

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

FACULTAD DE MEDICINA

Departamento de Farmacología



**TESIS DOCTORAL**

**La redacción de la concentración plasmática de glutamato  
mediante diálisis peritoneal como estrategia para disminuir el  
daño isquémico cerebral**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

**Víctor Manuel González Romera**

Directores

**María Ángeles Moro Sánchez**

**Ignacio Lizasoain Hernández**

**José Sánchez-Prieto Borja**

**Madrid, 2017**

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA  
Departamento de Farmacología



La reducción de la concentración plasmática de glutamato mediante diálisis peritoneal como estrategia para disminuir el daño isquémico cerebral

TESIS DOCTORAL

Víctor Manuel González Romera

Madrid 2015



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

Facultad de Medicina  
Departamento de Farmacología



**La reducción de la concentración plasmática de glutamato mediante diálisis peritoneal como estrategia para disminuir el daño isquémico cerebral**

**TESIS DOCTORAL**

**VICTOR MANUEL GONZÁLEZ ROMERA**

Directores de Tesis

María Ángeles Moro Sánchez

Ignacio Lizasoain Hernández

José Sánchez-Prieto Borja

Madrid, 2015



**Para mi sobrina Abril, porque con tu  
llegada nos has alegrado a todos**



**Para mi madre y mis hermanos,  
Raúl y Bea, porque os quiero**



# AGRADECIMIENTOS

---

Es muy difícil agradecer en unas pocas páginas a toda la gente que me ha ayudado en el camino para realizar esta Tesis doctoral y es muy posible que me deje algunas personas sin nombrar, no por no ser importantes, así que por favor no lo toméis como falta de reconocimiento, si no como síntoma de mi mala memoria.

Tengo que empezar dándole las gracias a mi madre, sin la cual no hubiese llegado hasta este punto, no solo por darme la vida, sino por la educación que me ha dado, su dedicación y su apoyo incondicional. Muchas gracias madre, no sé quien sería si no hubieses estado conmigo toda mi vida, pero seguro que no sería ni la mitad de lo que soy hoy en día.

Gracias a mi hermano Raúl que siempre ha creído en mí y me ha apoyado fuesen cuales fuesen mis decisiones y con el que he vivido grandes experiencias. Gracias también a mi hermana Bea que ha sido, además de mi hermana, mi mejor amiga y con la que he pasado muchos de mis mejores momentos tanto en Granada como en Madrid y que ha estado siempre para lo que necesite. Samuel, gracias a ti también.

Gracia a ti también Marisa por estar conmigo, por tu paciencia y comprensión todo este tiempo, tanto en la distancia como ya en Granada y por no dejar que desistiese para terminar esta tesis.

Por supuesto he de agradecer a Nacho y a Mari Ángeles, mis primeros padres científicos, no solo por darme la oportunidad de iniciarme en esta fantástica carrera científica, si no por enseñarme a tener un pensamiento mucho más crítico, empezando por mí mismo, y por tener siempre la puerta abierta para cualquier cosa que necesite, ya sea profesional o personal. Gracias, sois mucho más que unos jefes para mí.

Pepe y Magdalena, gracias a vosotros, por dejarme participar en este proyecto científico y en especial a ti Pepe por sacar tiempo aun cuando sé que no te resultaba fácil y enseñarme otra forma de hacer las cosas.

Gracias a Mayka, mi compañera en toda esta andadura de la diálisis peritoneal, con la que he pasado muchas horas junto a los animales; considero que eres a otra directora de esta tesis. Muchas gracias por ayudarme a formarme como doctor.

Gracias Mónica, tú sabes que sin ti no hubiese sido posible iniciar este proyecto, y por hacerme parte de él, por confiar en mí y sobre todo por ser mi amiga, has sido un grandísimo apoyo para mí y un referente en todo el tiempo que estuve en Madrid.

Gracias también a todos los del laboratorio con los que he compartido poyata y mesa:

- ✓ Gracias Isaac, por tantas conversaciones y tantos buenos ratos.
- ✓ Gracias Sara, por tu simpatía y tu amistad
- ✓ Gracias Tamara, por ser tan sincera y por las risas que hemos tenido juntos
- ✓ Gracias Rober, por tu paciencia
- ✓ Gracias Mari, Iván, Ana y Ali, y Juan por animar el laboratorio con canciones y fiestecilla
- ✓ Gracias Jesús, David Oli, Maki y Lupe, por tantos consejos y ánimos
- ✓ Gracias Alberto, por estar tan loco y hacer el trabajo más ameno

También tengo que agradecer al grupo de Juan Carlos, que me acogió en un primer momento en 'la pecera', en especial a Iciar y a Javi, por tantas conversaciones con las que me hicieron sentir cómodo desde el principio y gracias también a los técnicos del departamento, Fer, Manolo y María Luisa.

Y por supuesto un gracias a todos los animales que dieron su vida por la ciencia y que se merecen parte de este reconocimiento. Gracias a mis ratitas.

## INDICE DE ABREVIATURAS

%HI- Porcentaje de hemisferio infartado	EAAC-1- Transportador de aminoácidos excitadores-1 ( <i>Excitatory Amino Acid Carrier-1</i> )
ACC- Arteria carótida común	EAAT- Transportador de aminoácidos excitadores ( <i>Excitatory amino-acid transporter</i> )
ACM- Arteria cerebral media	ECV- Enfermedad Cerebrovascular
AGE- Productos de glucosilación avanzada ( <i>advanced glycation end products</i> )	EGF- Factor de Crecimiento Epidérmico
AID- Inhibidores de muerte regulados por actividad ( <i>Activity-regulated Inhibitor of Death</i> )	eNOS- Oxido nítrico sintasa endotelial
AIT- Ataque Isquémico Transitorio	ERN- Especie reactiva de nitrógeno
ALT- Alanina Transferasa	ERO- Especie reactiva de oxígeno
AMPA- Ácido $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico	f-MRI- Imagen de resonancia magnética funcional ( <i>functional Magnetic Resonance Image</i> )
AMPc- Adenosín monofosfato cíclico	GABA- Ácido $\gamma$ -aminobutírico
AP- Anteroposterior	GABAT- GABA transaminasa
AQP-1- Aquaporina-1	GAD- Descarboxilasa del ácido glutámico
AST- Aspartato Aminotransferasa	GAPDH- Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
ATP- Adenosín trifosfato	GDH- Glutamato deshidrogenasa ( <i>Glutamate dehydrogenase</i> )
BDNF- Factor neurotrófico derivado del cerebro (Brain Derived Neurotrophic Factor)	GLAST-1- Transportador glutamato aaspartato ( <i>Glutamate Aspartate Transporter</i> )
BHE- Barrera hematoencefálica	GLT-1- Transportador de glutamato 1 ( <i>Glutamate Transporter -1</i> )
BOLD- Dependiente del nivel de oxigenación sanguínea (Blood-Oxygen-Level Dependent)	GOT- glutamato oxalacetato transaminasa
CREB- Proteína de unión al cAMP ( <i>cAMP response element-binding protein</i> )	
DP- Diálisis peritoneal	

GS- Glutamina sintetasa ( <i>glutamine synthetase</i> )	OACC-t- Oclusión temporal de la Arteria Carótida Común
HD- Hemodiálisis	OH- Radical hidroxilo
HTA- Hipertensión arterial	OMS- Organización Mundial de la Salud
i.p.- Intraperitoneal	ONOO- peroxinitrito
ICAM-1- Molécula de adhesión intercelular-1 (Intercellular Adhesion Molecule 1)	PDG- Productos de la degradación de la glucosa
iGLUR- Receptores de glutamato ionotrópicos	PK- Proteína cinasa
IL-1- Interleucina 1	POD- Peroxidasa
IL-2- Interleucina 2	RMN- Resonancia Magnética Nuclear
iNOS- Oxido nítrico sintasa inducible	SNC- Sistema Nervioso Central
MCAO- Oclusión de la arteria cerebral media	SOD- superóxido dismutasa
mGLUR- Receptores de glutamato metabotrópicos	TGF $\beta$ - Factor de Crecimiento Transformante $\beta$ ( <i>Transforming growth factor <math>\beta</math></i> )
MRI- Imagen de resonancia magnetica ( <i>Magnetic Resonance Image</i> )	TNF $\alpha$ - Factor de Necrosis Tumoral $\alpha$ (Tumor Necrosis Factor $\alpha$ )
NADP- Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidado	t-PA- Activador tisular del plasminógeno ( <i>tissue plasminogen activator</i> )
NADPH- Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido	TTC- Cloruro de 2,3,5-trifenil-tetrazolio
NDMA- N-metil-D-aspartato	VGLUT- Transportador vesicular de glutamato ( <i>Vesicular Glutamate Transporter</i> )
NINDS- National Institute of Neurological Disorders and Stroke	Vol.contra- Volumen de tejido del hemisferio contralateral
nNOS- Oxido nítrico sintasa neuronal	Vol.Ipsi, Sano- Volumen de tejido sano del hemisferio ipsilateral
NO- Óxido nítrico	$\alpha$ -KG- $\alpha$ -cetogluturato
NOS- Oxido nítrico sintasa	

