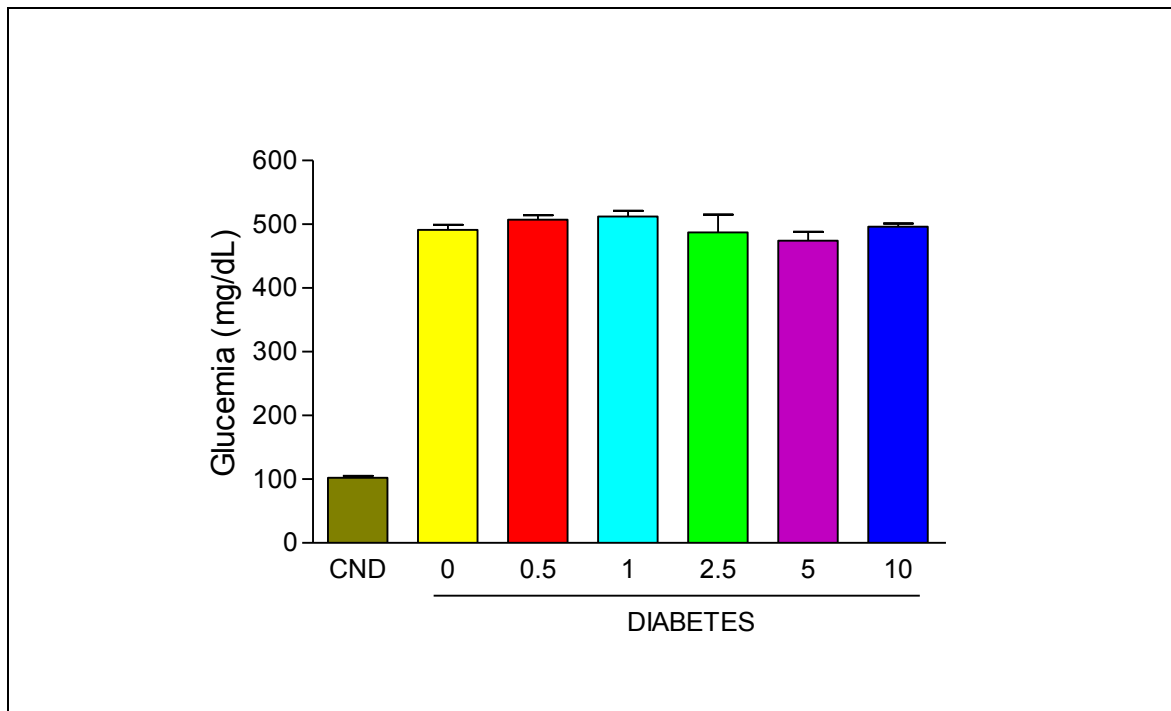


Figura 4.1.1. Glucemia al finalizar los 2 meses de periodo de seguimiento en el grupo de animales controles no diabéticos (CND) frente a los animales diabéticos que recibieron las diferentes dosis de hidroxitirosol (HT).

Como podemos apreciar, tras la inducción de la diabetes con estreptozotocina se alcanzan niveles de glucosa que rondan los 500 mg/dL. La administración de las distintas dosis de hidroxitirosol no influyeron sobre estos niveles.

4.2. VARIABLES DETERMINADAS EN EL MODELO DE HIPOXIA-REOXIGENACIÓN CEREBRAL

Como se ha recogido en la metodología del presente trabajo, para provocar un daño en el tejido cerebral se empleó el modelo de hipoxia-reoxigenación. Tras la realización del modelo experimental, se procesaron el tejido y sobrenadante en las diferentes etapas de la que consta el modelo. Con el material recogido se analizaron diferentes parámetros que evalúan vías bioquímicas relacionadas con el daño a nivel cerebral.

En la tabla 4.2.1., se recogen los cambios originados sobre los parámetros estudiados tras someter a tejido cerebral a un proceso de hipoxia-reoxigenación respecto a un tejido no dañado.

Tabla 4.2.1. Cuantificación de los parámetros bioquímicos relacionados con vías de daño en tejido cerebral en un modelo experimental de hipoxia-reoxigenación.

	Oxigenación (N = 10)	Hipoxia-reoxigenación (N = 10)
LDH (unidades arbitrarias)	0.11 ± 0.02	2.41 ± 0.09*
TBARS (nmol/mg prot)	0.012 ± 0.001	0.63 ± 0.10*
GSH (μmol/g tejido)	10.91 ± 0.95	7.50 ± 0.56*
%GSSG respecto a GSH+GSSG	15.65 ± 2.04	18.90 ± 1.72*
NO ₂ ⁻ +NO ₃ ⁻ (μmol/0.1 g tejido)	10.1 ± 0.20	14,30 ± 1.28*
3-nitrotirosina (nmol/0.1 g tejido)	0.04 ± 0.008	2.99 ± 0.14*
PGE2 (pg/0.1 g tejido)	19.2 ± 0.8	68.15 ± 6.11*
IL-1β (pg/0.1 g tejido)	4.20 ± 0.09	6.60 ± 0.30*
IL-10 (pg/0.1 g tejido)	6.41 ± 0.96	2,63 ± 0.46*

LDH: lactato deshidrogenasa, TBARS: sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico, GSH: glutatión reducido, GSSG: glutatión oxidado, NO₂⁻+NO₃⁻: nitritos + nitratos, IL-1β: interleucina 1β, IL-10: interleucina 10. *p < 0.05 con respecto al tejido cerebral sano

Como podemos observar, el modelo de hipoxia-reoxigenación reproduce una situación de daño cerebral, valorada mediante la cuantificación del eflujo de LDH, en el que podemos apreciar que se afectan diferentes vías bioquímicas: incremento del estrés oxidativo y nitrosativo y un aumento de los mediadores inflamatorios.

El estado oxidativo que descompensado, apareciendo un incremento de parámetros de oxidación (medidos en nuestro estudio a través de los TBARS, en relación con la peroxidación lipídica) y una depleción del sistema antioxidante de glutatión, donde aparece, principalmente, una porcentaje de glutatión oxidado respecto al total elevado respecto al tejido sano, lo que indica un incremento de la actividad oxidativa y el inicio de la defensa antioxidante.

Por otro lado, se observa un incremento del óxido nítrico y de peroxinitritos, que potencia aun más el estado prooxidante.

Por último, la fase de reoxigenación del modelo se relaciona con un incremento de la actividad proinflamatoria, mediada por niveles elevados de prostaglandina E2 y de IL-1beta, así como un descenso de los niveles de la interleucina antiinflamatoria IL-10.

Se ha demostrado que la diabetes mellitus produce un daño a nivel endotelial que condiciona una mayor incidencia de eventos cardiovasculares, lo que a nivel cerebral se relaciona con una mayor aparición de ictus isquémico y hemorrágico. Por este motivo, se evaluó la influencia de la diabetes en el modelo experimental de daño cerebral empleado en el presente trabajo.

A continuación se recogen los valores de los distintos parámetros relacionados con vías bioquímicas de daño cerebral tras la etapa de reoxigenación del modelo experimental ya comentado (Tabla 4.2.2).

Podemos observar como en los animales diabéticos se potencia de forma significativa el daño observado en el modelo de hipoxia-reoxigenación.

Resultados

Tabla 4.2.2. Valores de los parámetros bioquímicos relacionados con el daño cerebral en un modelo experimental de hipoxia-reoxigenación: animales controles no diabéticos vs. controles diabéticos.

	CND (N = 10)	CD (N = 10)
LDH (unidades arbitrarias)	2,41±0,09	3,77±0,29*
TBARS (nmol/mg prot)	0,63 ± 0,10	1,33 ± 0,08*
Glutation total (µmol/g tejido)	9,21± 0,55	7,16 ± 0,38*
GSH (µmol/g tejido)	1,71 ± 0,15	1,5 ± 0,08
GSSG (µmol/g tejido)	7,5 ± 0,56	5,66 ± 0,32
%GSSG respecto a GSH+GSSG	18,9 ± 1,72	21,12 ± 0,81
Glutation peroxidasa (µmol/min/g prot)	0,76 ± 0,091	1,60 ± 0,61
NO ₂ ⁻ +NO ₃ ⁻ (µmol/0.1 g tejido)	14.3 ± 1.28	10.2 ±1.24*
3-nitrotirosina (nmol/0.1 g tejido)	2,99 ± 0,14	6,92 ±0,79*
PGE2 (pg/0.1 g tejido)	68,15 ± 6,11	104,83 ±4,52*
IL-1β (pg/0.1 g tejido)	6,60 ± 0,3	9,69 ±0,54*
IL-10 (pg/0.1 g tejido)	14.3 ± 1.28	10.2 ±1.24*

LDH: lactato deshidrogenasa, TBARS: sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico, GSH: glutatión reducido, GSSG: glutatión oxidado, NO₂⁻+NO₃⁻: nitritos + nitratos, IL-1β: interleucina 1β, IL-10: interleucina 10.

CND: control no diabético, CD: control diabético.

*p < 0.05 con respecto al grupo control no diabético

4.3. VALORACIÓN DEL EFECTO NEUROPROTECTOR DE LA ADMINISTRACIÓN DE HIDROXITIRO SOL EN RATAS DIABÉTICAS

En la Tabla 4.3.1 y Figura 4.3.1, se muestran los valores correspondientes a la actividad lactato deshidrogenasa (LDH), como índice indirecto de muerte celular, en los cortes cerebrales después de 180 minutos de reoxigenación, en ratas sanas y ratas diabéticas (2 meses de evolución de su diabetes) tratadas durante 2 meses por vía oral con diferentes dosis de hidroxitirosol (0, 0.5, 1, 2,5, 5 y 10 mg/Kg/día).

Tabla 4.3.1. Valores (media y error estándar de la media) correspondientes a la actividad lactato deshidrogenasa LDH (UI/mg de tejido/min), tras la administración oral de diferentes dosis de hidroxitirosol, en los cerebros de los animales diabéticos tras la Fase de Reoxigenación.

Dosis HT (mg/Kg/día)	LDH
0	3,77±0.29
0.5	2,79± 0.23*
1	2,49± 0.21*
2.5	2,31± 0.15*
5	2,38± 0.13*
10	2,54± 0.36*

HT: hidroxitirosol

* $p < 0,05$ vs. grupo tratado solo con solución hidroalcohólica.

Todas las dosis de hidroxitirosol reducen de forma significativa, pero no de manera dosis-dependiente el eflujo de LDH. Por lo tanto, podemos aseverar que hidroxitirosol presenta un efecto neuroprotector en animales diabéticos, tras una administración de siete días previa a la realización del modelo de daño cerebral.

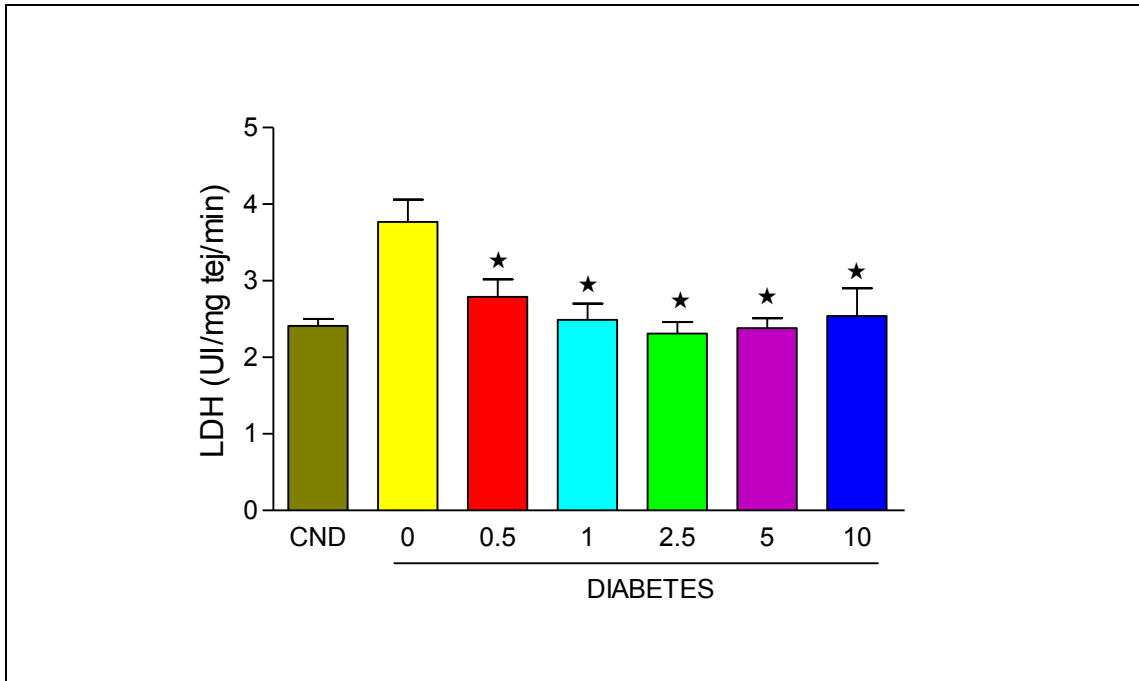


Figura 4.3.1. Representación gráfica de los valores de LDH en animales no diabéticos y animales diabéticos que recibieron distintas dosis de hidroxitirosol.

4.4. VALORACIÓN DE LA ADMINISTRACIÓN DE HIDROXITIRO SOL EN RATAS DIABÉTICAS SOBRE VÍAS BIOQUÍMICAS RELACIONADAS CON EL DAÑO CEREBRAL EN EL MODELO DE HIPOXIA-REOXIGENACIÓN

4.4.1. VÍA DEL ESTRÉS OXIDATIVO

En la Tabla 4.4.1.1 y Figuras 4.4.1.1 a 4.4.1.4, se muestran los valores correspondientes a los parámetros que representan el estrés oxidativo en los cortes cerebrales después de 180 minutos de reoxigenación, en ratas sanas y ratas diabéticas (2 meses de evolución de su diabetes) tratadas durante 2 meses por vía oral con diferentes dosis de hidroxitirosol (0, 0.5, 1, 2,5, 5 y 10 mg/Kg/día).

Tabla 4.4.1.1. Valores (media y error estándar de la media) correspondientes a los niveles de TBARS, glutatión reducido, glutatión oxidado, porcentaje de glutatión oxidado respecto al glutatión total y glutatión peroxidasa, tras la administración oral de diferentes dosis de hidroxitirosol, en los cerebros de los animales diabéticos tras la Fase de Reoxigenación.