## INDICE

<b>I. RESUMEN.....</b>	<b>I</b>
El glutamato en la isquemia cerebral.....	I
La diálisis peritoneal y el peritoneo .....	II
Hipótesis .....	IV
Eficacia de la diálisis peritoneal en el ictus experimental .....	IV
<b>II. SUMMARY .....</b>	<b>XI</b>
Glutamate in cerebral ischemia.....	XI
Peritoneal dialysis and peritoneum .....	XII
Hypothesis .....	XIII
Efficacy of peritoneal dialysis in experimental stroke .....	XIV
<b>1.- INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 La enfermedad cerebrovascular .....</b>	<b>1</b>
1.1.1 Definición y relevancia.....	1
1.1.2 Clasificación de la enfermedad cerebrovascular .....	2
1.1.3 Factores de riesgo .....	5
1.1.4 Fisiopatología del ictus isquémico .....	7
<b>1.2 Excitotoxicidad por glutamato .....</b>	<b>14</b>
1.2.1 El glutamato en el SNC .....	14
1.2.2 Excitotoxicidad por glutamato en la isquemia .....	28
1.2.3 Tratamiento y neuroprotección .....	31
<b>1.3 La diálisis peritoneal.....</b>	<b>38</b>
1.3.1 Definición e importancia .....	38
1.3.2 Fisiología del peritoneo y la cavidad peritoneal.....	38
1.3.3 Fundamento de la técnica de diálisis peritoneal .....	41
1.3.4 Tipos de diálisis peritoneal.....	44
1.3.5 La solución de diálisis peritoneal .....	45
1.3.5 Complicaciones de la diálisis peritoneal.....	49
<b>2.- HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....</b>	<b>57</b>
<b>2.1 JUSTIFICACIONES, ANTECEDENTES E HIPÓTESIS .....</b>	<b>57</b>
<b>2.2 OBJETIVOS .....</b>	<b>58</b>
<b>3.- MATERIAL Y MÉTODOS .....</b>	<b>61</b>
<b>3.1 Animales de experimentación. ....</b>	<b>61</b>
<b>3.2. Modelos experimentales. Procesos quirúrgicos. ....</b>	<b>61</b>
3.2.1 Anestesia y control de los animales .....	61
3.2.2 Modelo de isquemia cerebral focal en rata por ligadura. ....	61
3.2.3 Modelo de isquemia cerebral focal en rata por electrocoagulación.....	63
3.2.4. Extracción de muestras de plasma.....	63

3.2.5. Modelo de diálisis peritoneal .....	65
<b>3.3 Inyección de glutamato por vía intravenosa y toma de muestras.....</b>	<b>67</b>
<b>3.4 Grupos experimentales .....</b>	<b>68</b>
3.4.1 Utilidad de la diálisis peritoneal en pMCAO.....	68
3.4.2 Estudio de la ventana terapéutica .....	69
3.4.3 Estudio de diferentes soluciones de diálisis .....	70
3.4.4 Estudio de la utilidad de la diálisis peritoneal en animales sanos con glutamato plasmático elevado .....	71
3.4.5 Estudio de pacientes con diálisis peritoneal .....	72
<b>3.5 Determinación de glutamato mediante método fluorométrico.....</b>	<b>72</b>
<b>3.6 Determinación del volumen de infarto y caracterización neurológica .....</b>	<b>74</b>
3.6.1. Determinación del volumen de infarto mediante sal de cloruro de 2,3,5-trifenil- tetrazolio (TTC).....	74
3.6.2. Determinación del volumen de infarto mediante resonancia magnética.....	74
3.6.3 Caracterización neurológica de la lesión tras la pMCAO .....	75
<b>3.7 Diálisis peritoneal en humanos. ....</b>	<b>78</b>
<b>3.8 Análisis estadístico .....</b>	<b>79</b>
<b>4.- RESULTADOS.....</b>	<b>83</b>
<b>4.1 Estudio de la eficacia de la diálisis peritoneal en el ictus experimental.....</b>	<b>83</b>
4.1.1 Modelos de isquemia experimental .....	83
4.1.2 Efecto de la diálisis peritoneal .....	85
4.1.3 Estudio de la implicación del glutamato en el efecto protector de la diálisis peritoneal ..	92
<b>4.2 Estudio de la ventana terapéutica de la diálisis peritoneal en el ictus experimental .....</b>	<b>95</b>
<b>4.3 Estudio de las diferentes soluciones de diálisis peritoneal en el ictus experimental .....</b>	<b>96</b>
<b>4.4 Estudio del incremento de glutamato vía intravenosa en animales sanos.....</b>	<b>99</b>
<b>4.5 Estudio de la diálisis peritoneal en pacientes .....</b>	<b>101</b>
<b>5.- DISCUSIÓN.....</b>	<b>105</b>
<b>ISQUEMIA CEREBRAL Y EXCITOTOXICIDAD POR GLUTAMATO .....</b>	<b>105</b>
<b>DIÁLISIS PERITONEAL e ISQUEMIA CEREBRAL.....</b>	<b>109</b>
<b>VENTANA TERAPÉUTICA DE LA DIÁLISIS PERITONEAL EN EL ICTUS EXPERIMENTAL.....</b>	<b>114</b>
<b>COMPOSICION DE LA SOLUCIÓN DE DIÁLISIS PERITONEAL.....</b>	<b>115</b>
<b>MÉTODOS DE EVALUACIÓN DE LA EFICACIA NEUROPROTECTORA DE LA DIÁLISIS PERITONEAL.....</b>	<b>116</b>

VENTAJAS Y LIMITACIONES DE LA DIÁLISIS PERITONEAL COMO ESTRATEGIA NEUROPROTECTORA.....	118
6.- CONCLUSIONES.....	123
7.- BIBLIOGRAFÍA.....	127
8.- PUBLICACIONES RELACIONADAS.....	148



# *I. RESUMEN*



## I. RESUMEN

### El glutamato en la isquemia cerebral

La isquemia cerebral o ictus es una enfermedad de una gran prevalencia, en especial en los países desarrollados, ya que, además de ser una de las principales causas de muerte en las poblaciones de estos países, es también una de las primeras causas de discapacidad y demencia, con el consecuente impacto socio-económico.

Cuando se interrumpe o reduce el flujo sanguíneo al cerebro existe un área delimitada llamada *core* que corresponde a la zona más afectada y en la que se producirá el daño más grave. Alrededor de esta zona existe otra región, la penumbra, donde el flujo sanguíneo se ve reducido, aunque se puede mantener funcional durante un periodo de tiempo mayor, de forma que si se actúa de manera temprana, el tejido se considera potencialmente salvable (Astrup et al., 1977).

El déficit energético producido como consecuencia de la reducción de oxígeno y glucosa al cerebro ocasiona la despolarización de la membrana plasmática (para revisión, ver Pulsinelli, 1992) con la consiguiente apertura de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  voltaje-dependientes, lo que deriva en la liberación de glutamato al medio extracelular. La elevación de glutamato en el espacio extracelular produce a su vez la estimulación continuada de los receptores de glutamato AMPA y NMDA, lo que lleva a la entrada de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$  en la célula produciendo mayor despolarización de la membrana, la producción de edema y la expresión y/o activación de enzimas que finalmente conducen a la muerte celular (Choi, 1988; Kristian y Siesjo, 1998).

El glutamato es el principal neurotransmisor excitador del sistema nervioso central (para revisión ver en Nicholls, 1993). Su concentración en el cerebro no es homogénea: mientras que en el espacio extracelular la concentración se mantiene en torno a  $1 \mu\text{M}$  en estado basal, la concentración intracelular oscila entre 5-10 mM, pudiendo llegar hasta 50-100 mM en las vesículas sinápticas (Nicholls, 1993; Teichberg et al., 2009). La liberación sináptica de glutamato es un proceso controlado por la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de los canales voltaje-dependientes y la consiguiente elevación de la concentración intracelular de este catión. Una vez liberado, el glutamato es recaptado, mediante transportadores específicos localizados en las membranas de los astrocitos y de las neuronas para su reutilización, lo que permite controlar su concentración en la hendidura sináptica (Nicholls y Attwell, 1990).

Además de los transportadores de glutamato presentes en las neuronas y en los astrocitos, podemos encontrar varios de estos transportadores en otros tipos celulares como son las células endoteliales de la barrera hematoencefálica, y que participan también en la retirada de glutamato del espacio extracelular. Se han descrito transportadores de glutamato Na<sup>+</sup>-dependientes en la membrana abluminal de la célula endotelial que introducen glutamato en la célula sin que se haya observado este tipo de transportadores en la membrana luminal (O'Kane et al., 1999). Además, se ha descrito que en la membrana luminal existen transportadores de glutamato no dependientes que transportan el glutamato a la sangre a favor de un gradiente de concentración (Lee et al., 1998)

Teniendo en cuenta que el glutamato es uno de los principales precursores de la cascada isquémica, son muchos los intentos que se han llevado a cabo para reducir las acciones que se derivan de la elevación excesiva de este aminoácido en el espacio extracelular, principalmente mediante el uso de antagonistas de los receptores y bloqueantes de los canales iónicos, aunque recientemente se está empezando a trabajar en otro tipo de terapias que pretenden la retirada de glutamato del espacio extracelular. Ahora, si bien se han obtenido resultados satisfactorios en animales de experimentación, hasta la fecha no se ha conseguido ningún tratamiento que funcione en la clínica.

### **La diálisis peritoneal y el peritoneo**

La diálisis peritoneal es una terapia que se emplea en pacientes con enfermedad renal crónica para eliminar sustancias de desecho de la sangre utilizando como membrana filtrante la membrana peritoneal que se comporta como una barrera pasiva, semipermeable a la difusión de agua y a la mayoría de solutos, y una solución que contiene un agente osmótico que permita el paso de sustancias desde la sangre a esta solución.