Dosis HT (mg/Kg/día)	TBARS (nmol/mg prot)	GSH (μ mol/g tejido)	GSSG (μ mol/g tejido)	%GSSG/GT	GSH-px (μ mol/min/g prot)
HT 0	1,33 \pm 0.08	5,66 \pm 0,32	1,5 \pm 0,08	21,13 \pm 0,81	1,5 \pm 0,6
HT 0,5	0,9 \pm 0.05*	5,76 \pm 0,35	1,72 \pm 0,23	22,61 \pm 1,89	0,97 \pm 0,07
HT 1	0,8 \pm 0.07*	5,63 \pm 0,39	1,57 \pm 0,08	22,13 \pm 0,79	0,72 \pm 0,10
HT 2,5	0,79 \pm 0.06*	5,98 \pm 0,35	1,65 \pm 0,08	21,82 \pm 0,66	1,16 \pm 0,17
HT 5	0,73 \pm 0.06*	5,92 \pm 0,46	1,54 \pm 0,11	20,94 \pm 1,02	1,03 \pm 0,15
HT 10	0,98 \pm 0.15* [#]	6,52 \pm 0,3	1,59 \pm 0,11	19,58 \pm 0,76	0.9 \pm 0,1

HT: hidroxitirosol, GSH: glutatión reducido, GSSG: glutatión oxidado, %GSSG/GT: porcentaje de glutatión oxidado respecto al glutatión total, GSH-px: glutatión peroxidasa.

* $p < 0,05$ vs. grupo no tratado; # $p < 0,05$ entre el grupo de tratamiento con 10 mg vs. 5 mg

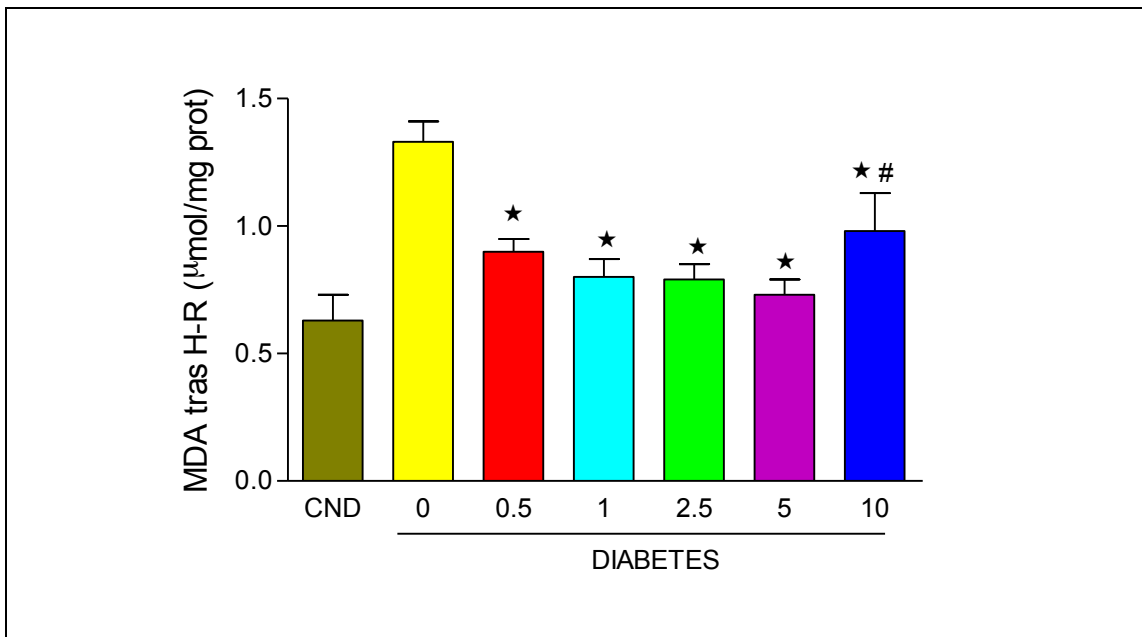


Figura 4.4.1.1. Representación gráfica de los valores de TBARS en animales no diabéticos y animales diabéticos que recibieron distintas dosis de hidroxitirosol.
* $p < 0,05$ vs. grupo no tratado

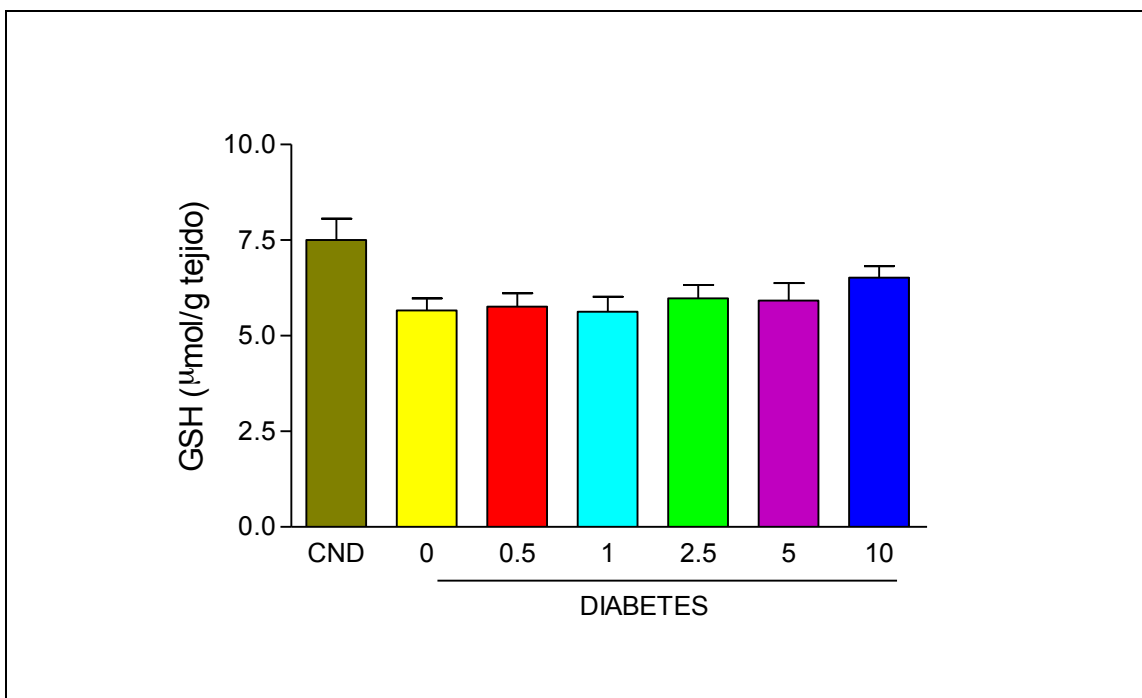


Figura 4.4.1.2. Representación gráfica de los valores de GSH en animales no diabéticos y animales diabéticos que recibieron distintas dosis de hidroxitirosol.

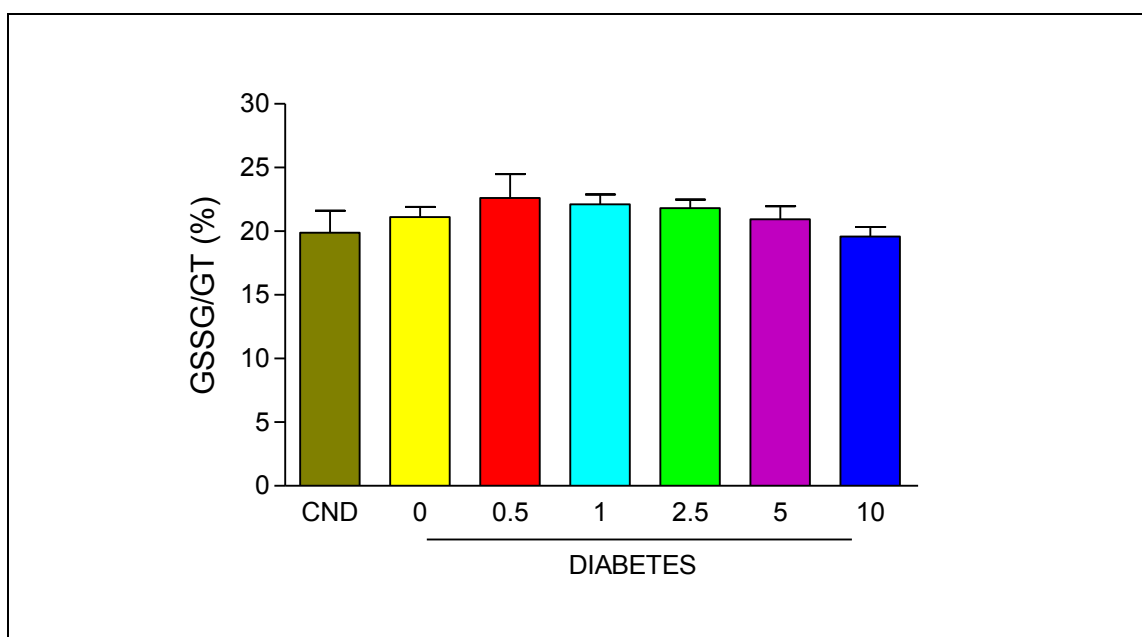


Figura 4.4.1.3. Representación gráfica del porcentaje de glutatión oxidado respecto al glutatión total en animales no diabéticos y animales diabéticos que recibieron distintas dosis de hidroxitirosol.

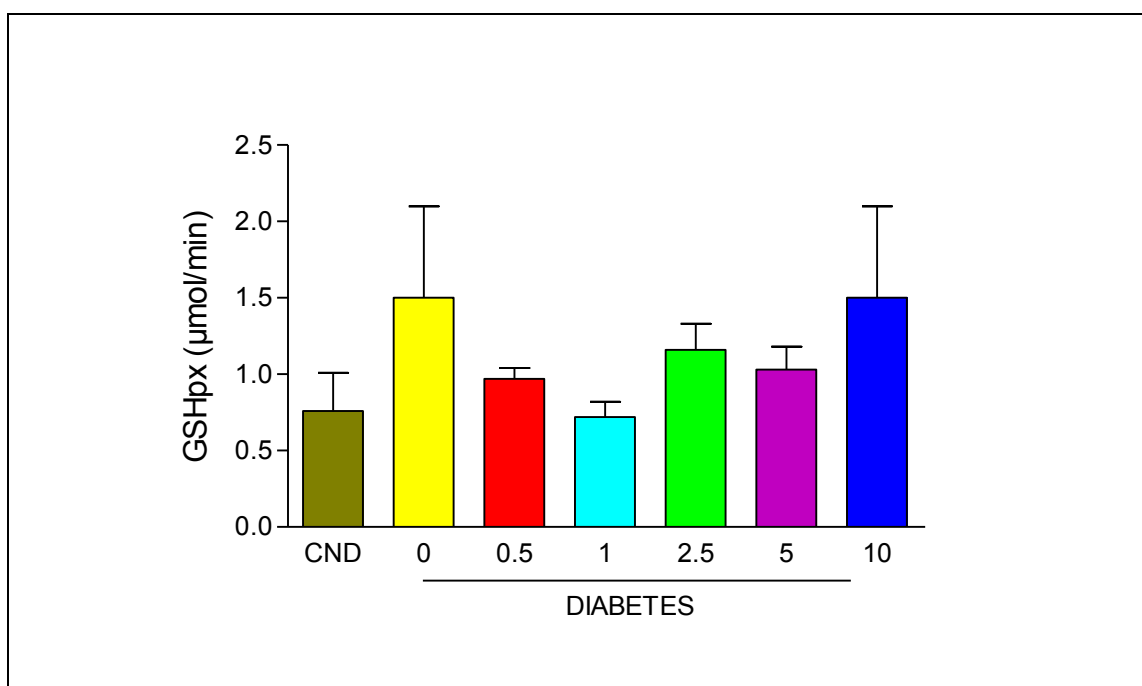


Figura 4.4.1.4. Representación gráfica de los valores de la enzima glutatión peroxidasa en animales no diabéticos y animales diabéticos que recibieron distintas dosis de hidroxitirosol. * $p < 0,05$ vs. grupo no tratado.

La administración de las distintas dosis de hidroxitirosol revierten el incremento de peroxidación lipídica, sin embargo no influyen sobre el potencial antioxidante.

4.4.2 VÍA DEL ÓXIDO NÍTRICO

En la Tabla 4.4.2.1 y Figuras 4.4.2.1 y 4.4.2.2 se muestran los valores correspondientes a los parámetros que representan óxido nítrico (concentraciones de nitratos y nitritos) y la producción de peroxinitritos en los cortes cerebrales después de 180 minutos de reoxigenación, en ratas sanas y ratas diabéticas (2 meses de evolución de su diabetes) tratadas durante 2 meses por vía oral con diferentes dosis de hidroxitirosol (0, 0.5, 1, 2,5, 5 y 10 mg/Kg/día).

Tabla 4.4.2.1. Valores (media y error estándar de la media) correspondientes a los niveles de nitratos y nitritos (cuantificación de óxido nítrico) y 3-nitrotirosina (cuantificación de peroxinitritos), tras la administración oral de diferentes dosis de hidroxitirosol, en los cerebros de los animales diabéticos tras la Fase de Reoxigenación.

Dosis HT (mg/Kg/día)	NO ₃ ⁻ + NO ₂ ⁻ (μmol/0.1 g tejido)	3-nitrotirosina (nmol/0.1 g tejido)
HT 0	10.2±1.24	6,92±0.79
HT 0,5	16.2±1.91 [#]	3,32±0.2*
HT 1	14.1±0.83	3,93±0.45*
HT 2,5	14.5±2.03	4,89±0.29 ^{*a}
HT 5	13.6±1.36	4,03±0.29*
HT 10	17.6±1.63 [#]	3,75±0.77*

HT: hidroxitirosol, NO₃⁻ + NO₂⁻ (nitritos+nitratos).

[#] p<0,05 entre los grupos con tratamiento 0.5 y 10 vs. 0 mg/Kg/día

* p<0,05 vs. grupo no tratado

^a p<0,05 entre el grupo de tratamiento con 2,5 mg vs. 0,5 mg/Kg/día

La administración de hidroxitirosol incrementa los niveles de óxido nítrico respecto al control sin tratamiento, si bien solo alcanza significación estadística para la dosis menor y mayor. Por otro lado, todas las dosis utilizadas disminuyen la 3-

nitrotirosina, es decir muestran un efecto significativo en relación con la producción de peroxinitritos, como sabemos importantes agentes radicalarios de elevada capacidad destructiva.

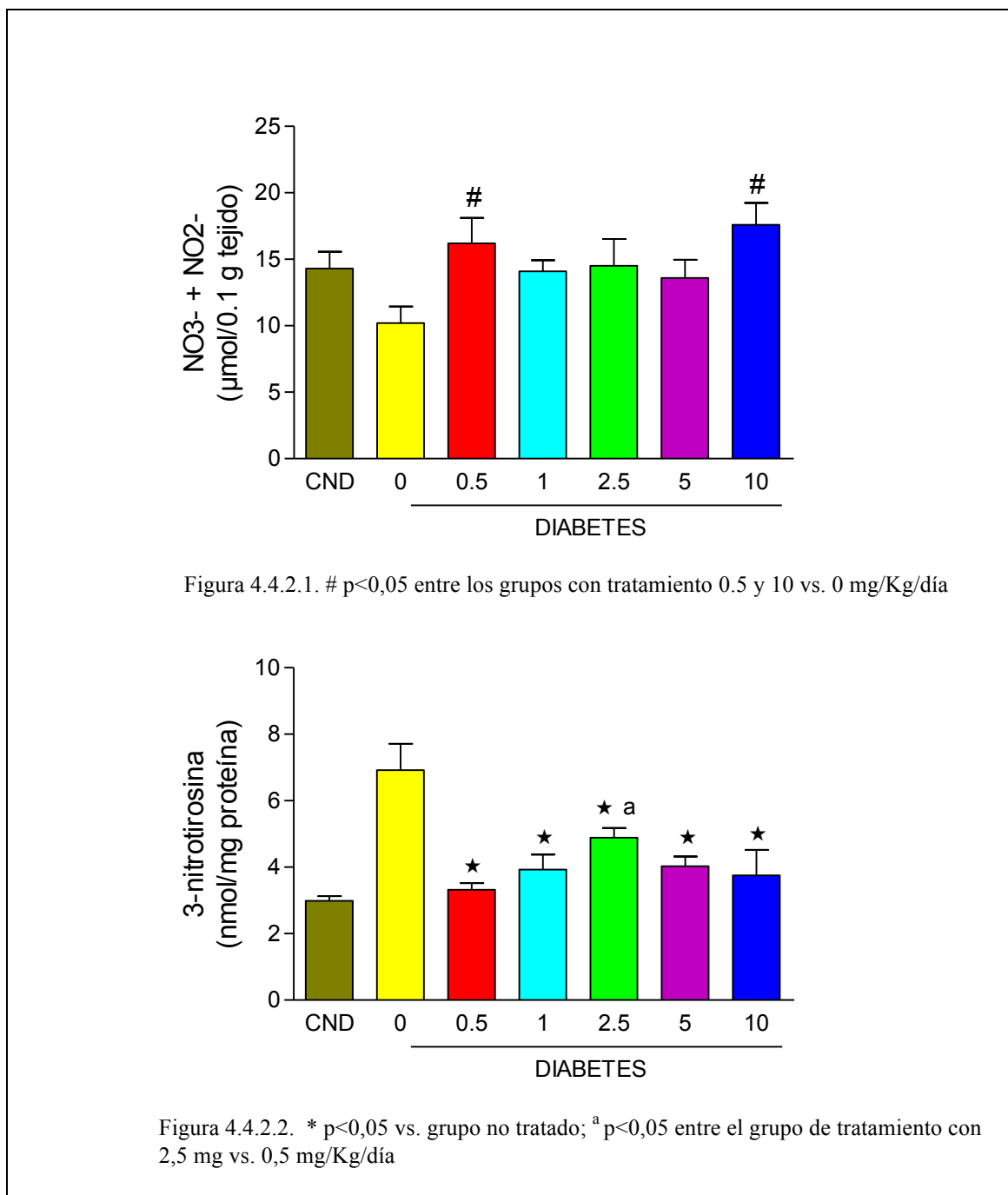


Figura 4.4.2.1. # $p < 0,05$ entre los grupos con tratamiento 0.5 y 10 vs. 0 mg/Kg/día

Figura 4.4.2.2. * $p < 0,05$ vs. grupo no tratado; ^a $p < 0,05$ entre el grupo de tratamiento con 2,5 mg vs. 0,5 mg/Kg/día

Figura 4.4.2.1 y 4.4.2.2. Representación gráfica de los valores óxido nítrico y peroxinitritos en animales no diabéticos y animales diabéticos que recibieron distintas dosis de hidroxitirosol.

4.4.3 MEDIADORES INFLAMATORIOS

En la Tabla 4.4.3.1 y Figuras 4.4.3.1 a 4.4.3.3 se muestran los valores correspondientes a los parámetros que representan los mediadores relacionados con la inflamación, prostaglandina E₂, interleucina 1 beta (ambos proinflamatorios) e interleucina 10 (antiinflamatorio) en los cortes cerebrales después de 180 minutos de reoxigenación, en ratas sanas y ratas diabéticas (2 meses de evolución de su diabetes) tratadas durante 2 meses por vía oral con diferentes dosis de hidroxitirosol (0, 0.5, 1, 2.5, 5 y 10 mg/Kg/día).

Tabla 4.4.3.1. Valores (media y error estándar de la media) correspondientes a los niveles prostaglandina E₂, interleucina 1 β e interleucina 10, tras la administración oral de diferentes dosis de hidroxitirosol, en los cerebros de los animales diabéticos tras la Fase de Reoxigenación.

Dosis HT (mg/Kg/día)	I-1 β (pg/0.1 g tejido)	I-10 (pg/0.1 g tejido)	PGE ₂ (pg/0.1 g tejido)
HT 0	9,69 \pm 0.54	2,45 \pm 0.22	104,83 \pm 4.52*
HT 0,5	9,15 \pm 0.38	1,92 \pm 0.21 ^e	84,56 \pm 4.22
HT 1	9,6 \pm 0.57	2,16 \pm 0.19 ^d	85,33 \pm 7.1
HT 2,5	5,52 \pm 0.25 ^{a,b}	3,01 \pm 0.35 ^d	89,28 \pm 10.26
HT 5	6,95 \pm 0.44 ^a	2,26 \pm 0.21	85,62 \pm 12.32
HT 10	10,91 \pm 0.55 ^c	2,78 \pm 0.28	82,07 \pm 7.6

* p<0,05 grupo control vs. todos los grupos de tratamiento

^a p<0,05 Grupos de tratamiento con 2,5 y 5 mg/Kg/día de HT vs. resto de los grupos

^b p<0,05 Grupo de tratamiento con 2,5 vs. 5 mg/Kg/día de HT

^c p<0,05, Grupo de tratamiento de 10 vs. 0,5 mg/Kg/día de HT

^d p<0,05 Grupo de tratamiento con 2,5 vs. 0,5, 1 y 5 mg/Kg/día de HT

^e p<0,05 Grupo de tratamiento con 0,5 vs. 10 mg/Kg/día de HT

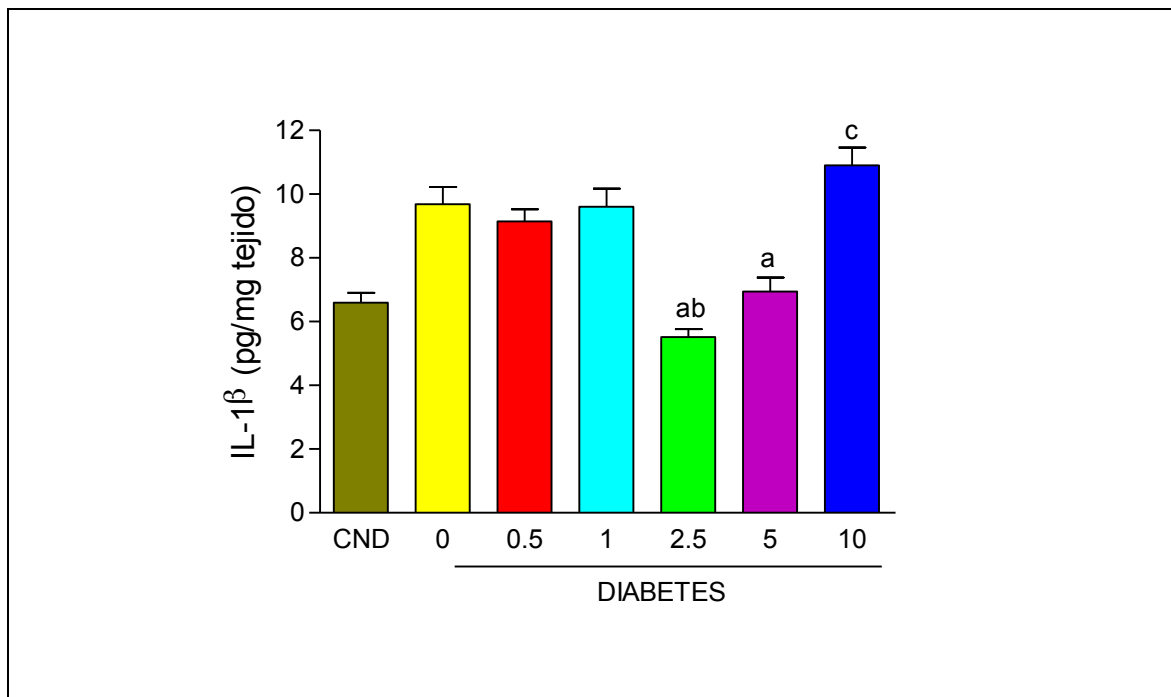


Figura 4.4.3.2. Representación gráfica de los valores interleucina 1 β en animales no diabéticos y animales diabéticos que recibieron distintas dosis de hidroxitirosol.

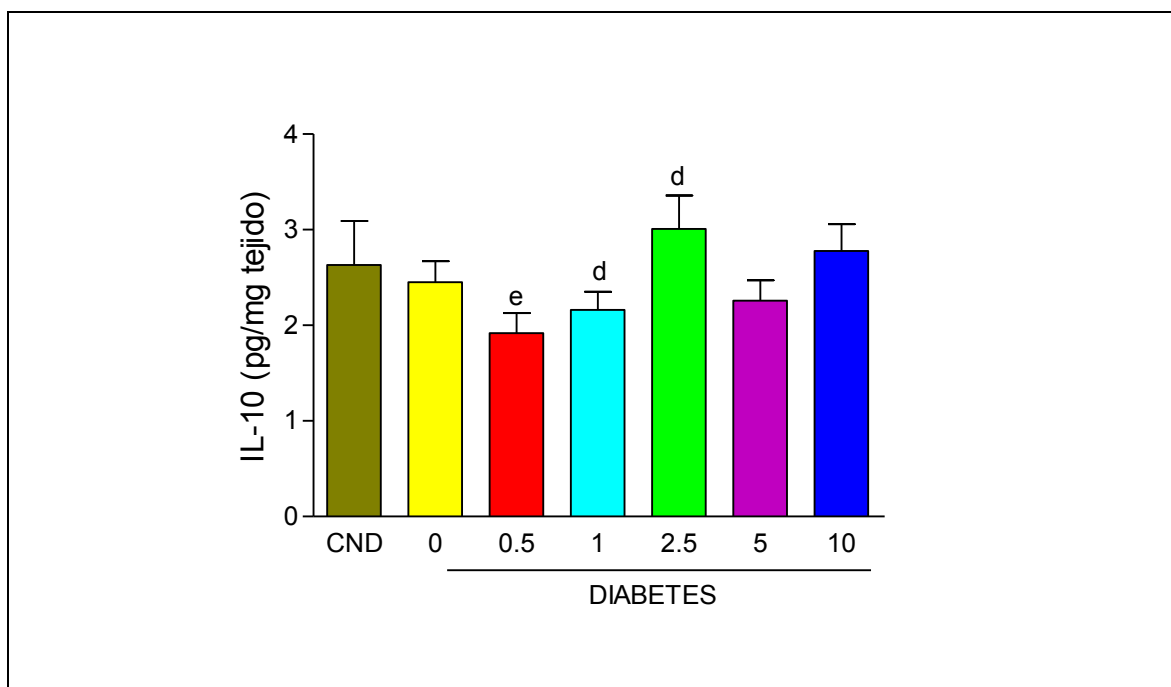


Figura 4.4.3.3. Representación gráfica de los valores interleucina 10 en animales no diabéticos y animales diabéticos que recibieron distintas dosis de hidroxitirosol.

Resultados

En relación con los parámetros relacionados con la inflamación, observamos como todas las dosis de hidroxitirosol reducen los niveles de PgE2 en tejido cerebral. Y, con respecto a los mediadores inflamatorios, sólo las dosis de 2,5 y 5 disminuyeron los niveles de IL-1 β , sin que hidroxitirosol muestre efecto sobre la IL-10 que, por otro lado, está poco afectada en el modelo experimental utilizado.

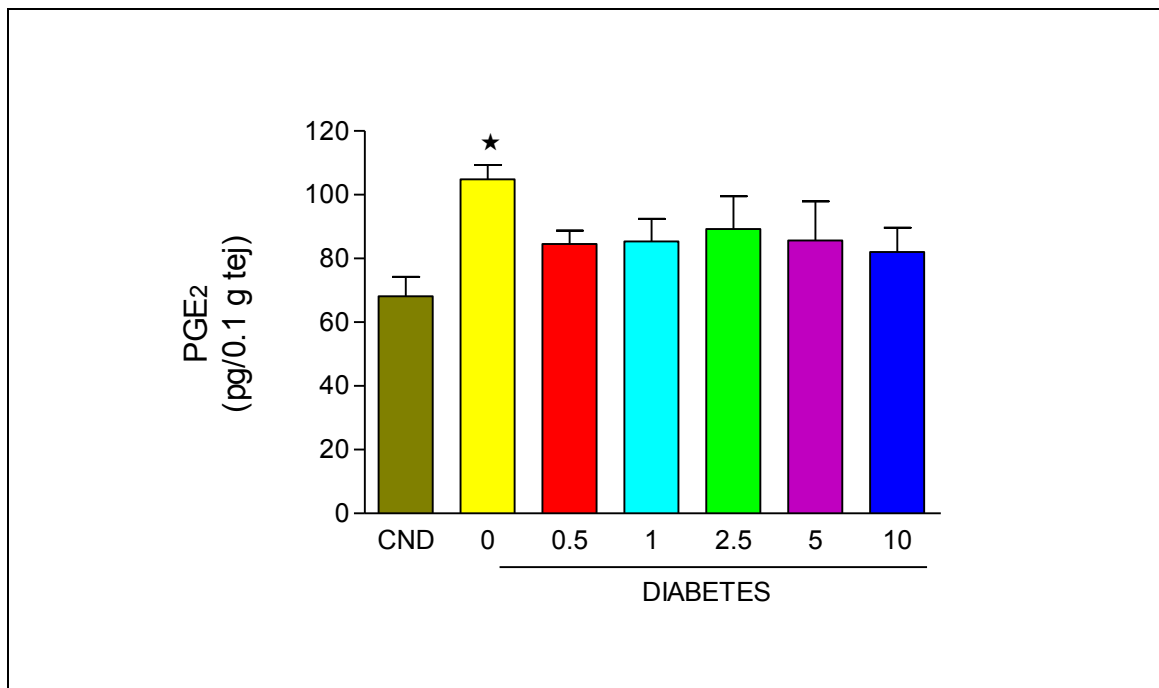


Figura 4.4.3.4. Representación gráfica de los valores de PgE2 en animales no diabéticos y animales diabéticos que recibieron distintas dosis de hidroxitirosol.