La membrana peritoneal se divide en una capa de células mesoteliales que descansan sobre una lámina basal. Por debajo de la lámina basal se encuentra el intersticio, capa de tejido conjuntivo, formado por fibras y células y donde también podemos encontrar capilares sanguíneos y vasos linfáticos (Gotloib, 2009a).

Actualmente se consideran dos modelos para explicar el transporte de sustancias entre la sangre y la cavidad peritoneal. El primer modelo tiene en cuenta la distancia que tanto los solutos como el agua deberán atravesar desde el vaso sanguíneo a la cavidad peritoneal (Flessner et al., 1984, 1985a; Flessner et al., 1985b). El segundo

modelo propone la existencia de tres tipos de “poros”, que actuarían de filtro frente a los solutos de diferente tamaño (Rippe, 1993). Probablemente el modelo más correcto se corresponda con un modelo mixto (Gotloib, 2009b).

En el transporte de sustancias en la diálisis peritoneal hay que diferenciar entre el transporte de solutos y el transporte de agua. El principal mecanismo por el que los solutos son transportados es la difusión como resultado de la diferencia de concentración entre la sangre y el líquido de diálisis. El transporte de sustancias junto con agua se debe a un gradiente de presión y es el segundo mecanismo mediante el cual se transportan sustancias hasta el líquido de diálisis en la cavidad peritoneal. Por otro lado el transporte de agua responde principalmente a un mecanismo de ósmosis (Leypoldt, 2002; Margetts y Churchill, 2002; Flessner, 2005; Teixidó Planas et al., 2009).

La solución de diálisis peritoneal es una mezcla de agua, electrolitos y minerales, agentes osmóticos y tampones, a la que a veces se le añade diferentes sustancias en función de las necesidades del paciente. La composición de electrolitos y minerales se mantiene bastante estable en todas las soluciones de diálisis (Arduan, 2009; Khanna et al., 2009). El principal agente osmótico que se utiliza es la glucosa a tres concentraciones diferentes en función de las necesidades del paciente para, dependiendo de la concentración, conseguir mayor grado de ultrafiltración. Actualmente se están usando soluciones con otros agentes osmóticos como la icodextrina y soluciones con aminoácidos, si bien estas soluciones no han sustituido el uso de la glucosa en la mayoría de los casos (Bajo et al., 2008).

En cuanto a los tampones, el más utilizado en la actualidad es el tampón bicarbonato, ya que presenta un pH más fisiológico y menos inconvenientes en el tratamiento que el tampón lactato, aunque es frecuente utilizar la combinación de ambos tampones (Schmitt et al., 2002).

Además de estos componentes, el líquido de diálisis peritoneal puede contener antibióticos, quelantes de algunos minerales, nutrientes, u otros componentes que sean necesarios para mejorar la función dialítica del paciente.

Considerando la capacidad de eliminar sustancias de desecho de la sangre de la diálisis peritoneal, postulamos que ésta podría ser una buena opción para retirar el glutamato de la sangre y de esta manera incrementar su salida desde el espacio extracelular cerebral hacia la sangre a través de las células endoteliales, a favor de un

gradiente de concentración, de forma que la reducción de glutamato extracelular cerebral redujese el daño excitotóxico.

### **Hipótesis**

Teniendo en cuenta estos antecedentes nos planteamos la siguiente hipótesis:

“La disminución de la concentración de glutamato en sangre mediante una diálisis peritoneal debe acelerar la salida de glutamato del parénquima cerebral y por tanto reducir el daño celular asociado a concentraciones elevadas de este aminoácido tras un proceso isquémico”

### **Eficacia de la diálisis peritoneal en el ictus experimental**

El fracaso de las terapias neuroprotectoras frente al ictus hace que continuamente se estén desarrollando nuevas terapias experimentales enfocadas a la reducción de la lesión isquémica.

Para poder desarrollar nuestro modelo de diálisis peritoneal escogimos dos modelos de isquemia cerebral focal experimental en rata. El primero fue un modelo de ligadura, descrito por Chen y cols. y modificado por Liu y cols. (Chen et al., 1986; Liu et al., 1989), en el que se ocluye la arteria cerebral media de forma permanente mediante un nudo. Este ha sido el modelo principal de nuestro estudio. El segundo modelo que utilizamos fue el de electrocoagulación (De Cristóbal et al., 2001; Hurtado et al., 2003), en el que se corta el flujo de la arteria cerebral media mediante la cauterización de la misma. Este modelo lo usamos únicamente para verificar que el tratamiento neuroprotector mediante diálisis peritoneal es eficaz en más de un modelo de isquemia experimental. Realizamos también extracciones de sangre a diferentes tiempos para hacer un perfil de la concentración de glutamato plasmático. La medida de glutamato plasmático se realizó mediante un método fluorométrico. Los animales se sacrificaron a las 24 horas y se procedió a medir el volumen del tejido infartado mediante tinción con una sal de tetrazolio.

La diálisis peritoneal la realizamos mediante la inserción de un catéter de silicona en la cavidad peritoneal y la entrada del líquido de diálisis se hizo por gravedad, con dos ciclos de llenado/reposo/vaciado, a las 2.5 horas tras la oclusión de la ACM. Este es el tiempo en el que habíamos observado que comenzaba el incremento de glutamato plasmático para, de este modo, evitar que llegase a su máximo a las 4.5 horas. Como solución utilizamos una solución elaborada en el laboratorio con tampón fosfato.

Nuestros resultados muestran que la diálisis peritoneal produce una reducción de glutamato plasmático y que esta reducción se corresponde con una disminución del tamaño de la lesión. Además comprobamos que en el modelo de electrocoagulación la reducción del tamaño de la lesión era similar a la obtenida en el modelo de ligadura.

Para poder afirmar que el glutamato era el responsable de esta reducción del volumen de infarto, realizamos la diálisis peritoneal con una solución que ya contenía glutamato con el objetivo de anular el gradiente sangre-dializado durante isquemia. En estas condiciones el efecto neuroprotector desaparecía, por lo que podíamos afirmar que la retirada de glutamato era responsable de la reducción de la lesión.

Para confirmar que el menor tamaño de la lesión que obteníamos tras la diálisis peritoneal se correspondía con una mejora funcional utilizamos el test del cilindro que mide la asimetría de las patas delanteras del animal. Además hicimos experimentos de resonancia magnética funcional (fMRI) que mide la funcionalidad del tejido mediante parámetros asociados al “consumo de oxígeno”. Estos experimentos se llevaron a cabo 14 días después de la isquemia, para evaluar la mejora neurológica a largo plazo y se midió el volumen de tejido infartado mediante resonancia magnética. Obtuvimos una mejoría en la función motora en los animales tratados con diálisis peritoneal mediante el test del cilindro, mejora que se confirmaba con una mayor funcionalidad medida mediante fMRI y esta mejora funcional además guardaba correlación con el tamaño de la lesión.

El siguiente paso en nuestra investigación fue comprobar la ventana terapéutica de esta estrategia. Dado que en nuestro modelo obteníamos valores elevados de glutamato plasmático a las 5 horas después del episodio isquémico, realizamos la DP a las 5 horas, ya que a este tiempo todavía existe un gradiente sangre-líquido peritoneal. El resultado obtenido mostraba que el efecto neuroprotector se mantenía hasta las 5 horas de la oclusión de la ACM, lo que abre una puerta a una posible aplicación de este tratamiento a pacientes a los que no se les puede aplicar la terapia trombolítica con activador tisular del plasminógeno (t-PA) por superar el tiempo de seguridad de este tratamiento debido al riesgo de transformación hemorrágica.

En colaboración con el Hospital Universitario “La Princesa” realizamos mediciones de glutamato plasmático de pacientes con enfermedad renal crónica sometidos a diálisis peritoneal antes y después del tratamiento. En estos mismos pacientes se tomaron varias muestras de dializado en las que se realizó también la medida del glutamato. Los resultados obtenidos mostraban que la diálisis peritoneal

reducía los niveles plasmáticos de glutamato, al mismo tiempo que la concentración del aminoácido se elevaba en el dializado, lo que confirma nuestros datos experimentales sobre el uso de la diálisis peritoneal como tratamiento para retirar el glutamato plasmático.

Debido a que existen varios factores que podían influir en la reducción de la lesión decidimos probar la diálisis peritoneal con diferentes líquidos de diálisis cambiando el tampón, el agente osmótico – total o parcialmente- y la osmolaridad de la solución. Los resultados sugieren que solo conseguimos efecto neuroprotector con la solución que contenía tampón fosfato. En relación a los otros factores no encontramos neuroprotección en las soluciones en las que aumentamos la osmolaridad ni cuando cambiamos totalmente el agente osmótico.

En otro bloque de experimentos, con el fin de estudiar posibles diferencias en el transporte de glutamato desde la sangre hacia la cavidad peritoneal con las soluciones que contenían bicarbonato o fosfato, decidimos inyectar a animales controles (sin isquemia) glutamato por vía intravenosa, con el fin de incrementar el glutamato en plasma de manera similar a como lo hace en isquemia, para después someterlos a diálisis peritoneal con la solución con bicarbonato y la solución con fosfato. En este caso realizamos un único ciclo de diálisis peritoneal con extracciones de dializado escalonadas y donde la fase de reposo se prolongaba hasta el final del experimento. Encontramos que además de no existir diferencias en cuanto a la concentración de glutamato en el dializado entre las dos soluciones utilizadas, se apreciaba que existe un límite en la cantidad de glutamato que puede ser retirado desde la sangre al líquido peritoneal. Además, se hacía evidente la capacidad amortiguadora que tiene el organismo, ya que siempre observábamos una concentración de glutamato plasmático mucho menor a la que habíamos introducido.