5. DISCUSIÓN

La diabetes mellitus es la endocrinopatía más frecuente en el mundo occidental y su importancia no solo radica en su alta prevalencia en la población mundial, sino que es necesario considerarla como un proceso multifactorial en su génesis, su evolución y sobre todo, en sus complicaciones. Dentro de éstas, posiblemente de una forma didáctica, podemos aseverar que la diabetes tipo I evoluciona generalmente hacia complicaciones crónicas de tipo microvascular, ya sea en la retina (retinopatía diabética), riñones (nefropatía diabética) o nervios periféricos (neuropatía diabética) y la diabetes tipo II presenta una mayor incidencia de complicaciones macroangiopáticas, es decir, un síndrome ateromatoso arterial más pronunciado en intensidad y precoz en el tiempo, respecto a la población no diabética.

En la fisiopatología de estas complicaciones se han barajado múltiples factores, tales como la propia hiperglucemia mantenida, tasas altas de colesterol (sobre todo su fracción LDL), acúmulo de productos finales de glicación, estímulo de la vía del sorbitol, etc. Todo ello tiende a producir una clara disfunción endotelial, alterando todas las funciones del endotelio, tales como el mantenimiento de la hemostasia sanguínea (fundamentalmente su función antitrombótica), el tono vascular y el control de la proliferación vascular (De Vriese y cols., 2000).

Una consecuencia directa de la disfunción endotelial es que los mecanismos habituales por los que el endotelio evita la formación de trombos intraluminales fallan, lo cual unido a un claro estímulo del funcionalismo plaquetario en la diabetes mellitus, origina un estado protrombótico, el cual explica la mayor incidencia de eventos trombóticos arteriales en los pacientes diabéticos (Carr, 2001).

A nivel cerebral, ya hemos revisado en la introducción de este trabajo la mayor incidencia de eventos isquémicos cerebrales en la población diabética. Es obvio que si aceptamos que existe una mayor tendencia ateromatosa y trombótica en estos pacientes, deduzcamos que también exista una mayor tendencia a la isquemia cerebral. No obstante, la pregunta clave que nos hicimos en los objetivos del presente estudio fue si el tejido cerebral en la diabetes también presenta una serie de características que lo hagan más sensibles al daño isquémico, respecto a un material procedente de un animal normoglucémico.

Discusión

Este fue el principal motivo para elegir el modelo experimental utilizado en este trabajo y no alguno en el que se produjese una isquemia in vivo, ya que de esta forma los resultados obtenidos podrían ser una mezcla de la influencia de la diabetes sobre el tejido cerebral y sobre los parámetros de hemostasia sanguínea y función vascular.

Respecto al método utilizado en relación con los fármacos analizados, también se obvia un posible efecto de éstos sobre la circulación sanguínea (la agresión anóxica y el efecto farmacológico se ejerce directamente sobre el tejido cerebral) y que ha sido demostrado que se activan las mismas vías de daño celular que en modelos in vivo o en diversos sistemas de neurotoxicidad (Moro y cols., 1998; De La Cruz y cols., 2002).

Por otra parte, no sólo quisimos valorar el efecto lesivo de la hipoxia y el neuroprotectivo de hidroxitirosol, sino que intentamos averiguar su posible efecto en algunas de las vías de daño celular en el proceso de hipoxia-reoxigenación. Para ello nos planteamos un esquema simplista, pero posiblemente cercano a la realidad, en el cual distinguimos tres niveles de actuación bioquímica para que este proceso produzca daño en el tejido cerebral:

- En primer lugar, la liberación de factores quimiotácticos y aminoácidos excitatorios.
- En segundo lugar el acúmulo de calcio citoplasmático.
- Por último, las consecuencias de los pasos anteriores, es decir: estímulo de enzimas inducibles (ciclooxigenasa tipo 2, iNOS), de la síntesis de prostaglandinas tisulares (como la PGE₂) y activación de la producción de radicales libres y por ende de estrés oxidativo.

Fue el tercer escalón el motivo de nuestro trabajo, por lo que analizamos tres tipos de mecanismos de daño celular:

- a) Producción de estrés oxidativo, tanto en su vertiente oxidativa como en el estudio de la capacidad antioxidante celular.
- b) Cuantificación de mediadores inflamatorios: prostaglandina E₂ e interleucinas (una proinflamatoria -IL-1 β - y otra antiinflamatoria -IL-10-).
- c) Vía del óxido nítrico, valorando la producción global y la formación de radicales libres derivados del óxido nítrico (RNOS).

De especial importancia consideramos las modificaciones del estrés oxidativo, ya que no sólo pueden producir daño celular a través de la peroxidación lipídica, sino que a su vez modulan la producción de otros mediadores citotóxicos, incluyendo los aminoácidos excitadores, la síntesis de prostaglandinas o favoreciendo la formación de peroxinitritos (radicales libres derivados de la reacción del NO con el anión superóxido).

Respecto a la dosificación del hidroxitirosol, nos basamos en estudios anteriores de nuestro grupo en los que se utilizaba el mismo modelo experimental, pero en ratas sanas (Cabrerizo et al., 2013; González-Correa et al., 2008, Muñoz-Marín et al., 2012). En estos estudios, el rango de dosis más óptimo en cuanto a efectos neuroprotectores fue 5-10 mg/kg/día, no obstante quisimos incluir una dosis inferior al no existir datos en la bibliografía sobre dosificación de hidroxitirosol en animales diabéticos.

Abordaremos el análisis de los principales resultados atendiendo a los siguientes apartados: 1) respuesta del tejido cerebral de los animales diabéticos frente al modelo de hipoxia-reoxigenación, 2) análisis del efecto neuroprotector de hidroxitirosol y 3) vías bioquímicas modificadas en tejido cerebral de animales diabéticos tratados con hidroxitirosol y sometidos al modelo experimental de hipoxia-reoxigenación.

Analizaremos a continuación el **grado de afectación cerebral en el modelo de hipoxia-reoxigenación en los animales diabéticos**, es decir, intentar contestar a la cuestión de si el tejido cerebral en la diabetes es más sensible al daño producido en un posible evento isquémico.

Lo primero que debemos observar es si realmente existe una mayor tasa de muerte celular en los animales diabéticos tras la hipoxia-reoxigenación. Efectivamente, si observamos los niveles de LDH (signo indirecto de muerte celular) a los 180 min de reoxigenación tras la anoxia, apreciamos este hecho: en los animales no diabéticos se obtuvieron cifras de LDH de 2.41 ± 0.09 UA frente a 3.77 ± 0.29 UA en los animales diabéticos ($p < 0.05$).

A la vista de estos datos, podemos asegurar que el tejido cerebral de los animales diabéticos sufre un mayor daño, en términos de muerte celular, que los no diabéticos, cifrándose éste aproximadamente en un 56.4%, respecto a los animales no diabéticos.

En este sentido encontramos diversos trabajos en la bibliografía consultada, que demuestran una mayor susceptibilidad de las neuronas o tejido cerebral diabético al

daño isquémico, respecto a una situación de normoglucemia. Así, Tekkök y cols. (1998) demostraron que cortes de hipocampo cerebral de ratas estreptozotocin-diabéticas muestran una menor velocidad de transmisión sináptica al someterlos a un déficit de glucosa, que las sinapsis equivalentes en animales no diabéticos. Respecto a modelos de isquemia in vivo, son más numerosos los trabajos que se han realizado comparando la sensibilidad de los cerebros de ratas diabéticas respecto a las normales, ya sea tras una isquemia transitoria originada por ligadura de las carótidas comunes (Li y cols., 1998) o de la arteria cerebral media, de una forma transitoria (Muranyi y cols., 2003) o permanente (Wang y cols., 2001). En todos los casos se concluye que el daño neuronal, fundamentalmente valorado histológicamente, es mayor en los animales estreptozotocin-diabéticos, encontrándose una mayor graduación de muerte neuronal, así como un incremento en los parámetros que definen y marcan el grado de apoptosis neuronal (Muranyi y cols., 2003). Por último, nuestro grupo de trabajo ha demostrado que en animales diabéticos con distintos tiempos de evolución y utilizando el mismo modelo experimental del presente estudio, el daño cerebral era siempre mayor que en ratas sanas, cifrándose en un 49.8% más en animales diabéticos respecto a los sanos (González-Correa et al., 2006).

Por lo tanto, podemos aseverar que en la diabetes experimental inducida con estreptozotocina (equivalente a la tipo I humana), el tejido cerebral es más sensible a la hipoxia-reoxigenación (equivalente a la isquemia-reperfusión), respecto a los animales normoglucémicos.

Una vez demostrada esta diferencia tisular, pasamos a valorar si las **vías bioquímicas que participan en la fisiopatología del proceso de hipoxia-reoxigenación** también se comportan de forma diferente en los animales diabéticos.

El proceso de hipoxia-reoxigenación, no solo incrementa la tasa de muerte celular cerebral, sino que los parámetros de estrés oxidativo se encuentran más desequilibrados en los animales diabéticos respecto a los normoglucémicos. Así, la reoxigenación incrementa la producción de peróxidos lipídicos (111% respecto a los animales normoglucémicos) y disminuye el contenido de glutatión cerebral (11.7% menor en los animales diabéticos) en mayor medida, presentando un mayor intento de defensa antioxidante debido a un mayor daño peroxidativo (11.7% mayor producción de GSSG y 99.8% mayor actividad GSH peroxidasa), si bien este intento de reacción no es efectivo debido al mayor daño oxidativo en los animales diabéticos, hecho que no puede

compensar el intento de reacción antioxidante, posiblemente debido al agotamiento de los depósitos cerebrales de GSH. En este sentido, Santos y cols. (2001) demostraron que las mitocondrias de cerebros e hígado de ratas diabéticas (modelo experimental de tipo II) muestran una mayor sensibilidad para el acúmulo de peróxidos lipídicos ante una agresión oxidativa, acompañada de un descenso del contenido de sustancias antioxidantes, tales como la vitamina E o la coenzima Q.

En conjunto, los cerebros de los animales diabéticos muestran un estrés oxidativo mayor en el modelo de hipoxia-reoxigenación que los procedentes de animales no diabéticos, lo cual los hace más susceptibles al daño celular demostrado por los resultados de LDH.

Respecto a los mediadores inflamatorios, el acúmulo de prostaglandinas cerebrales ocasionado por la reoxigenación posthipóxica es mayor en los animales diabéticos que en los normoglucémicos (53% mayor en los animales diabéticos). En este sentido, se ha demostrado que en tejido cerebral de rata, en la diabetes experimental se muestra una disminución significativa de la síntesis de prostaciclina y una tendencia al incremento en la de tromboxano A₂ y prostaglandina E₂ (González-Correa et al., 2006; Jeremy y cols., 1987; Zhang et al., 2003).

Respecto a la producción de IL-1 β sigue el mismo patrón que el de prostaglandina E₂: los animales diabéticos producen un 47% más de este mediador proinflamatorio que los no diabéticos, tras la reoxigenación. Asimismo, la concentración de la interleucina antiinflamatoria IL-10 fue un 28.6% menor en los animales diabéticos. En este sentido, se ha postulado que el proceso de la diabetes origina una disregulación de los mediadores inflamatorios, tanto en su regulación nuclear como en la expresión y producción de interleucinas cerebrales (Kim et al., 2014), lo cual coincide plenamente con los resultados obtenidos en el presente trabajo.

Por lo tanto, las vías bioquímicas inflamatorias de daño celular en la isquemia-reperfusión también se ve alterada, lo cual podría participar en el mayor grado de muerte celular en dicho modelo experimental en los animales diabéticos.

Respecto a la vía del óxido nítrico, la producción global de este mediador en el tejido cerebral de los animales diabéticos es similar en los animales diabéticos y en los normoglucémicos. Este mediador endógeno es neuroprotector hasta una cierta concentración, para ser neurotóxico a partir de otra mayor. El límite entre ambas lo establece la producción de peroxinitritos, potentes radicales libres derivados del óxido nítrico, que se forman por la reacción de éste con radicales libres (aumentados en dicho modelo). Efectivamente, la producción específica de peroxinitritos se vio incrementada en un 130% en los animales diabéticos respecto a los no diabéticos. Este resultado no es extraño debido a dos motivos fundamentales: los animales diabéticos producen más estrés oxidativo tras la reoxigenación y en un trabajo de nuestro grupo en este mismo modelo experimental, se demostró que la actividad iNOS estaba claramente aumentada en los cerebros de animales diabéticos tras la reoxigenación (González-Correa et al., 2006).

Por lo tanto, el mayor estrés oxidativo tisular, la mayor producción de mediadores inflamatorios y la estimulación de la producción de peroxinitritos, plantea un escenario cerebral en los animales diabéticos que justifican el mayor daño celular observado tras la hipoxia-reoxigenación.

Habida cuenta que hidroxitirosol ha demostrado algún tipo de efecto sobre las vías bioquímicas afectadas en los animales diabéticos, pasaremos a comentar el efecto de este polifenol sobre el daño tisular cerebral en nuestro modelo experimental. En primer lugar valoraremos el **posible efecto neuroprotector de hidroxitirosol en los animales diabéticos en el modelo de hipoxia-reoxigenación.**

La producción de LDH fue reducida por todas las dosis de hidroxitirosol, no apreciándose una clara relación dosis-efecto. En general, la prevención de la muerte celular cerebral tras la hipoxia-reoxigenación se cifró en un rango de 25.9-38.7%. Es decir, hidroxitirosol muestra un efecto neuroprotector en este modelo experimental en los animales diabéticos.

El efecto neuroprotector de los polifenoles contenidos en diversos tipos de alimentos ha sido documentado en la bibliografía utilizando diversos métodos experimentales (Craggs y Kalaria, 2011; Kamat y cols, 2008). Estos estudios han relacionado este efecto principalmente con las conocidas propiedades antioxidantes de los polifenoles, aunque también se han postulado otros mecanismos adicionales para

algunos de estos compuestos, por ejemplo, la inhibición de mediadores inflamatorios o acumulación de prostaglandinas (Simonyi y cols., 2005).

Este efecto es consistente con la neuroprotección observada tras la administración de aceite de oliva virgen a ratas sanas en el mismo modelo de hipoxia-reoxigenación (González-Correa y cols., 2007). Además, se ha demostrado que un extracto obtenido de las aguas de lavado de aceitunas y hojas de olivo, que contenía un 45,5% de hidroxitirosol poseía efectos neuroprotectores en un modelo de la toxicidad química inducida con sales de hierro o donadores de óxido nítrico en cultivos de células cerebrales disociadas (Schaffer y cols., 2007).

El efecto citoprotector de estos polifenoles ha sido demostrado en otros tipos celulares no neuronales. En cultivos de células HepG2, hidroxitirosol y algunos derivados eterificados han mostrado un efecto citoprotector (Goya y cols., 2007) en presencia del agente citotóxico ter-butil hidroperóxido (t-BOOH) (Pereira-Caro y cols., 2011).

Por lo tanto, la administración precoz de hidroxitirosol previene del daño cerebral tras hipoxia-reoxigenación en animales diabéticos. Respecto al efecto observado previamente en animales normoglucémicos, porcentualmente se puede cifrar en un efecto neuroprotector similar, ya que en éstos se obtuvieron cifras de reducción de LDH del 36-38% con dosis de 10 y 20 mg/kg/día y en los animales diabéticos un máximo del 38.7% con 2.5 mg/kg/día, si bien, como ya indicamos, no se aprecia una clara relación dosis-efecto.

En tercer lugar, analizaremos cómo **hidroxitirosol modifica las principales vías de daño cerebral en el modelo experimental de hipoxia reoxigenación cerebral en los animales diabéticos.**

La administración de hidroxitirosol a los animales diabéticos redujo el estrés oxidativo después de la reoxigenación en nuestro modelo experimental, fundamentalmente mediante una inhibición de la peroxidación lipídica, estimulada en los animales diabéticos. Al igual que con la LDH, no se aprecia una clara relación dosis-efecto, cifrándose su efecto antiperoxidativo en un rango del 32.3-45.1%.

El efecto antioxidante del HT ha sido ampliamente demostrada tanto en experimentos químicos como en medios biológicos (Lee et al., 2010; Raederstorff, 2009; Visioli & Bernardini, 2011). En cuanto al mecanismo por el cual hidroxitirosol

Discusión

puede ejercer su efecto antioxidante, se han postulado diversas vías de actuación, incluyendo un efecto eliminador de peróxido de hidrógeno y aniones hidroxilo, y la activación de la Nrf2, HO-1 y las vías JNK-p62/SQSTM1 (Fabiani et al., 2011; O'Dowd et al., 2004; Zou et al., 2011; Zrelli et al., 2011). Algunos estudios, sobre todo in vitro y tras estimulación química del estrés oxidativo en cultivos celulares, han demostrado que hidroxitirosol puede recuperar los niveles de glutatión deplecionados tras la inducción oxidativa (Pereira-Caro et al., 2011). Asimismo, nuestro grupo demostró este mismo efecto sobre los niveles de glutatión en animales normoglucémicos tras hipoxia-reoxigenación cerebral (Cabrerizo et al., 2013). No obstante, en los animales diabéticos del presente estudio no hemos podido apreciar un efecto de hidroxitirosol sobre el sistema del glutatión cerebral tras la hipoxia-reoxigenación. Posiblemente en la diabetes se produzca un deterioro de los sistemas de control de este tripéptido antioxidante que sea incapaz el hidroxitirosol de recuperarlo. Es decir, el efecto antioxidante de este polifenol en los animales diabéticos parece centrarse en una inhibición de la peroxidación lipídica cerebral.

Respecto a las vías inflamatorias cerebrales, la administración de hidroxitirosol redujo la producción de interleucina 1 β y de prostaglandina E₂, pero no modificó la de interleucina 10.

Algunos estudios han demostrado que la incubación con hidroxitirosol inhibe la expresión y la liberación de interleucinas (Cabrerizo et al., 2013; Zhang et al., 2009) y la expresión y actividad de la óxido nítrico sintasa inducible en leucocitos sanguíneos (González-Correa y cols., 2009; Zhang y cols., 2009) y concretamente el hidroxitirosol reduce la citotoxicidad neuronal causada por los donantes de óxido nítrico (Schaffer y cols., 2007). Por lo tanto estos mecanismos, principalmente la inhibición de la concentración tisular de PGE₂ podrían contribuir, de forma secundaria al efecto antioxidante, para obtener un efecto citoprotector en el modelo experimental utilizado en este estudio.

Un dato a destacar es la reversión del efecto inhibitor de los mediadores inflamatorios con la dosis de 10 mg/kg/día. Este fenómeno ocurre con la mayoría de los antioxidantes, ya que al aumentar la concentración/dosis de los mismos se tornan en compuestos pro-oxidantes. Al relacionarse el estrés oxidativo con los mediadores inflamatorios, podríamos pensar que el comportamiento sobre el estrés oxidativo se traduciría en el mostrado sobre los mediadores inflamatorios. No obstante, este efecto

debe ser más profundamente estudiado, ya que en el perfil de inhibición de la peroxidación lipídica no pudimos apreciar con claridad esta reversión del efecto.

Por último, en línea con los resultados sobre el estrés oxidativo cerebral, la producción de peroxinitritos tras la hipoxia-reoxigenación es inhibida tras la administración de hidroxitirosol a los animales diabéticos, asimismo sin apreciar una clara relación dosis-efecto. Como expresamos anteriormente, se ha demostrado que hidroxitirosol inhibe la expresión y regulación de actividades enzimáticas inducibles, entre las que se encuentra la iNOS (González-Correa y cols, 2009; Zhang y cols., 2009), por lo que es lógico pensar que disminuya la producción de peroxinitritos, además de por una disminución en la producción de radicales libres. El menor efecto sobre la producción global de óxido nítrico podría deberse a un menor efecto de hidroxitirosol sobre enzimas constitutivas, las cuales están menos afectadas en los procesos de isquemia cerebral.

Para finalizar, trataremos dos aspectos finales. En primer lugar, cabría pensar que hidroxitirosol pudiera ejercer este efecto neuroprotector en parte por una modificación del estado glucémico de estos animales. Este efecto queda descartado al comprobar que ninguna de las dosis utilizadas modifica la glucemia de los animales en nuestro estudio. En segundo lugar, para ejercer un efecto neuroprotector, hidroxitirosol debe penetrar en el tejido cerebral. La biodisponibilidad de este polifenol después de la administración oral como tal compuesto o como un componente del aceite de oliva virgen, ha sido bien documentado (Fitó et al., 2007). Por otra parte, se ha detectado hidroxitirosol en tejido cerebral después de la inyección intravenosa de ^{14}C hidroxitirosol (Serra et al., 2012) o después de la administración oral de un extracto fenólico procedente del aceite de oliva (Sánchez-Fidalgo et al., 2012).

Por lo tanto, nuestro estudio demuestra que la administración precoz de hidroxitirosol a animales diabéticos produce un efecto neuroprotector en un modelo experimental de hipoxia-reoxigenación. Teniendo en cuenta la mayor incidencia de ictus isquémicos en pacientes afectados de diabetes mellitus, ésta podría ser una estrategia futura de prevención, si bien son necesarios estudios más completos y profundos al respecto para confirmar esta posibilidad.

6. CONCLUSIONES

Del análisis pormenorizado de los resultados obtenidos en el presente estudio, hemos extraído las siguientes conclusiones:

1. Hidroxitirosol presenta efecto neuroprotector en un modelo experimental de hipoxia-reoxigenación
2. Los mecanismos bioquímicos implicados en el efecto neuroprotector de hidroxitirosol incluyen la reducción del estrés oxidativo y nitrosativo, así como las vías de mediadores inflamatorios de daño cerebral.
3. Hidroxitirosol no presenta un efecto neuroprotector dosis dependiente.

Conclusiones

7. PROSPECTIVA

Finalizado el estudio, quedan aun campos por investigar y metas por alcanzar. Hemos demostrado que hidroxitirosol ejerce un efecto neuroprotector en animales diabéticos. Conocíamos de estudios previos el papel de hidroxitirosol sobre el daño cerebral en animales sanos, valorado mediante el modelo de hipoxia-reoxigenación. Con el presente estudio se establece de forma clara que la administración de hidroxitirosol puede aminorar el daño cerebral en un modelo experimental “ex vivo” . ¿Qué necesitamos investigar a partir de esta evidencia?

Respondiendo a la pregunta anterior, nos deberíamos centrar en los siguientes aspectos:

Evaluar que influencia ejerce hidroxitirosol en la disfunción endotelial e inflamación vascular, circunstancias que se relacionan directamente con la mayor sensibilidad del tejido cerebral a situaciones de isquemia.

Valorar mediante estudios “in vivo” el papel del polifenol en la prevención del daño cerebral, integrando el efecto vascular y cerebral en un mismo modelo experimental. Este tipo de estudio permitirá evaluar paralelamente parámetros de eficacia relacionados con la funcionalidad del animal.

8. BIBLIOGRAFÍA

- Akopov SE, Simonian NA, Griforian GS. Dynamics of polymorphonuclear leukocyte accumulation in acute cerebral infarction and their correlation with brain tissue damage. *Stroke*. 1996; 27: 1739-43.
- Al-Abrash AS, Al-Quobaili FA, Al-Akhras GN. Catalase evaluation in different human diseases associated with oxidative stress. *Saudi Med J* 2000; 21:826-30.
- Alvarez Sabín J, Alonso de Leciñana M, Gállego J, Gil-Peralta A, Casado I, Castillo J, Díez Tejedor E, Gil A, Jiménez C, Lago A, Martínez-Vila E, Ortega A, Rebollo M, Rubio F; Grupo de Estudio de las Enfermedades Cerebrovasculares de la Sociedad Española de Neurología. Plan for stroke healthcare delivery. *Neurologia*. 2006 Dec;21(10):717-26.
- Ames AI, Wright RL, Kowada M, Thurston JM y Majno G. Cerebral ischemia II. The no-reflow phenomenon. *Am J Pathol*. 1968; 52: 437-53.
- Amito MJ, Fleuriet A, Macheix JJ. Importance and evolution of phenolics compounds in olive during growth and maturation. *J Agric Food Chem*. 1996; 34: 823-6.
- Arai K, Maguchi S, Fujii S, Ishibashi H, Oikawa K, Taniguchi N. Glycation and inactivation of human Cu, Zn-SOD. Identification of the in vitro glycate sites. *J Biol Chem* 1987; 262:16972-9.
- Arango-Dávila C, Escobar-Betancourt M, Cardona-Gómez GP, Pimienta-Jiménez H. Fisiopatología de la isquemia cerebral focal: aspectos básicos y proyección a la clínica. *Rev Neurol*. 2004; 39: 156-65.
- Arnold JL. Stroke, Ischemic. 2005. <http://www.emedicine.com/emerg/topic558.htm>.
- Aydin A, Orhan H, Sayal A, Ozata M, Sahin G, Isimer A. Oxidative stress and nitric oxide related parameters in type II diabetes mellitus: effects of glycemic control. *Clin Biochem* 2001; 34:65-70.

Bibliografía

- Baldwin JS, Lee L, Leung TK, Muruganandam A, Mutus B. Identification of the site of nonenzymatic glycation of glutathione peroxidase: rationalization of the glycation-related catalytic alterations on the basis of three-dimensional protein structure. *Biochim Biophys Acta* 1995; 1247:60-4.
- Bardell AL, MacLeod KM. Evidence for inducible nitric-oxide synthase expression and activity in vascular smooth muscle of streptozotocin-diabetic rats. *J Pharmacol Exp Ther*. 2001; 296:252-9.
- Belayev L, Zhao W, Busto R, Ginsberg MD. Transient middle cerebral artery occlusion by intraluminal suture. Three dimensional autoradiographic image-analysis of local cerebral glucose metabolism-blood flow interrelationships during early ischemia and early recirculation. *J Cereb Blood Flow Metab*. 1997; 17: 1266-80.
- Bishai I & Cocean F. Eicosanoid formation in the rat cerebral cortex. Contribution of neurons and glia. *Mol Chem Neuropathol*. 1992; 17: 219-38.
- Bitler, CM, Viale TM, Damaj B & Crea R. Hydrolyzed olive vegetation water in mice has anti-inflammatory activity. *J Nutr*. 2005; 135 (6):1475-9.
- Blakytyn R, Harding JJ. Glycation (non-enzymic glycosylation) inactivates glutathione reductase. *Biochem J* 1992; 288:303-7.
- Burch RM, Axelrod J. Dissociation of bradykinin-induced prostaglandin formation from phosphatidylinositol turnover in Swiss 3T3 fibroblast: Evidence for G protein regulation of phospholipase A2. *Proc Natl Acad Sci. USA*. 1987; 84: 6374-8.
- Cabiscol E, Tamarit J, Ros J. Oxidative stress in bacteria and protein damage by reactive oxygen species. *Int Microbiol*. 2000; 3 (1):3-8.
- Cabrerizo S, De La Cruz JP, López-Villodres JA, Muñoz-Marín J, Guerrero A, Reyes JJ, Labajos MT, González-Correa JA. Role of the inhibition of oxidative stress and inflammatory mediators in the neuroprotective effects of hydroxytyrosol in rat brain slices subjected to hypoxia-reoxygenation. *J Nutr Biochem*. 2013 Dec; 24 (12):2152-7. doi: 10.1016/j.jnutbio.2013.08.007.