En resumen, la reducción de los niveles plasmáticos de glutamato por la aplicación de la diálisis peritoneal produce una disminución del daño cerebral por una disminución de los niveles cerebrales de este neurotransmisor. Por tanto, la diálisis peritoneal aplicada a pacientes diagnosticados de ictus puede ser un tratamiento seguro y eficaz. Además, hemos observado que el tratamiento es efectivo hasta 5 horas después de la isquemia, lo que sugiere que puede ser una alternativa para los pacientes que no

pueden recibir la terapia trombolítica o incluso puede ser un suplemento a ésta. Es más, este tratamiento podría ser útil para pacientes de otras enfermedades que cursan con elevaciones de glutamato extracelular en el cerebro como las convulsiones inducidas por glioma o traumatismos craneoencefálicos (Buckingham et al., 2011).



## *II. SUMMARY*



## II. SUMMARY

### Glutamate in cerebral ischemia

Cerebral ischemia or stroke is a disease very present in today's world, especially in developed countries, as well as being one of the main causes of death in the populations of these countries. It is also one of the leading causes of disability and dementia, with consequent socio-economic impact.

When the blood flow in the brain is interrupted or reduced there is an area called *core* which is a quite defined zone which will be the most affected area and in which the most severe damage will occur. Around this area there is another region, the penumbra, where blood flow is reduced, but it can be kept functional for a longer period of time, so if we act on this area, the tissue is considered potentially salvageable (Astrup et al., 1977).

The energy deficit occurred as a result of reduced oxygen and glucose in the brain causes depolarization of the plasma membrane (for review, see Pulsinelli, 1992) with the subsequent opening of  $\text{Ca}^{2+}$  voltage-dependent, resulting in the release of glutamate into the extracellular medium. The increase of glutamate into the extracellular space in turn produces continued stimulation of glutamate receptors AMPA and NMDA, leading to the entrance of  $\text{Na}^{+}$  and  $\text{Ca}^{2+}$  in the cell causing increased membrane depolarization, the production of edema and expression and/or activation of enzymes that ultimately lead to cell death (Choi, 1988; Kristian y Siesjo, 1998).

Glutamate is the major excitatory neurotransmitter in the central nervous system (for review, see Nicholls, 1993). Its concentration in CNS is not homogeneous: whereas in the extracellular space it remains about  $1 \mu\text{M}$  at baseline, its intracellular concentration ranges from 5 to 10 mM, and reach concentrations between 50 and 100 mM in synaptic vesicles (Nicholls, 1993; Teichberg et al., 2009). Glutamate release is a process controlled by  $\text{Ca}^{2+}$  entry through the voltage-dependent channels and when it is released, glutamate is reuptaken by specific transporters localized in membranes of astrocytes and neurons for reuse, which can control its concentration in synaptic cleft (Nicholls y Attwell, 1990).

Besides glutamate transporters present in neurons and astrocytes, we can find several of these transporters in other cell types such as endothelial cells, so than these can participate in reuptake of glutamate from the extracellular space.  $\text{Na}^{+}$ -dependent

glutamate transporters have been described in abluminal membrane of endothelial cell, which introduce glutamate into the cell, but they have not been observed in luminal membrane (O'Kane et al., 1999). Furthermore, it has been described that in luminal membrane there are non-dependent glutamate transporters which transport glutamate to blood in favor of a concentration gradient (Lee et al., 1998).

Many treatments have been tried to interrupt the ischemic cascade induced by glutamate, to thereby avoid or reduce damage. Now, although there have been successful in experimental animals, to date there is no treatment that works at the clinic. Many of these treatments work in different parts of the ischemic cascade, to avoid the harmful effects previously described. Given that glutamate is one of the main precursors of the ischemic cascade, many attempts have been undertaken to reduce the actions of this amino acid in the extracellular space, mainly by using receptor antagonists and ion channel blockers, although recent work has started seeking the removal of glutamate from the extracellular space.

### **Peritoneal dialysis and peritoneum**

Peritoneal dialysis is a therapy that is used in patients with chronic kidney disease to eliminate waste substances from the blood using the peritoneal membrane as a filter (which acts as a semipermeable passive barrier to the diffusion of water and most solutes) and a solution containing an osmotic agent that permits the passage of substances from the blood to this solution.

The peritoneal membrane is divided into a mesothelial cell layer resting on a basal lamina. Below the gap basal lamina, connective tissue layer, formed by fibers and cells and which can also be found, as well as lymph vessels (Gotloib, 2009a).

Currently we consider two models to explain the transport of substances between the blood and the peritoneal cavity. A first model takes into account the distance that both the solutes and water shall pass through from the blood vessel and the peritoneal cavity (Flessner et al., 1984, 1985a; Flessner et al., 1985b); the second model proposes that there are three types of "pores" which act against filter solutes of different size (Rippe, 1993). Probably the most correct model corresponds to a mixed model (Gotloib, 2009b).

In the transport of substances in peritoneal dialysis, there is a difference between solute transport and water transport. The main mechanism by which the solutes are transported is spreading as a result of the concentration difference between the blood

and the dialysis fluid; transporting substances with water is due to a pressure gradient which is the second mechanism by which substances are transported to the dialysis fluid in the peritoneal cavity. On the other hand water transport is mainly due to a mechanism of osmosis (Leypoldt, 2002; Margetts y Churchill, 2002; Flessner, 2005; Teixidó Planas et al., 2009).

The peritoneal dialysis solution is a mixture of water, minerals and electrolytes, osmotic agents and buffers, to which sometimes other substances are added according to the needs of the patient. The composition of electrolytes and minerals remains fairly stable in all dialysis solutions (Arduan, 2009; Khanna et al., 2009). The main osmotic agent used is glucose, used in three different concentrations depending on the needs of the patient, in order to achieve, depending on the concentration, greater ultrafiltration. Currently solutions with other osmotic agents are also being used, such as icodextrin and amino acid solutions, although these solutions have not replaced the use of glucose in most cases (Bajo et al., 2008).

Regarding buffers, the most used one today is the bicarbonate buffer, because it has a physiological pH and is less inconvenient in the treatment than the lactate buffer, but it is also common to use a combination of both buffers (Schmitt et al., 2002).

Besides these components, the peritoneal dialysis fluid may contain antibiotics, chelators, some minerals, nutrients and other components required to improve the patient's dialysis function.

Considering the ability to eliminate waste substances from the blood of peritoneal dialysis, we postulate that it might be a good option to remove glutamate from the blood and thereby increase its output from the extracellular space into the blood by endothelial cells, for a concentration gradient, so that the reduction would reduce glutamate excitotoxic brain damage.

### **Hypothesis**

Given this background, we propose the following hypothesis:

"Decreased glutamate concentration in blood, created by peritoneal dialysis, must accelerate glutamate brain parenchyma exit and thus reduce cellular damage associated with high concentrations of this amino acid after ischemia"

**Efficacy of peritoneal dialysis in experimental stroke**

The failure of neuroprotective therapies against stroke calls for continuous development of new experimental therapies focused at reducing ischemic injury.

To develop our model of peritoneal dialysis we chose two models of experimental focal cerebral ischemia in rats. The first was the ligation model described by Chen et al. and amended by Liu et al. (Chen et al., 1986; Liu et al., 1989), in which the middle cerebral artery was permanently occluded by a knot. This was the main model of our study. The second model we used was the electrocoagulation used in our laboratory (De Cristóbal et al., 2001; Hurtado et al., 2003) in which the flow of the middle cerebral artery is cut off by cauterizing it. This model was used only to verify that the neuroprotective treatment by peritoneal dialysis is effective in more than one model of experimental ischemia. Also, we obtained blood at different times to make a profile of the plasma concentration of glutamate; measuring plasma glutamate was conducted by a fluorometric method. Animals were sacrificed at 24 hours and the volume of infarct tissue was measured by staining with a tetrazolium salt.

Peritoneal dialysis was performed by insertion of a silicon catheter into the peritoneal cavity, and the dialysis fluid inlet was made by gravity, with two cycles of fill / dwell / drain, at 2.5 hours after MCA occlusion. This is the time when we observed that the glutamate began to increase in plasma, thus, we prevent it from reaching its maximum at 4.5 hours. As a solution we use a solution prepared in the laboratory with phosphate buffer.

Our results show that peritoneal dialysis causes a reduction in plasma glutamate and that this reduction corresponds to a decrease of lesion size. Moreover, we verified with the electrocoagulation model and found that the reduction in lesion size was similar to that obtained in the ligation model.

In order to assert that glutamate was responsible for this reduction in infarct volume, we performed peritoneal dialysis with a solution containing glutamate in order to abolish the blood-dialysate gradient during ischemia. In these circumstances the protective effect disappeared, so we can assert that the removal of glutamate is responsible for the reduction in lesion size.