- Cabrerizo S1, De La Cruz JP, López-Villodres JA, Muñoz-Marín J, Guerrero A, Reyes JJ, Labajos MT, González-Correa JA. Role of the inhibition of oxidative stress and inflammatory mediators in the neuroprotective effects of hydroxytyrosol in rat brain slices subjected to hypoxia reoxygenation. *J Nutr Biochem.* 2013; 24:2152-2157.
- Cachofeiro V, Miana M, Martín B, De los Heras N, Lahera V. Obesidad, inflamación y disfunción endotelial. *Rev Esp Obes.* 2006;4(4):195-204.
- Cai H, Griending KK, Harrison DG. The vascular NAD(P)H oxidases as therapeutic targets in cardiovascular diseases. *Trends Pharmacol Sci.* 2003; 24: 471-8.
- Calver A, Collier J, Vallance P. Inhibition and stimulation of nitric oxide synthesis in the human forearm arterial bed of patients with insulin-dependent diabetes. *J Clin Invest.* 1992; 90:2548-54.
- Candelario-Jalil E, González-Falcón A, García-Cabrera M, Alvarez D, Al-Dalain S, Martínez G, León OS, Springer JE. Assessment of the relative contribution of COX-1 and COX-2 isoforms to ischemia-induced oxidative damage and neurodegeneration following transient global cerebral ischemia. *J Neurochem.* 2003; 86: 545-55.
- Cardona-Gómez GP, Arango-Dávila C, Gallego-Gómez JC, Pimienta H, García-Segura LM. Estrogen inhibits glycogen synthase kinase-3b and modulates the interaction of the microtubule-associated protein Tau with glutamate receptor subunits in post-ischemic hippocampus: implications for hormonal neuroprotective mechanisms. *Mol Brain Res.* 2004; 25: 178-87.
- Carr ME. Diabetes mellitus: a hypercoagulable state. *J Diabetes Complications* 2001; 15: 44-54.
- Castillo J, Martí-Vilalta JL, Martínez-Vila E, Matías-Guiu J. 1999. Manual de enfermedades vasculares cerebrales. Ed JIMS, Barcelona, España.
- Castillo J, Martínez-Vila E, Naveiro J, Vázquez C. Thrombolysis and neuroprotection in cerebral ischemia. Future perspectives. *Rev Clin Esp.* 1996; 196: 29-36.

Bibliografía

- Castillo J, Rodríguez I. Biochemical changes and inflammatory response as markers for brain ischemia: molecular markers of diagnostic utility and prognosis in human clinical practice. *Cerebrovasc Dis.* 2004; 17: 7-18.
- Cave AC, Brewer AC, Narayanapanicker A, Ray R, Grieve DJ, Walker S, Shah AM. NADPH oxidases in cardiovascular health and disease. *Antioxid Redox Signal.* 2006; 8:691-728.
- Ceriello A, Bortolotti N, Falletti E, Taboga C, Tonutti L, Crescentini A, Motz E, Lizzio S, Russo A, Bartoli E. Total radical-trapping antioxidant parameter in NIDDM patients. *Diabetes Care* 1997; 20:194-7.
- Ceriello A, Dello RP, Amstad P, Cerutti P. High glucose induces antioxidant enzymes in human endothelial cells in culture. Evidence linking hyperglycemia and oxidative stress. *Diabetes* 1996; 45:471-7.
- Chakrabarti S, Cukiernik M, Hileeto D, Evans T, Chen S. Role of vasoactive factors in the pathogenesis of early changes in diabetic retinopathy. *Diabetes Metab Res Rev.* 2000; 16:393-407.
- Chiaki Yokota, Tomohito Kaji, Yuji Kuge, Hiroyasu Inoue, Nagara Tamaki, Kazuo Minematsu. Temporal and topographic profiles of cyclooxygenase-2 expression during 24 h of focal brain ischemia in rats. *Neurosci Lett.* 2004; 357: 219-22.
- Chou WH, Choi DS, Zhang H, Mu D, McMahon T, Kharazia VN, Lowell CA, Ferriero DM, Messing RO. Neutrophil protein kinase Cdelta as a mediator of stroke-reperfusion injury. *J Clin Invest.* 2004; 114 (1):49-56.
- Cimato A., Mattei A., Osti M. Variation of polyphenol composition with harvesting period. *Acta Hortoculturae.* 1990; 286: 453-6.
- Clark JB, Hayes DJ, Morgan-Hughes JA, Byrne E. Mitochondrial myopathies: disorders of the respiratory chain and oxidative phosphorylation. *J Inherit Metab Dis.* 1984; 7 (1):62-8.
- Clavier N, Kirsch JR, Hurn PD, Traystman RJ. Effect of postischemic hypoperfusion on vasodilatory mechanisms in cats. *Am J Physiol.* 1994; 267: 2012-8.

- Clements RS Jr, Bell DS. Complications of diabetes. Prevalence, detection, current treatment, and prognosis. *Am J Med.* 1985; 79:2-7.
- Collaco-Moraes Y, Aspey B, Harrison M, de-Belleruche J. Cyclooxygenase-2 messenger RNA induction in focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1996; 16: 1366-72.
- Cosenzi A, Bernobich E, Bonavita M, Trevisan R, Bellini G, Campanacci L. Early effects of diabetes on inducible nitric oxide synthase in the kidney. *Acta Diabetol* 2002; 39: 91–96.
- Covas MI. Olive oil and the cardiovascular system. *Pharmacol. Res.* 2007; 55:175–86.
- Craggs L, Kalaria RN. Revisiting dietary antioxidants, neurodegeneration and dementia. *Neuroreport.* 2011; 22: 1-3.
- Dalsing MC, Grosfeld JL, Shiffler MA, Vane DW, Hull M, Baehner RL, Weber TR. Superoxide dismutase: a cellular protective enzyme in bowel ischemia. *J Surg Res.* 1983; 34 (6):589-96.
- De La Cruz JP, Gonzalez Correa JA, Guerrero A, de la Cuesta FS: Pharmacological approach to diabetic retinopathy. *Diabetes Metab Res Rev.* 2004 Mar-Apr; 20 (2):91-113.
- De La Cruz JP, Guerrero A, Paniego MJ, Arranz I, Moreno A, Sánchez De La Cuesta F. Effect of aspirin on prostanoids and nitric oxide production in streptozotocin-diabetic rats with ischemic retinopathy. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 2002; 365: 96-101.
- De La Cruz JP, Máximo MA, Blanco E, Moreno A, Sánchez De La Cuesta F. Effect of erythrocytes and prostacyclin production in the effect of fructose and sorbitol on platelet activation in human whole blood in vitro. *Thrombosis Research* 1997; 86:515-24.
- De La Cruz JP, Moreno A, Guerrero A, de La Cuesta FS. Antiplatelet effects of prostacyclin and nitric oxide in patients with type I diabetes and ischemic or edematous retinopathy. *Platelets.* 2001; 12:210-7.

Bibliografía

- De la Fuente P, Chamorro P, Moreno M, Poza MA. Propiedades antioxidantes de hidroxitirosol procedente de la hoja de olivo (*Olea europaea* L.). *Rev Fitoterapia* 2004; 139-148.
- De Vriese AS, Verbeuren TJ, Van de Voorde J, Lameire NH, Vanhoutte PM. Endothelial dysfunction in diabetes. *Br J Pharmacol*. 2000; 130:963-74.
- De Vriese AS, Verbeuren TJ, Van de Voorde J, Lameire NH, Vanhoutte PM. Endothelial dysfunction in diabetes. *Br J Pharmacol* 2000; 130: 963-974.
- Dell'Agli M, Maschi O, Galli GV, Fagnani R, Dal Cero E, Caruso D, Bosisio E. Inhibition of platelet aggregation by olive oil phenols via cAMP-phosphodiesterase. *Br. J. Nutr.* 2008; 99(5): 945–51.
- Deseano Estudillo JL, Castañón González JA, Carvajal Ramírez A, Castrejon Román H, León Gutiérrez MA. Espectro de velocidad del flujo sanguíneo cerebral por ultrasonido Doppler transcraneal en pacientes con criterios clínicos de muerte cerebral. *Gac Med Mex.* 2003; 139: 6-10.
- Díaz-Acosta A, Membrillo-Hernández J. Consecuencias fisiológicas de la oxidación de proteínas por carbonilación en diversos sistemas biológicos. *TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas.* 2006; 9: 34-44.
- Díez Tejedor E., Del Brutto O., Álvarez-Sabín J., Muñoz M., Abiusi G. Clasificación de las enfermedades cerebrovasculares. *Sociedad Iberoamericana de Enfermedades Cerebrales. Rev Neurol* 2001; 33 (5): 455-464.
- Dirnagl U, Simon RP, Hallenbeck JM. Ischemic tolerance and endogenous neuroprotection. *Trends Neurosci.* 2003; 26: 248-54.
- Ellis AE, Guberski DL, Huston B, Grant MB. Time course of NADH oxidase, inducible nitric oxide synthase and peroxynitrite in diabetic retinopathy in the BBZ/WOR rat. *Nitric Oxide* 2002; 6: 295–304.
- Ellis EA, Grant MB, Murray FT, Wachowski MB, Guberski DL, Kubilis PS, Luty GA. Increased NADH oxidase activity in the retina of the BBZ/Wor diabetic rat. *Free Radic Biol Med* 1998; 24:111-20.

- Erecinska M, Silver IA. Ions and energy in mamalian brain. *Prog Neurobiol.* 1994; 43: 37-41.
- Esplugues JV., Barrachina MD. Capítulo 21. Florez, J. *Farmacología Humana.* 5ª Edición. 2008. Elsevier Masson.
- Esteller A. Biología de la pared vascular y síndrome metabólico. *Nutr Hosp.* 2005; XX (1):5-17.
- Fabiani R, Sepporta MV, Rosignoli P, De Bartolomeo A, Crescimanno M, Morozzi G. Anti-proliferative and pro-apoptotic activities of hydroxytyrosol on different tumour cells: the role of extracellular production of hydrogen peroxide. *Eur J Nutr.* 2012; 51: 455-64.
- Ferris FL 3rd, Davis MD, Aiello LM. Treatment of diabetic retinopathy. *N Engl J Med.* 1999; 341: 667-678.
- Feuerstein GZ, Wang X, Barone FC. Inflammatory mediators and brain injury. The role of cytokines and chemokines in stroke and CNS Disease. *Pathophysiology, Diagnosis, and Management.* Vol I. Chapter 36. Blackwell Science. 1998; 507-31.
- Fisher M. El objetivo del tratamiento en la enfermedad cerebrovascular aguda y los enfoques terapéuticos neuroprotectores. *Rev Neurol.* 1999; 29: 536-44.
- Fito M, De la Torre R, Covas MI. Olive oil and oxidative stress. *Mol Nutr Food Res.* 2007; 51:1215–24.
- Fitó M, de la Torre R, Farré-Albaladejo M, Khymenetz O, Marrugat J, Covas MI. Bioavailability and antioxidant effects of olive oil phenolic compounds in humans: a review. *Ann Ist Super Sanita.* 2007; 43: 375-81.
- García JH, Liu KF, Yoshida Y, Lian J, Chen S, del Zoppo GJ. Influx of leukocytes and platelets in an evolving brain infarct (Wistar rat). *Am J Pathol.* 1994; 144: 188-9.
- García Salman JD. Endogenous neuronal protection: an alternative approach. *Rev Neurol.* 2004; 38: 150-5.

Bibliografía

- García-Galloway E, Arango C, Pons S, Torres-Alemán I. Glutamate excitotoxicity attenuates insulin-like growth factor-I prosurvival signaling. *Mol Cell Neurosci.* 2003; 24: 1027-37.
- Ghahary A, Luo JM, Gong YW, Chakrabarti S, Sima AA, Murphy LJ. Increased renal aldose reductase activity, immunoreactivity, and mRNA in streptozocin-induced diabetic rats. *Diabetes* 1989; 38:1067-71.
- Giacosa A, Barale R, Bavaresco L, Gatenby P, Gerbi V, Janssens J, Johnston B, Kas K, La Vecchia C, Mainguet P. Cancer prevention in Europe: the Mediterranean diet as a protective choice. *Eur J Cancer Prev.* 2013; 22 (1):90-5.
- Ginsberg MD. Neuroprotection for ischemic stroke: Past, present and future. *Neuropharmacology.* 2008; 55: 363-89.
- Gong C, Qin Z, Betz AL, Liu XH, Yang GY. Cellular localization of tumor necrosis factor alpha following focal cerebral ischemia in mice. *Brain Research.* 1998; 801: 1-8.
- González-Correa JA, López-Villodres JA, Asensi R, Espartero JL, Rodríguez-Gutiérrez G, De La Cruz JP. Virgin olive oil polyphenol hydroxytyrosol acetate inhibits in vitro platelet aggregation in human whole blood: comparison with hydroxytyrosol and acetylsalicylic acid. *Br J Nutr.* 2009; 101: 1157-1164.
- González-Correa JA, Arrebola MM, Cansino AL, Muñoz-Marín J, Ruiz-Villafranca D, Guerrero A, de la Cuesta FS, De La Cruz JP. Effects of hypoxia reoxygenation in brain slices from rats with type 1-like diabetes mellitus. *Diabetes Metab Res Rev.* 2006; 22: 390-400.
- González-Correa JA, Arrebola MM, Guerrero A, Cañada MJ, Muñoz-Marín J, Sánchez De La Cuesta F, De La Cruz JP. Antioxidant and antiplatelet effects of the alpha-tocopherol - aspirin combination in type 1-like diabetic rats. *Life Sciences* 2006; 79:1405-12.

- González-Correa JA, López-Villodres JA, Asensi R, Espartero JL, Rodríguez-Gutiérrez G, De La Cruz JP. Virgin olive oil polyphenol hydroxytyrosol acetate inhibits in vitro platelet aggregation in human whole blood: comparison with hydroxytyrosol and acetylsalicylic acid. *Br J Nutr.* 2009; 101:1157-64.
- González-Correa JA, Muñoz-Marín J, Arrebola MM, Guerrero A, Narbona F, López-Villodres JA, De La Cruz JP. Dietary virgin olive oil reduces oxidative stress and cellular damage in rat brain slices subjected to hypoxia-reoxygenation. *Lipids.* 2007; 42: 921-9.
- González-Correa JA, Muñoz-Marín J, Arrebola MM, Guerrero A, Narbona F, López-Villodres JA, De La Cruz JP. Dietary virgin olive oil reduces oxidative stress and cellular damage in rat brain slices subjected to hypoxia-reoxygenation. *Lipids.* 2007; 42:921-929
- González-Correa JA, Navas MD, Lopez-Villodres JA, Trujillo M, Espartero JL, De La Cruz JP. Neuroprotective effect of hydroxytyrosol and hydroxytyrosol acetate in rat brain slices subjected to hypoxia-reoxygenation. *Neurosci Lett.* 2008;446: 143-146.
- González-Correa JA, Navas MD, López-Villodres JA, Trujillo M, Espartero JL, De la Cruz JP. Neuroprotective effect of hydroxytyrosol and hydroxytyrosol acetate in rat brain slices subjected to hypoxia-reoxygenation. *Neurosci Lett.* 2008; 446 (2-3):143-6.
- Gopaul NK, Anggard EE, Mallet AI, Betteridge DJ, Wolff SP, Nourooz-Zadeh J. Plasma 8-epi-PGF2 α levels are elevated in individuals with non- insulin dependent diabetes mellitus. *FEBS Lett* 1995; 368:225-9.
- Goya L, Mateos R, Bravo L. Effect of the olive oil phenol hydroxytyrosol on human hepatoma HepG2 cells. Protection against oxidative stress induced by tert-butylhydroperoxide. *Eur J Nutr.* 2007; 46:70-78.
- Griendling KK, Sorescu D, Ushio-Fukai M. NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease. *Circ Res.* 2000; 86:494–501.