To confirm that the smaller size of the lesion we obtained after peritoneal dialysis corresponded to a functional improvement, the cylinder test was used to measure the asymmetry of the front legs of the animal. In addition we made

experiments of functional magnetic resonance imaging (fMRI) that measure the functionality of tissue by "oxygen consumption". These experiments were carried out 14 days after ischemia, to evaluate the long-term neurological improvement, and volume of infarcted tissue was measured by MRI. We obtained an improvement in motor function in cylinder test in animals treated with peritoneal dialysis, which was confirmed by better fMRI functionality measurements, which in turn were also correlated with lesion size.

Next step in our research was to determine the therapeutic window of this strategy. Since in our model we obtained high values of plasma glutamate at 5 hours after the ischemic event, the peritoneal dialysis was conducted at 5 hours, as these blood concentrations were still present in blood-generating gradient peritoneal fluid. The result showed that the neuroprotective effect was still present until 5 hours after MCA occlusion, opening the possibility to apply this treatment to patients who cannot receive thrombolytic therapy with tissue plasminogen activator (t-PA) because of the risk of hemorrhagic transformation.

In collaboration with the University Hospital "La Princesa" we performed measurements of plasma glutamate in patients with chronic kidney disease undergoing peritoneal dialysis before and after treatment. In these same patients glutamate measurements were taken on several dialysate samples. The results showed that peritoneal dialysis reduced glutamate levels in plasma, while the amino acid concentration in the dialysate was raised, confirming our experimental data on the use of peritoneal dialysis treatment to remove plasma glutamate.

As there are several factors that could influence the reduction of injury, we decided to try peritoneal dialysis with different dialysis fluids, changing the buffer, the osmotic agent - fully or partially- and osmolarity of the solution. The results suggest that there was a neuroprotective effect only with the phosphate buffer. In relation to other factors neuroprotection was not found in solutions in which the osmolarity was increased or when osmagent was fully switched.

In another block of experiments we decided to inject control animals (no ischemia) with glutamate intravenously in order to increase the plasma glutamate as in ischemic conditions, and then subject them to peritoneal dialysis with bicarbonate and phosphate solutions in order to study if there were any differences in glutamate transport from the blood into the peritoneal cavity. In this case we only performed a

single cycle of peritoneal dialysis with staggered extractions where the resting phase was prolonged until the end of the experiment. We found no differences in the concentration of glutamate in the dialysate between the two solutions used, and also that there is a limit on the quantity of glutamate which can be removed by dialysis. In addition, the buffer capacity of the organism was noted, as we observed lower plasma concentration of glutamate than we had introduced.

In summary, the reduction in glutamate levels in plasma by the application of peritoneal dialysis results in decreased brain damage, thanks to decreased brain levels of this neurotransmitter. Therefore, peritoneal dialysis can be a safe and effective treatment for patients diagnosed with stroke. In addition, we observed that the treatment is effective even five hours after ischemia, which suggests that it may be an alternative for patients who can not receive thrombolytic therapy, or may even be a supplement to this. Moreover, this treatment could be useful for patients of other diseases associated with elevated brain extracellular glutamate, such as glioma-induced seizures and cranioencephalic traumatism (Buckingham et al., 2011).

# *INTRODUCCIÓN*



## 1.- INTRODUCCIÓN

### 1.1 La enfermedad cerebrovascular

#### 1.1.1 Definición y relevancia

La enfermedad cerebrovascular es comúnmente llamada ictus. El término ictus proviene del latín; significa golpe, al igual que su análogo inglés *stroke*. Esta denominación hace referencia a su aparición súbita y violenta. Otros términos empleados para definir el ictus son infarto cerebral o isquemia cerebral.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) define el ictus como un “síndrome clínico, presumiblemente de origen vascular, que se caracteriza por el desarrollo rápido de signos de afectación neurológica focal algunas veces global y que duran más de 24 horas o llevan a la muerte” (WHO, 1989).

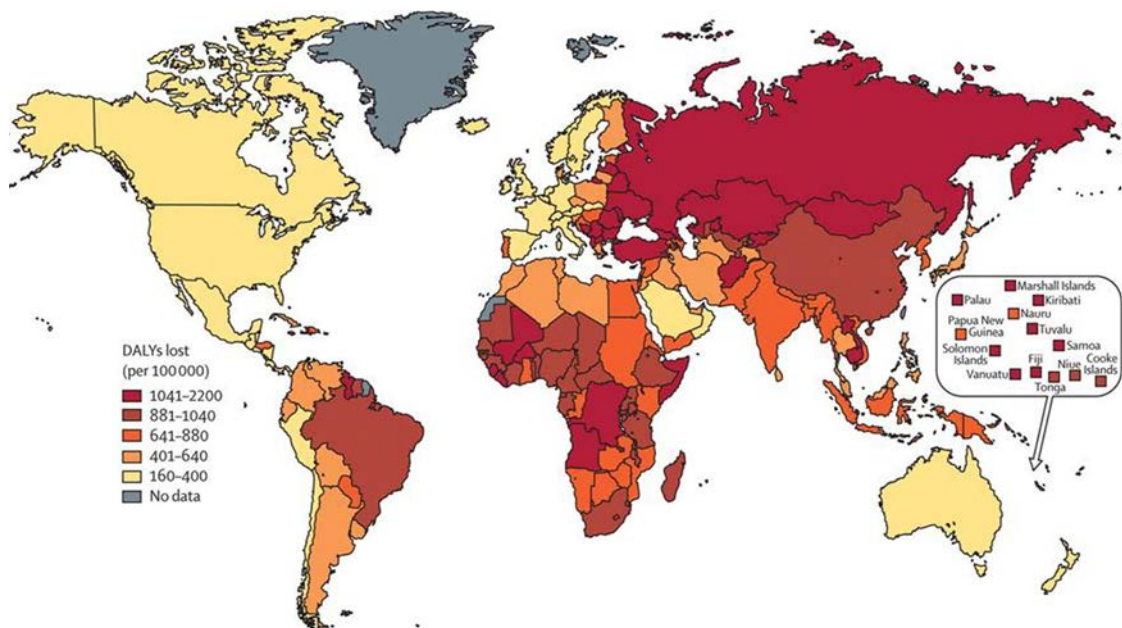
Cuando la duración de la interrupción del flujo tiene una duración inferior a 24 horas hablamos de ataque isquémico transitorio (AIT), definiendo este como “síndrome clínico que se caracteriza por una pérdida aguda de funciones cerebrales focales u oculares con síntomas que duran menos de 24 horas” (Díez-Tejedor et al., 2001).

En resumen, podemos definir el ictus o enfermedad cerebrovascular como el daño en una región del cerebro debido a un trastorno del flujo sanguíneo cerebral, bien sea de forma transitoria o permanente.

El ictus es la segunda causa de muerte en el mundo, con más de 5 millones de muertes anuales, y una de las principales causas de discapacidad. Se estima que ocurren 16 millones de primeros ictus al año y que en 2030 este número aumentará hasta los 23 millones y a 7.7 millones el número de defunciones (Strong et al., 2007).

En 2005 un total de 62 millones de personas sobrevivieron a un ictus, cifra que se cree que aumente a 77 millones en 2030. La necesidad de cuidados médicos para estas personas, unido al gasto indirecto producido por el descenso de la productividad que ocasiona, crea un elevado gasto para los estados. Para poder unificar el impacto económico que el ictus supone se utilizan los DALYs (Disability Adjusted Life Years). El DALY es una medida de salud que combina la medida de los años de vida perdidos por muerte prematura y los años de vida perdidos por discapacidad. Al ictus se le asocia una pérdida de 43.7 millones de DALYs anuales en el mundo (un 3.2% del total), si bien la

mayoría de esta pérdida corresponde a países con bajos o medios ingresos (Fig.1.1) (Di Carlo, 2009; Mukherjee y Patil, 2011).



**Figura 1.1. Índice de pérdida de DALYs como resultado de isquemia ajustado a edad y sexo. El índice es mayor en Europa del Este, Norte de Asia, África central y el Sur del Pacífico. (Mukherjee y Patil, 2011)**

En España, en el año 2011 se produjeron 28.855 muertes a causa de enfermedades cerebrovasculares, siendo la principal causa de muerte en mujeres, (16.703) un 8.9% del total de las defunciones de mujeres del pasado año (INE, 2013). La incidencia del ictus en España se estima que puede oscilar entre 120-350 casos por cada 100.000 habitantes/año. Las tasas se multiplican por 10 en la población mayor de 75 años de edad; es más, entre un 5 y un 11% de la población mayor de 70 años tiene antecedentes clínicos de ictus (Medrano Alberto et al., 2006; Díaz-Guzmán et al., 2008).

### **1.1.2 Clasificación de la enfermedad cerebrovascular**

Se han realizado múltiples clasificaciones de la enfermedad cerebrovascular, siendo la más aceptada actualmente la realizada en 1990 por el *National Institute of Neurological Disorders and Stroke* (NINDS). Según este organismo, podemos clasificar la enfermedad cerebrovascular aguda en dos grandes grupos: isquémica, producida por la reducción o el bloqueo completo del flujo sanguíneo en una zona del cerebro, y hemorrágica, debida a la ruptura de un vaso y la liberación de sangre dentro del parénquima. Los ictus isquémicos representan entre el 80 y el 85% del total de los ictus

que se producen, mientras que el 15-20% restante corresponden a ictus hemorrágicos (Fig. 1.2).