Bibliografía

- Grignaffini P, Roma P, Galli C, Catapano AL. Protection of low-density lipoprotein from oxidation by 3,4-dihydroxyphenylethanol. *Lancet*. 1994; 343: 1296-7.
- Guyton and Hall. *Testbook of Medical Physiology*. Elsevier Health Sciences. 2007. ISBN: 978-1-4160-4574-8.
- Halliwell B, Whiteman M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *British J. Pharmacol*. 2004; 142: 231-255.
- Hamann GF, Okada Y, del Zoppo GJ. Hemorrhagic transformation and microvascular integrity during focal cerebral ischemia/reperfusion. *J. Cereb Blood Flow Metab*. 1996; 16: 1373-8
- Hara K, Kong DL, Sharp FR, Weinstein PR. Effect of selective inhibition of cyclooxygenase 2 on temporary focal cerebral ischemia in rats. *Neurosci Lett*. 1998; 256 (1):53-6.
- Hill MD, Hachinski V. Stroke treatment: Time is brain. *Lancet*. 1998; 352: 10-4.
- Hoehn-Berlage M, Norris DG, Kohno K, Mies G, Leibfritz D, Hossmann KA. Evolution of regional changes in apparent diffusion coefficient during focal ischemia of rat brain: relationship of quantitative diffusion NMR imaging to reduction of cerebral blood flow and metabolic disturbances. *J Cereb Blood Flow Metab*. 1995; 15: 1002-11.
- Hongxia ZI, Simon MC. Hypoxia-inducible factors as essential regulators of inflammation. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2010; 345:105-20.
- Hossmann KA. Pathophysiology and Therapy of Experimental Stroke. *Cell Mol Neurobiol*. 2006; 26: 1057-83.
- Hossmann KA. Viability thresholds and the penumbra of focal ischemia. *Ann Neurol*. 1994; 36: 557-65.
- Huang J, Upadhyay U, Tamargo RJ. Inflammation in stroke and focal cerebral ischemia. *Surg Neurol*. 2006; 66: 232-45.

- Iadecola C. Mechanisms of cerebral ischemic damage in Cerebral Ischemia: Molecular and Cellular Pathophysiology (Walz W. ed) Human Press Totowa. 1999; 1: 3-32.
- Inoguchi T, Li P, Umeda F, Yu HY, Kakimoto M, Imamura M, Aoki T, Etoh T, Hashimoto T, Naruse M, Sano H, Utsumi H, Nawata H. High glucose level and free fatty acid stimulate reactive oxygen species production through protein kinase C dependent activation of NAD(P)H oxidase in cultured vascular cells. *Diabetes* 2000; 49:1939-45.
- Jennings PE, Jones AF, Florkowski CM, Lunec J, Barnett AH. Increased diene conjugates in diabetic subjects with microangiopathy. *Diabet Med* 1987; 4:452-6.
- Jeremy JY, Mikhalidis DP, Thompson CS, Dandona P. Changes in eicosanoid synthesis in the cerebrum, cerebellum and brain stem of the diabetic rat. *Diabetes Res* 1987; 6(2): 95-98.
- Jewell UR, Kvietikova I, Scheid A, Bauer C, Wenger RH, Gassmann M. Induction of HIF-1alpha in response to hypoxia is instantaneous. *FASEB J.* 2001; 15 (7):1312-4.
- Jorgensen HS, Nakayama H, Raaschou HO, Olsen TS. Acute stroke: prognosis and a prediction of the effect of medical treatment on outcome and health care utilization. The Copenhagen Stroke Study. *Neurology.* 1997; 49: 1335-42.
- Jun Oto, Atsuhiko Suzue, Daisuke Inui, Yasushi Fukuta, Kikumi Hosotsubo, Mayumi Torii, Shinji Nagahiro and Masaji Nishimura. Plasma proinflammatory and anti-inflammatory cytokine and catecholamine concentrations as predictors of neurological outcome in acute stroke patients. *J Anesth.* 2008; 22: 207-12.
- Kamat CD, Gadal S, Mhatre M, Williamson KS, Pye QN, Hensley K. Antioxidants in central nervous system diseases: preclinical promise and translational challenges. *J Alzheimers Dis.* 2008; 15: 473-493.
- Kim E, Tolhurst AT, Cho S. Deregulation of inflammatory response in the diabetic condition is associated with increased ischemic brain injury. *J Neuroinflammation.* 2014; 11:83-95.

Bibliografía

- King GL, Brownlee M. The cellular and molecular mechanisms of diabetic complications. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 1996; 25:255-70.
- Kontos HA. Nitric oxide and nitrosothiols in cerebrovascular and neuronal regeneration. *Stroke.* 1993; 24: 155-8.
- Kristian P. Doyle, Roger P. Simon, Mary P. Stenzel-Poore. Mechanisms of ischemic brain damage. *Neuropharma.* 2008; 55:310-318.
- Krupinski J, Turu MM. La respuesta neuroinflamatoria en la isquemia cerebral. Montaner J (Ed.). *Fisiopatología de la isquemia cerebral.* Marge Medical Books. 2007; 119-44.
- Kukreja RC, Kontos HA, Hess ML, Ellis EF. PGH synthase and lipoxygenase generate superoxide in the presence of NADH or NADPH. *Circ Res* 1986; 59:612-9.
- Kwakkel G, Kollen B, Lindeman E. Understanding the pattern of functional recovery after stroke: Facts and theories. *Restor Neurol Neurosci.* 2004; 22: 281-99.
- Landmesser U, Harrison DG. Oxidative stress and vascular damage in hypertension. *Coron Artery Dis.* 2001; 12:455–461
- Lee OH, Lee BY. Antioxidant and antimicrobial activities of individual and combined phenolics in *Olea europaea* leaf extract. *Bioresour Technol.* 2010; 101: 3751-4.
- Li C, Li P-A, He Q-P, Ouyang Y-B, Siesjö BK. Effects of streptozotocin-induced hyperglycemia on brain damage following transient ischemia. *Neurobiology of disease* 1998; 5: 117-128.
- Lorenzi M, Cagliero E: Pathobiology of endothelial and other vascular cells in diabetes mellitus. *Diabetes.* 1991;40:653-659.
- Mahon PC, Hirota K, Semenza GL. FIH-1: a novel protein that interacts with HIF-1alpha and VHL to mediate repression of HIF-1 transcriptional activity. *Genes Dev.* 2001; 15 (20):2675-86.

- Maier CM, Hsieh L, Crandall T, Narasimhan P, Chan PH. Evaluating therapeutic targets for reperfusion-related brain hemorrhage. *Ann Neurol*. 2006; 59 (6):929-38.
- Majmundar AJ, Wong WJ, Simon MC. Hypoxia-inducible factors and the response to hypoxic stress. *Mol Cell*. 2010; 40 (2):294-309.
- Mariani E, Polidori MC, Cherubini A, Mecocci P. Oxidative stress in brain aging, neurodegenerative and vascular diseases: an overview. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2005; 827 (1):65-75.
- Maritim AC, Sanders RA, Watkins III JB. Diabetes, Oxidative Stress, and Antioxidants: A Review. *J Biochem Mol Toxicol* 2003; 17:24–38.
- Martín González. Actuación diagnóstica y terapéutica ante la sospecha de cardioembolismo. *Continua Neurológica*. 1999; 2: 55-68.
- Martínez-Vila E, Guillén F, Villanueva JA, Matías-Guiu J, Bigorra J, Gil P, Carbonell A, Martínez-Lage JM. Placebo-controlled trial of nimodipine in the treatment of acute ischemic cerebral infarction. *Stroke*. 1990; 21: 1023-8.
- Matijević V, Poljaković Z, Malojčić B, Mišmaš A, Bazina A, Boban M, Bilić I, Radanović B, Glavor KD, Kidemet-Piskač S, Habek M. Systemic thrombolytic therapy in acute ischemic stroke--new experiences in spreading network of stroke units in Croatia. *J Neurol Sci*. 2012; 314: 126-9.
- Maulik N, Das DK. Redox signaling in vascular angiogenesis. *Free Radic Biol Med*. 2002; 33:1047–1060
- Maxwell PH, Wiesener MS, Chang GW, Clifford SC, Vaux EC, Cockman ME, Wykoff CC, Pugh CW, Maher ER, Ratcliffe PJ. The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis. *Nature*. 1999; 399 (6733):271-5.
- McCall JM, Braughler JM, Hall ED. Lipid peroxidation and the role of oxygen radicals in CNS injury. *Acta Anaesthesiol Belg*. 1987; 38 (4):373-9.

Bibliografía

- Meldrum BS, Swan JH, Leach MJ, Millan MH, Gwinn R, Kadota K, Graham SH, Chen J, Simon RP. Reduction of glutamate release and protection against ischemic brain damage by BW 1003C87. *Brain Res.* 1992; 593: 1-6.
- Mohr JP, Orgogozo JM, Harrison MJG, NG Wahlgren, JH Gelmers, Matínez-Vila E, Dycka J, Tettenborn D. Meta-analysis of oral nimodipine trials in acute ischemic stroke. *Cerebrovasc Dis.* 1994; 4: 197-203.
- Molina Nieto T, Calvo Rodríguez R, Jiménez Murillo L, Castilla Camacho S, Montero Pérez FJ, Cañadillas Hidalgo F. Accidente cerebrovascular. En: *Medicina de Urgencias, Guía terapéutica.* Jiménez Murillo L, Montero Pérez FJ (eds.). Elsevier. 2011; 244-57.
- Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. Relationship between prostacyclin and nitric oxide in the thrombotic process. *Thromb Res Suppl.* 1990; 11:3-13.
- Morcillo E, Sanz MJ, Cortijo J. Mediadores celulares III. Angiotensinas, cininas, citosinas y otros mediadores peptídicos. En : *Farmacología Humana.* Florez, J, Armijo JA, Mediavilla A (eds). Elsevier Masson. Barcelona, España. 2008. 407-420.
- Moreno A, De La Cruz JP, Garcia Campos JM, Sanchez De La Cuesta F. Prostacyclin/thromboxane balance and retinal vascular pattern in diabetic rats. *Can J Ophthalmol* 1995; 30:117-23.
- Moro MA, De Alba J, Leza JC, Lorenzo P, Fernández AP, Ventura ML, Boscá L, Rodrigo J, Lizasoain I. Neuronal expression of inducible nitric oxide synthase after oxygen and glucose deprivation in rat forebrain slices. *Eur J Neurosci* 1998; 10: 445-456.
- Muñoz-Marín JI, De La Cruz JP, Guerrero A, López-Leiva I, López-Villodres JA, Reyes JJ, Espartero JL, Madrona A, Labajos MT, González-Correa JA. Cytoprotective effect of hydroxytyrosyl alkyl ether derivatives after oral administration to rats in a model of glucose-oxygen deprivation in brain slices. *J Agric Food Chem.* 2012; 60 :7659-7564.

- Muranyi M, et al. Diabetes activates cell death pathway after transient focal cerebral ischemia. *Diabetes* 2003; 52 (2): 481-6.
- Murata T, Ushikubi F, Matsuoka T, Hirata M, Yamasaki A, Sugimoto Y, Ichikawa A, Aze Y, Tanaka T, Yoshida N, Ueno A, Oh-ishi S, Narumiya S. Altered pain perception and inflammatory response in mice lacking prostacyclin receptor. *Nature*. 1997; 388: 678-82.
- Nerlich AG, Sauer U, Kolm-Litty V, Wagner E, Koch M, Schleicher ED. Expression of glutamine: fructose-6-phosphate amidotransferase in human tissues: evidence for high variability and distinct regulation in diabetes. *Diabetes* 1998; 47:170-8.
- Nicholls DG, Chalmers S. The integration of mitochondrial calcium transport and storage. *J Bioenerg Biomembr*. 2004; 36 (4):277-81.
- NINDS. The National Institute of Neurological Disorders and Stroke rtPA Stroke Study Group Tissue plasminogen activator for acute ischemic stroke. *N Eng J Med*. 1995; 333: 1581-7.
- Nishikawa T, Kirsch JR, Koehler RC, Brecht DS, Snyder SH, Traystman RJ. Effect of nitric oxide synthase inhibition on cerebral blood flow and injury volume during focal ischemia in cats. *Stroke*. 1993; 24: 1717-24.
- Nishikawa T, Kirsch JR, Koehler RC, Miyabe M, Traystman RJ. Nitric oxide synthase inhibition reduces caudate injury following transient focal ischemia in cats. *Stroke*. 1994; 25: 877-85.
- Nogawa S, Zhang F, Ross ME, Iadecola C. Cyclo-oxygenase-2 gene expression in neurons contributes to ischemic brain damage. *J Neurosci*. 1997; 17: 2746-55.
- Nyström T. Role of oxidative carbonylation in protein quality control and senescence. *EMBO J*. 2005; 24 (7):1311-7.
- O'Dowd Y, Driss F, Dang PM, Elbim C, Gougerot-Pocidallo MA, Pasquier C, El-Benna J. Antioxidant effect of hydroxytyrosol, a polyphenol from olive oil: scavenging of hydrogen peroxide but not superoxide anion produced by human neutrophils. *Biochem Pharmacol*. 2004; 68: 2003-8.

Bibliografía

- Ohh M, Park CW, Ivan M, Hoffman MA, Kim TY, Huang LE, Pavletich N, Chau V, Kaelin WG. Ubiquitination of hypoxia-inducible factor requires direct binding to the beta-domain of the von Hippel-Lindau protein. *Nat Cell Biol.* 2000; 2 (7):423-7.
- Otani H, Umemoto M, Kagawa K, Nakamura Y, Omoto K, Tanaka K, Sato T, Nonoyama A, Kagawa T. Protection against oxygen-induced reperfusion injury of the isolated canine heart by superoxide dismutase and catalase. *J Surg Res.* 1986; 41: 126-33.
- Owen RW, Giacosa A, Hull WE, Haubner R, Spiegelhalder B, Bartsh H. The antioxidant/anticancer potential of phenolic compounds isolated from olive oil. *Eur J Cancer.* 2000; 36: 1235-47.
- Paulson OB, Strandgaard S, Edvinsson L. Cerebral autoregulation. *Cerebrovasc Brain Metab Rev.* 1990; 2: 161-92.
- Pereira-Caro G, Sarriá B, Madrona A, Espartero JL, Goya L, Bravo L, Mateos R. Alkyl hydroxytyrosyl ethers show protective effects against oxidative stress in HepG2 cells. *J Agric Food Chem.* 2011; 59:5964-5976.
- Pérez-Jiménez J, Hubert J, Hooper L, Cassidy A, Manach C, Williamson G, Scalbert A. Urinary metabolites as biomarkers of polyphenol intake in humans: a systematic review. *Am J Clin Nutr.* 2012; 92:801-9.
- Petroni A, Blasevich M, Salami M, Papini N, Montedoro GF, Galli C. Inhibition of platelet aggregation and eicosanoid production by phenolic components of olive oil. *Thromb. Res.* 1995; 78(2): 151-60.
- Phillis JW, O'Regan MH. The role of phospholipases, cyclooxygenases, and lipoxygenases in cerebral ischemic/traumatic injuries. *Crit Rev Neurobiol.* 2003; 15: 61-90.
- Portanova JP, Zhang Y, Anderson GD, Hauser DD, Masferrer JL, Seibert K, Gregory SA, Isakson PC. Selective neutralization of prostaglandin E2 blocks inflammation, hyperalgesia, and interleukin 6 production in vivo. *J Exp Med.* 1996; 184: 883-91.