A su vez, dentro de la isquemia cerebral se puede distinguir entre la isquemia cerebral focal, que afecta a una sola zona del encéfalo, y la isquemia cerebral global, que afecta al encéfalo de forma difusa (para revisión ver Díez-Tejedor et al., 2001).

Por otra parte, dentro de los ictus hemorrágicos, se diferencian los hematomas cerebrales o hemorragia intracerebral (intraparenquimatosa o ventricular) de la hemorragia subaracnoidea.

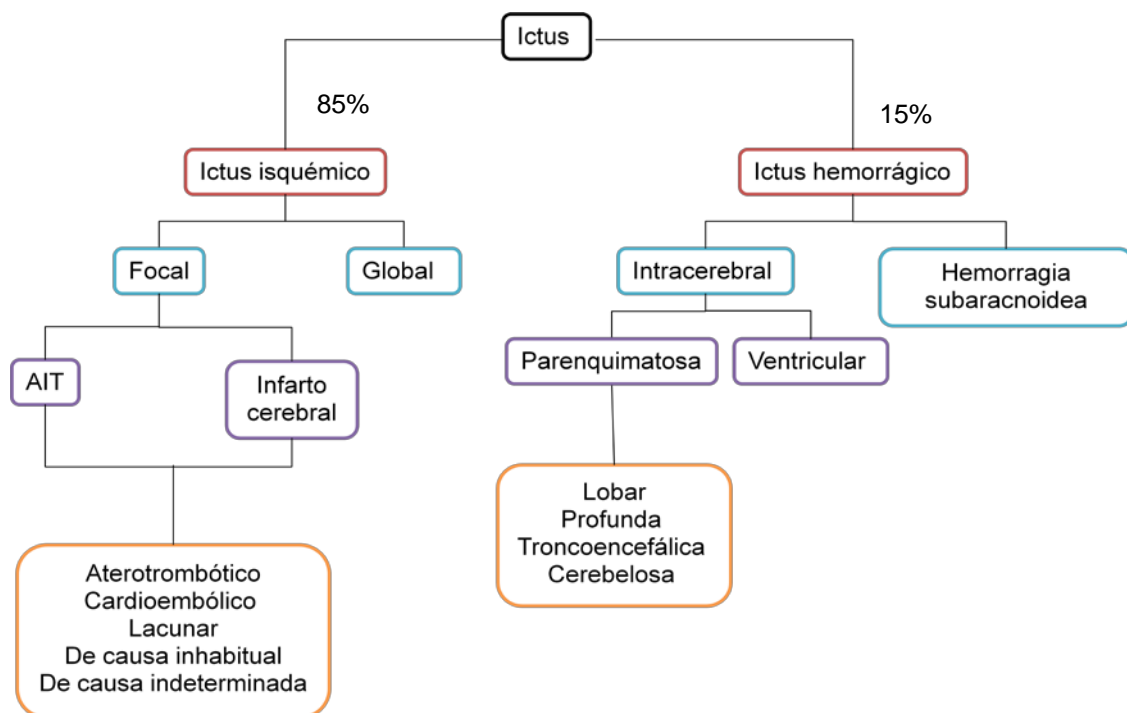


Figura 1.2. Clasificación del ictus según su naturaleza. Modificado de Díez-Tejedor (2001)

Según la duración del proceso isquémico, se diferencian dos tipos de isquemia focal (Arboix et al., 1998; 2006):

**Ataque isquémico transitorio (AIT):** es un episodio breve, inferior a 24 horas, de isquemia cerebral focal que se produce como consecuencia del déficit de aporte sanguíneo en una zona irrigada por un sistema arterial. Es reversible y no existe déficit neurológico tras su finalización.

**Ictus isquémico o infarto cerebral:** se produce cuando la isquemia cerebral es lo suficientemente prolongada en el tiempo como para producir un área de necrosis tisular. Se considera que ha sido prolongado cuando el déficit neurológico tiene una duración superior a 24 horas.

Si atendemos a la causa etiológica, los diferentes subtipos de ictus isquémico focal son:

**Ictus isquémico aterotrombótico** por aterosclerosis de arteria grande: es un infarto generalmente de tamaño medio o grande, de topografía cortical o subcortical y localización carotídea o vertebrobasilar, en el que se cumple alguno de los dos criterios siguientes:

- Presencia de aterosclerosis con estenosis mayor o igual al 50% del diámetro de la luz vascular u oclusión de una arteria extracraneal o de una arteria intracraneal de gran calibre (cerebral media, cerebral posterior o tronco basilar), en ausencia de otra etiología que lo explique.
- Aterosclerosis sin estenosis por la presencia de placas o de una estenosis inferior al 50% en la arteria cerebral media, cerebral posterior o basilar, en ausencia de otra etiología. Deben concurrir al menos dos de los siguientes factores de riesgo vascular cerebral: persona mayor de 50 años, hipertensión arterial (HTA), diabetes mellitus, tabaquismo o hipercolesterolemia.

**Ictus isquémico cardioembólico:** generalmente es de tamaño medio o grande, de topografía habitualmente cortical, para el que existe evidencia (en ausencia de otra etiología alternativa) de alguna de las siguientes cardiopatías embolígenas: presencia de un trombo o un tumor intracardiaco, estenosis mitral reumática, prótesis aórtica o mitral, endocarditis, fibrilación auricular, enfermedad del nodo sinusal, infarto agudo de miocardio en los tres meses previos con o sin aneurisma ventricular izquierdo o acinesia extensa o presencia de hipocinesia cardiaca global o discinesia independientemente de la cardiopatía subyacente.

**Enfermedad oclusiva de pequeño vaso arterial (infarto lacunar):** es un infarto pequeño (diámetro menor de 1,5 cm) en la zona de una arteria perforante cerebral, que habitualmente ocasiona un síndrome clínico lacunar (hemiparesia motora pura, síndrome sensitivo puro, síndrome sensitivomotor, hemiparesia-ataxia o disartria-mano torpe) en un paciente con antecedentes de HTA u otros factores de riesgo vascular, en ausencia de otra etiología que lo explique.

**Ictus isquémico de causa inhabitual:** es un infarto de tamaño pequeño, mediano o grande, de localización cortical o subcortical, en territorio carotídeo o vertebrobasilar en un paciente en el que se ha descartado el origen aterotrombótico, cardioembólico o lacunar. Puede ser causado por enfermedades sistémicas (alteraciones metabólicas,

trastornos de la coagulación, conectivopatías, síndrome mieloproliferativo o procesos infecciosos) o por otras causas como la trombosis venosa cerebral, migraña, aneurisma del septo, disecciones arteriales, displasia fibromuscular, malformación arteriovenosa, angeítis, o por causa yatrógena.

**Ictus isquémico de etiología indeterminada:** es un infarto de tamaño medio o grande, de localización cortical o subcortical, en territorio carotídeo o vertebrobasilar, en el que, tras un exhaustivo estudio diagnóstico, se han descartado los subtipos aterotrombótico, cardioembólico, lacunar y de causa inhabitual. También puede considerarse indeterminado en el caso de coexistir más de una posible etiología o en los casos en los que se lleve a cabo un estudio incompleto o insuficiente para descartar otras causas.

### **1.1.3 Factores de riesgo**

La OMS define “factor de riesgo” como cualquier rasgo, característica o exposición de un individuo que aumente su probabilidad de sufrir una enfermedad o lesión.

Existen determinados factores que aumentan el riesgo de sufrir un ictus. Estos factores los podemos clasificar, de forma general, en factores de riesgo no modificables, factores de riesgo modificables bien establecidos y factores de riesgo potencialmente modificables (Tabla 1.1) (Sacco et al., 1997).

#### **1.1.3.A) Factores de riesgo no modificables**

Son aquellos que no podemos controlar por ser intrínsecos a la propia persona. Entre los factores de riesgo no modificables podemos destacar:

**Edad.** El envejecimiento es el principal factor de riesgo para la enfermedad cerebrovascular. La incidencia del ictus aumenta exponencialmente con la edad, alcanzando sus valores máximos por encima de los 65 años.

**Sexo.** Se ha visto que los varones tienen mayor incidencia de ictus que las mujeres, si bien la mortalidad en estas es mayor.

**Grupo étnico.** La ateromatosis de grandes vasos afecta con mayor frecuencia a los individuos caucásicos; mientras que la patología de pequeño vaso es más frecuente en africanos y asiáticos.

**Factores genéticos.** Existe una predisposición familiar a padecer ictus, posiblemente debido a la hipertensión, a la diabetes mellitus o la hipercolesterolemia.

### 1.1.3.B) Factores de riesgo modificables bien establecidos

Son aquellos que podemos controlar ya que son debidos a comportamientos del individuo o a patologías que pueden controlarse total o parcialmente con un estilo de vida adecuado o con la ayuda de tratamiento farmacológico.

Los factores de riesgo más importantes dentro de este grupo son:

**Hipertensión arterial:** es el principal factor de riesgo de cualquier tipo de ictus.

**Diabetes mellitus:** se estima que el riesgo de ictus en pacientes diabéticos aumenta 1,8 veces en varones y 2,2 veces en mujeres. La diabetes predispone al ictus isquémico debido a su influencia en el desarrollo de aterosclerosis.

**Hiperlipemia:** favorece el desarrollo de la ateromatosis y de la isquemia, tanto coronaria como carotídea.

**Cardiopatía:** las enfermedades cardíacas tienen una clara asociación con los ictus, especialmente la fibrilación auricular, las valvulopatías, el infarto de miocardio, la hipertrofia ventricular izquierda y la cardiomegalia.

**Ateromatosis:** las placas de colesterol de más de 4 mm de diámetro en el cayado aórtico constituyen un factor de riesgo para el ictus

**AITs previos:** el 10 por ciento de los pacientes con AIT desarrollarán un ictus en los siguientes tres meses y, de estos, 50 por ciento lo harán en los dos días siguientes.

### 1.1.3.C) Factores de riesgo potencialmente modificables

Son aquellos en los que el nivel de evidencia, grado de asociación y riesgo relativo no está bien establecido. Destacan el consumo de tabaco y alcohol y la obesidad, aunque se han descrito otros factores.

**Tabaquismo:** el consumo de cigarrillos predispone a la aparición de aterosclerosis en hombres y mujeres, con un incremento del riesgo de 2-3 veces. El tabaco facilita el espasmo arterial y el daño endotelial. Este riesgo añadido del tabaco desaparece tras cinco años de abstinencia.

**Alcohol:** el consumo de alcohol a dosis elevadas aumenta el riesgo de ictus al provocar hipertensión arterial, alteraciones de la coagulación, arritmias cardíacas y disminución del flujo sanguíneo cerebral.

**Obesidad:** se ha encontrado una asociación entre obesidad y mayor riesgo de ictus, lo que puede deberse a la relación comprobada de la obesidad con la HTA, dislipemia, hiperinsulinemia y la intolerancia a la glucosa.

**Otros factores:** el sedentarismo, la menopausia, la migraña, el ronquido nocturno, el síndrome de apnea del sueño y los anticonceptivos orales también se han relacionado con un incremento del riesgo de ictus.

Un dato a tener en cuenta es la asociación entre los distintos factores de riesgo ya que, a medida que los factores de riesgo se suman, el riesgo de un ictus aumenta de forma exponencial.

Factores de riesgo no modificables	Factores de riesgo modificables bien establecidos	Factores de riesgo potencialmente modificables
Edad	Hipertensión arterial	Tabaquismo
Sexo	Diabetes mellitus	Alcoholismo
Grupo étnico	Hiperlipemia	Obesidad
Factores genéticos	Cardiopatías de alto riesgo embolígeno	Dislipemias
	Ateromatosis	Sedentarismo
	Ataque isquémico transitorio previo	Cardiopatías de bajo-medio riesgo embolígeno
		Otros: anticonceptivos orales, menopausia, migraña, etc.

**Tabla. 1.1. Clasificación de los factores de riesgo que afectan a la posibilidad de sufrir un ictus.** Los factores de riesgo se clasifican en este caso en función de si pueden ser modificados o no y del grado de asociación entre factor y riesgo.

### 1.1.4 Fisiopatología del ictus isquémico

Pese a que el peso del cerebro representa tan solo el 2% del peso corporal, consume aproximadamente un 20% del total del oxígeno que requiere el cuerpo y recibe un 15% del flujo cardiaco. A pesar de esto, el cerebro no dispone de depósitos energéticos, por lo que las células del sistema nervioso central necesitan un flujo sanguíneo continuo que aporte el oxígeno y glucosa necesarios para mantener su actividad metabólica (Magistretti et al., 1995). Casi la totalidad de la energía que utiliza el cerebro proviene del metabolismo de la glucosa. Existen excepciones, como el ayuno prolongado, en que el cerebro obtiene la energía a partir de los cuerpos cetónicos (Prins, 2008).

La capacidad de depósito de glucosa y glucógeno del cerebro es reducida y sólo puede cubrir los requerimientos energéticos cerebrales durante tiempos cortos. Estas diferencias con el resto de tejidos se cree que se deben a que las neuronas no funcionan de forma autónoma, sino dentro de complejos neuronales, que para su funcionamiento se integran con otras partes del sistema nervioso. Por otro lado, también hay que considerar el fenómeno de la selectividad de la barrera hematoencefálica, que selecciona tanto el tipo como la velocidad de paso de moléculas desde la sangre al cerebro. Por tanto, estas características del tejido nervioso, especialmente la utilización exclusiva de glucosa y el escaso margen de almacenamiento, obliga a un estrecho acoplamiento entre perfusión, metabolismo energético y función (Magistretti et al., 1995). De esta forma, el desacoplamiento que se produce entre todos estos elementos durante el ictus isquémico nos explica la fisiopatología de esta enfermedad.

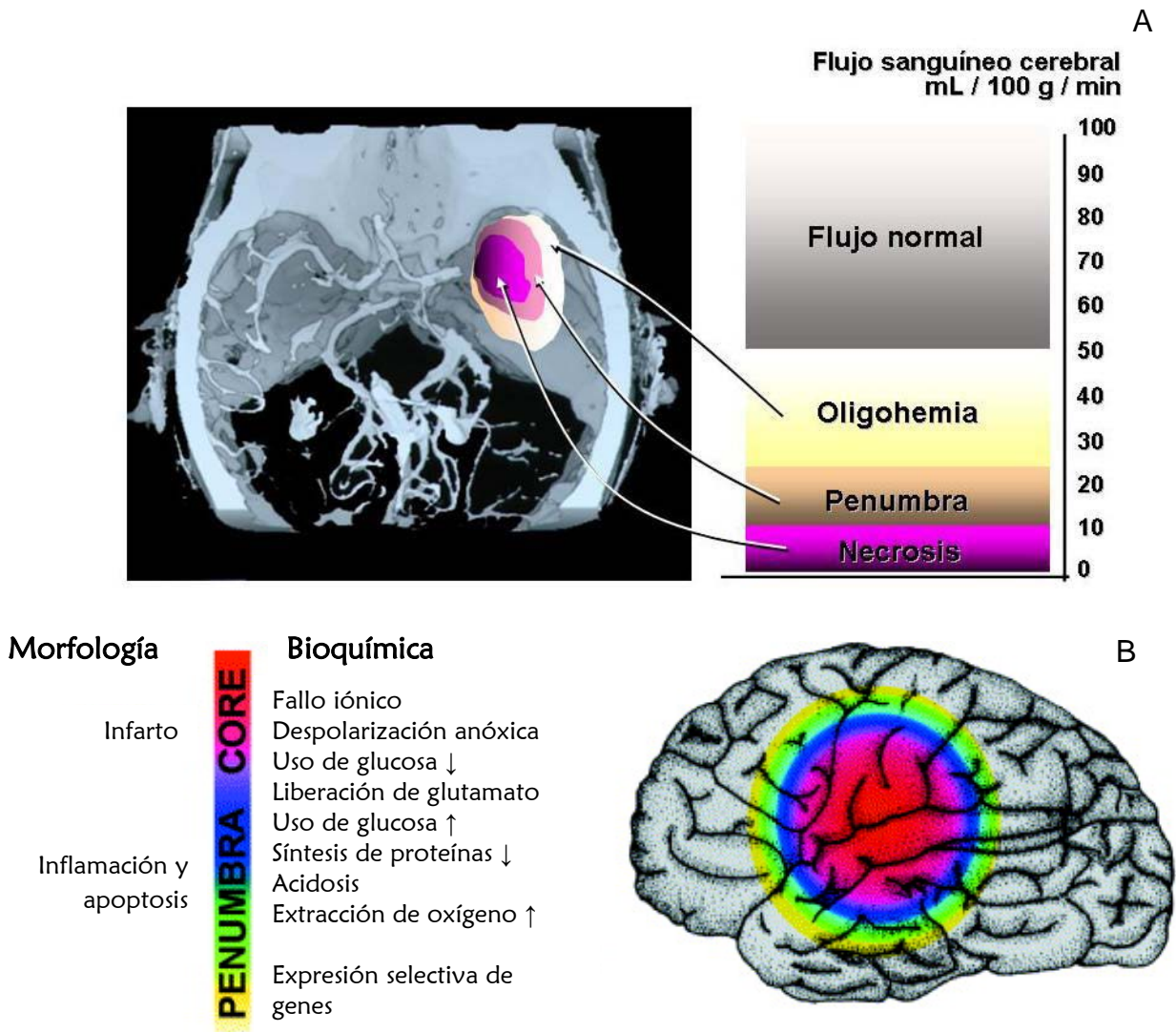
Debido a la interrupción del flujo sanguíneo cerebral, en el cerebro hay una reducción drástica del aporte de oxígeno y del ATP necesarios para el mantenimiento de las funciones del tejido. Este hecho desencadena una serie de eventos, que en su conjunto son denominados cascada isquémica.

#### 1.1.4.A) La lesión isquémica. Penumbra y core

El flujo sanguíneo cerebral (FSC) en una persona adulta normal es de unos 60ml/100g/min (Agnoli et al., 1968). La obstrucción de un vaso en el cerebro produce una reducción del flujo sanguíneo cerebral, pero esta reducción no es homogénea en todo el tejido, de forma que se diferencian al menos dos regiones atendiendo al FSC que reciben: una zona central, denominada *core* del infarto o simplemente *core*, con un flujo sanguíneo tan reducido (<10ml/100g/min) que se produce daño celular por mecanismos citotóxicos y desequilibrio iónico, progresando rápidamente a una lesión irreversible (Pulsinelli, 1992), y otra zona periférica, irrigada por circulación colateral, que podría recuperar la función perdida, definida por Astrup como **penumbra isquémica** (Astrup et al., 1977).