- Powers WJ. Hemodynamics and metabolism in ischemic cerebrovascular disease. *Neurol Clin.* 1992; 10: 31-48.
- Pulsinelli WA. Pathophysiology of acute ischemic stroke. *Lancet.* 1992; 339: 533-6.
- Raederstorff D. Antioxidant activity of olive polyphenols in humans: a review. *Int J Vitam Nutr Res.* 2009; 79: 152-65.
- Rema M, Mohan V, Bhaskar A, Shanmugasundaram KR. Does oxidant stress play a role in diabetic retinopathy? *Indian J Ophthalmol* 1995; 43:17-21.
- Rivera J, Sobey CG, Walduck AK, Drummond GR. Nox isoforms in vascular pathophysiology: insights from transgenic and knockout mouse models. *Redox Rep.* 2010; 15:50–63.
- Robbins SL, Kumar V, Cotran RS. *Patología Humana. El Sistema Nervioso Central.* McGraw-Hill 6ª edición. 2000; 30: 1353-7.
- Ruano J, López-Miranda J, Fuentes F, Moreno JA et al. Phenolic content of virgin olive oil improves ischemic reactive hyperemia in hypercholesterolemic patients. *J Am Coll Cardiol.* 2005; 46: 1864-8.
- Ryan D, Kobards K, Lavee S. Changes in phenolic content of olive during maturation. *Int J Food Sci Tech.* 1999; 34: 265-74.
- Salami M, Galli C, de Angelis F, Visiolo F. Formation of F2-isoprostanes in oxidized low density lipoprotein inhibitory effect of hydroxytyrosol. *Pharmacol Res.* 1995; 31: 275-9.
- Sánchez-Fidalgo S, Sánchez de Ibarguen L, Cárdeno A, Alarcón de la Lastra C. Influence of extra virgin olive oil diet enriched with hydroxytyrosol in a chronic DSS colitis model. *Eur J Nutr.* 2012; 51: 497-506.
- Sang-Ging O, Hausenloy DJ. Hypoxia-inducible factor as a therapeutic target for cardioprotection. *Pharmacol Ther.* 2012; 136 (1):69-81.

Bibliografía

- Sang-Ho Choi, Robert Langenbach, Francesca Bosetti. Cyclooxygenase-1 and -2 enzymes differentially regulate the brain upstream NF- κ B pathway and downstream enzymes involved in prostaglandin biosynthesis. *J Neurochem.* 2006; 98: 801-11.
- Santos MS, Santos DL, Palmeira CM, Seiga RA, Moreno AS, Oliveira CR. Brain and liver mitochondria isolated from diabetic goto-kakizaki rats show different susceptibility to induced oxidative stress. *Diabetes Metab Res Rev* 2001; 17: 223-230.
- Satoh T, Ishige K, Sagara Y. Protective effects on neuronal cells of mouse afforded by ebselen against oxidative stress at multiple steps. *Neurosci Lett.* 2004; 371 (1):1-5.
- Satwat H, Al-Salam S. Hypoxia-inducible factor-1 alpha in the heart: a double agent? *Cardiol Rev.* 2012; 20 (6):268-73.
- Sayeski PP, Kudlow JE. Glucose metabolism to glucosamine is necessary for glucose stimulation of transforming growth factor-alpha gene transcription. *J Biol Chem* 1996; 271:15237-43.
- Schaffer S, Müller WE, Eckert GP. Cytoprotective effects of olive mill wastewater extract and its main constituent hydroxytyrosol in PC12 cells. *Pharmacol Res.* 2010; 62 (4):322-7.
- Schaffer S, Podstawa M, Visioli F, Bogani P, Müller WE, Eckert GP. Hydroxytyrosol-rich olive mill wastewater extract protects brain cells in vitro and ex vivo. *J Agric Food Chem.* 2007; 55:5043-9.
- Schaffer S, Podstawa M, Visioli F, Bogani P, Müller WE, Eckert GP. Hydroxytyrosol-rich olive mill wastewater extract protects brain cells in vitro and ex vivo. *J Agric Food Chem.* 2007; 55: 5043-5049.
- Sechi LA, Ceriello A, Griffin CA, Catena C, Amstad P, Schambelan M, Bartoli E. Renal antioxidant enzyme mRNA levels are increased in rats with experimental diabetes mellitus. *Diabetologia* 1997; 40:23-29.

- Seghrouchni I, Draï J, Bannier E, Rivière J, Calmard P, Garcia I, Orgiazzi J and Revol A. Oxidative stress parameters in type I, type II and insulin-treated type 2 diabetes mellitus; insulin treatment efficiency. *Clinica Chimica Acta* 2002; 321:89-96.
- Serra A, Rubió L, Borràs X, Macià A, Romero MP, Motilva MJ. Distribution of olive oil phenolic compounds in rat tissues after administration of a phenolic extract from olive cake. *Mol. Nutr Food Res.* 2012; 56: 486-96.
- Shimizu H, Ohtani KI, Tsuchiya T, Sato N, Tanaka Y, Takahashi H, Uehara Y, Inukai T, Mori M. Aldose reductase mRNA expression is associated with rapid development of diabetic microangiopathy in Japanese Type 2 diabetic (T2DM) patients. *Diabetes Nutr Metab* 2000; 13:75-79.
- Siesjö BK. Cerebral circulation and metabolism. *J Neurosurg.* 1984; 60: 883-908.
- Simonyi A1, Wang Q, Miller RL, Yusof M, Shelat PB, Sun AY, Sun GY. Polyphenols in cerebral ischemia: novel targets for neuroprotection. *Mol Neurobiol.* 2005;31:135-147.
- Smardo FL Jr, Burg MB, Garcia-Perez A. Kidney aldose reductase gene transcription is osmotically regulated. *Am J Physiol* 1992; 262:C776-82.
- St-Laurent Thibault C, Arseneault M, Longpré F, Ramassamy C. Tyrosol and hydroxytyrosol, two main components of olive oil, protect N2a cells against amyloid-b-induced toxicity. Involvement of the NF-kB signaling. *Curr Alzheimer Res* 2011; 8 (5):543-51.
- Stehouwer CD, Schaper NC. The pathogenesis of vascular complications of diabetes mellitus: one voice or many? *Eur J Clin Invest.* 1996; 26:535-43.
- Stitt AW. The role of advanced glycation in the pathogenesis of diabetic retinopathy. *Experimental and Molecular Pathology* 2003; 75:95–108.
- Suárez M, Valls RM, Romero MP, Macià A, Fernández S, Giralt M, Solá R, Motilva MJ. Bioavailability of phenols from a phenol-enriched olive oil. *Br J Nutr.* 2011; 106 (11):1691-701.

Bibliografía

- Taher MM, Garcia JG, Natarajan V. Hydroperoxide-induced diacylglycerol formation and protein kinase C activation in vascular endothelial cells. *Arch Biochem Biophys.* 1993; 303:260-6.
- Tekkök S., Kriz J., Padjen A.L., Krnjević K. Higher sensitivity of CA1 synapses to aglycemia in streptozotocin-diabetic rats is age-dependent. *Brain Res.* 1998; 813: 268–273.
- Tekkök S, Kriz J, Padjen AL, Krnjević K. Higher sensitivity of CA1 synapses to aglycemia in streptozotocin-diabetic rats is age-dependent. *Brain Research* 1998; 813: 268-273.
- Terzuoli E, Donnini S, Giachetti A, Iñiguez MA, Fresno M, Melillo G, Ziche M. Inhibition of hypoxia inducible factor-1alpha by dihydroxyphenylethanol, a product from olive oil, blocks microsomal prostaglandin-E synthase-1/vascular endothelial growth factor expression and reduces tumor angiogenesis. *Clin Cancer Res.* 2010; 16 (16):4207-16
- Tomlinson DR, Stevens EJ, Diemel LT. Aldose reductase inhibitors and their potential for the treatment of diabetic complications. *Trends Pharmacol Sci* 1994; 15:293-7.
- Torregrosa G, Salom JB, Jover-Mengual T, Alborch E. Fisiopatología básica: de la oclusión arterial a la muerte neuronal. Montaner J (Ed.). *Fisiopatología de la Isquemia cerebral.* Marge Medical Books. 2007; 13-31.
- Touyz RM1, Chen X, Tabet F, Yao G, He G, Quinn MT, Pagano PJ, Schiffrin EL. Expression of a functionally active gp91phox-containing neutrophil-type NAD(P)H oxidase in smooth muscle cells from human resistance arteries: regulation by angiotensin II. *Circulation Research.* 2002 Jun 14;90(11):1205-13.
- Viña J, Sastre J, Antón V, Asensi M. Efecto del envejecimiento sobre el metabolismo y las funciones del glutatión (GSH). En: *GSH System: eje de la defensa antioxidante.* Cristal RG, Ramón RG (eds.). *Ámsterdam Excerpta Médica.* 1992; 65-78.

- Visioli F, Bernardini E. Extra virgin olive oil's polyphenols: biological activities. *Curr Pharm Des.* 2011; 17: 786-804.
- Vissers MN, Zock PL, Roodenburg AJC, Leenen R, Katan MB. Olive oil phenols are absorbed in humans. *JN.* 2001; 409-418.
- Wang GL, Jiang BH, Rue EA, Semenza GL. Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995; 92 (12):5510-4.
- Wang GX, Li GR, Wang YD, Yangs TS, Ouyang YB. Characterization of neuronal cell death in normal and diabetic rats following experimental focal cerebral ischemia. *Life sci* 2001; 69 (23):2801-10.
- Waterman E, MPharm, Lockwood B, BPharm, PhD, MRPharmS. Active components and clinical application of olive oil. *Alt Med Rev.* 2007; 12 (4):331-42.
- Waxman SG, Cummins TR, Dib-Hajj S, Fjell J, Black JA. Sodium channels, excitability of primary sensory neurons, and the molecular basis of pain. *Muscle Nerve.* 1999; 22: 1177-87.
- Webb JD, Coleman ML, Pugh CW. Hypoxia, hypoxia-inducible factors (HIF), HIF hydroxylases and oxygen sensing. *Cell Mol Life Sci.* 2009; 66 (22):3539-54.
- Weidemann A, Klanke B, Wagner M, Volk T, Willam C, Wiesener MS, Eckardt KU, Warnecke C. Hypoxia, via stabilization of the hypoxia-inducible factor HIF-1 α , is a direct and sufficient stimulus for brain-type natriuretic peptide induction. *Biochem J.* 2008; 409 (1):233-42.
- Weinberger J. Contemporary diagnosis and management of stroke. Second ed. *Handboobs in Health Care Co.* Newtown Pennsylvania, USA. 2000.
- White BC, Sullivan JM, De Gracia DJ, O'Neil BJ, Neumar RW, Grossman LI, Rafols JA y Krause GS. Brain ischemia and reperfusion: molecular mechanisms of neuronal injury. *J Neurol Sci.* 2000; 179: 1-33.

Bibliografía

- Williamson JR, Chang K, Frangos M, Hasan KS, Ido Y, Kawamura T, Nyengaard JR, van den Enden M, Kilo C, Tilton RG. Hyperglycemic pseudohypoxia and diabetic complications. *Diabetes* 1993; 42:801-13.
- Willoughby DA, Moore AR, Colville-Nash PR. COX-1, COX-2, and COX-3 and the future treatment of chronic inflammatory disease. *Lancet*. 2000; 355: 646-8.
- Wolff SP, Dean RT. Glucose autoxidation and protein modification. The potential role of autoxidative glycosylation in diabetes. *Biochem J* 1987; 245:243-50.
- Wu G, Haynes TE, Yan W, Meininger CJ. Presence of glutamine:fructose-6-phosphate amidotransferase for glucosamine-6-phosphate synthesis in endothelial cells: effects of hyperglycaemia and glutamine. *Diabetologia* 2001; 44:196-202
- Xia P, Kramer RM, King GL. Identification of the mechanism for the inhibition of Na⁺,K⁽⁺⁾- adenosine triphosphatase by hyperglycemia involving activation of protein kinase C and cytosolic phospholipase A2. *J Clin Invest* 1995; 96:733-40.
- Yamasaki Y, Matsuo Y. New therapeutic possibility of blocking cytokine-induced neutrophil chemoattractant on transient ischemic brain damage in rats. *Brain Research*. 1997; 759: 103-11.
- Yan H, Harding JJ. Glycation-induced inactivation and loss of antigenicity of catalase and superoxide dismutase. *Biochem J* 1997; 328:599-605.
- Zhang RL, Lu CZ, Ren HM, Xiao BG. Metabolic changes of arachidonic acid after cerebral ischemia-reperfusion in diabetic rats. *Exp Neurol*. 2003;184:746-752.
- Zhang X, Cao J, Zhong L. Hydroxytyrosol inhibits pro-inflammatory cytokines, iNOS, and COX-2 expression in human monocytic cells. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol*. 2009.379:581-586.
- Zou X, Feng Z, Li Y, Wang Y, Wertz K, Weber P, Fu Y, Liu J. Stimulation of GSH synthesis to prevent oxidative stress-induced apoptosis by hydroxytyrosol in human retinal pigment epithelial cells: activation of Nrf2 and JNK-p62/SQSTM1 pathways. *J Nutr Biochem*. 2011; 23: 994-1006.

Zrelli H, Matsuoka M, Kitazaki S, Araki M, Kusunoki M, Zarrouk M, Miyazaki H. Hydroxytyrosol induces proliferation and cytoprotection against oxidative injury in vascular endothelial cells: role of Nrf2 activation and HO-1 induction. *J Agric Food Chem.* 2011; 59: :4473-82.