Astrup definió el área de penumbra como el tejido encefálico isquémico que se encuentra perfundido con unos niveles de FSC por debajo de 20ml/100g/min, donde comienza a manifestarse el déficit electrofisiológico y funcional, y por encima del umbral de “agotamiento” de la membrana (10ml/100g/min), nivel para el cual las neuronas son incapaces de mantener la integridad de dicha membrana, resultando en muerte celular (Fig.1.3). Esta definición se refiere al área del cerebro dañada pero que aún no había

muerto, lo que ofrece la posibilidad de aplicar terapias neuroprotectoras, capaces de recuperar el tejido dañado.



**Figura 1.3. Diagrama de las zonas que se distinguen durante un ictus isquémico en función del flujo cerebral. A.** Cuando el flujo sanguíneo es inferior a 10mL/100g/min se produce un daño celular irreversible debido a la ausencia de energía y O<sub>2</sub> que termina con la muerte celular por necrosis. Esta región se corresponde con el core. Alrededor del core existe un área con flujo sanguíneo reducido (<20ml/100g/min) tal que la reducción de O<sub>2</sub> y energía ocasionan una alteración del funcionamiento celular pero no la muerte. Esta región es la que denominamos penumbra y es potencialmente salvable si somos capaces de restaurar el flujo sanguíneo en esta zona antes de que el daño se agrave. Existe una tercera zona con flujo sanguíneo ligeramente reducido (zona oligohémica) en la cual el riesgo de que este tejido se convierta en tejido infartado solo ocurrirá en circunstancias muy adversas (Castillo y Leira, 2001).

**B.** Progresión de las regiones isquémicas relacionando el flujo sanguíneo con los eventos bioquímicos que ocurren, teniendo en cuenta que existen umbrales de perfusión por debajo del cual ciertas funciones bioquímicas están impedidas (escala de un código de colores). Hay que tener en cuenta que desde el inicio del déficit de perfusión focal, el core y la penumbra son dinámicos en el espacio y el tiempo. (Dirnagl et al., 1999)

Sin duda, definir la penumbra como un área isquémica es una visión simplista del fenómeno y por tanto es necesario considerar otras variables y métodos que nos ayuden a comprender qué fenómenos pueden actuar sobre el área con daño funcional y las posibilidades de recuperación. Por tanto podemos decir que la penumbra isquémica es un área de tejido cerebral que se encuentra dañado pero que aún no ha muerto después de la isquemia, lo que implica que aún puede ser recuperado (Lo, 2008).

#### **1.1.4.B) La cascada isquémica**

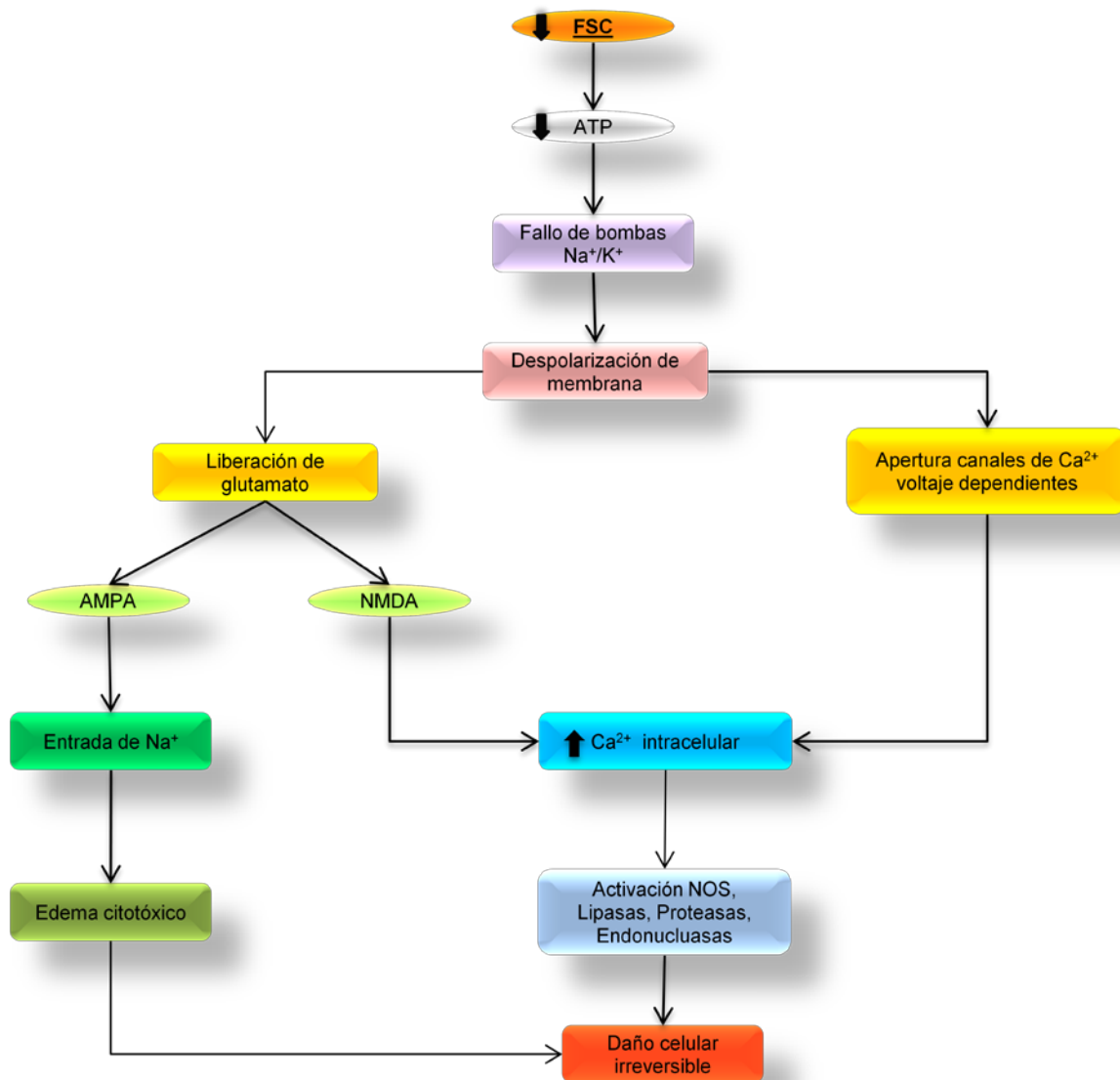
Como consecuencia de la reducción de la disponibilidad de oxígeno, el metabolismo de la glucosa es desviado a la vía anaerobia, produciendo un aumento de ácido láctico, y la consiguiente acidosis. Esta acidosis es responsable de la inhibición de la fosforilación oxidativa para la producción de ATP (Hillered et al., 1985), lo que contribuye al déficit energético, favorece la edematización celular, aumenta la concentración de calcio libre intracelular al liberarlo de su unión a proteínas (Folbergrová et al., 1990), contribuye a la lesión endotelial y a la alteración secundaria de la microcirculación y libera hierro iónico de su unión a proteínas en depósitos intracelulares lo que facilita la formación de radicales libres (Hurn et al., 1995; Lipscomb et al., 1998; Dávalos et al., 2000).

El fallo energético produce un fallo en el funcionamiento en las bombas sodio-potasio y otras bombas iónicas dependientes de ATP, lo que conlleva a una disminución del  $K^+$  intracelular y, por tanto, a la despolarización de la membrana. Esta despolarización de la membrana provoca la apertura de los canales de  $Ca^{2+}$  voltaje-dependiente y el desbloqueo de algunos canales dependientes de receptores. Todo ello ocasiona un incremento de la concentración de  $Ca^{2+}$  intracelular (Pulsinelli, 1992).

La despolarización de la membrana induce también la liberación de neurotransmisores excitadores como el glutamato (para revisión ver Choi y Rothman, 1990), que estimula receptores de membrana ionotrópicos (AMPA y NMDA) y receptores metabotrópicos. Como ya veremos más adelante en detalle, la estimulación del receptor AMPA consigue una mayor despolarización de la membrana al aumentar la concentración de  $Na^+$  intracelular, incrementando aún más la liberación de glutamato y ocasionando edema citotóxico.

La estimulación de los receptores NMDA es uno de los principales responsable del aumento del  $Ca^{2+}$  intracelular (Choi, 1988). Este incremento del  $Ca^{2+}$  intracelular activa diversas enzimas líticas (lipasas, endonucleasas y proteasas), y la activación de las

óxido nítrico sintasas (NOS) constitutivas, que desembocaran en un daño celular irreversible y la activación de genes de respuesta inmediata (Fig 1.4).



**Figura 1.4. Representación esquemática de la cascada isquémica.** La cascada isquémica es desencadenada por la depleción de oxígeno y de energía en el tejido cerebral, lo que provoca una serie de respuestas fisiológicas y bioquímicas que terminan con un daño celular irreversible y la muerte celular. Entre las respuestas que se producen tras el fallo bioenergético destaca la liberación de aminoácidos excitadores, sobre todo glutamato, que provoca la entrada de iones  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Na}^{+}$  en la célula, alterando la homeostasis y activando las proteasas y lipasas que liberan radicales libres, siendo éstos a su vez responsables de dañar las membranas celulares. Adaptado de Castillo y Leira (2001)

La formación de especies reactivas de oxígeno (EROs) y nitrógeno (ERNs) puede exceder la capacidad antioxidante de la neurona, ocasionando daño en varios constituyentes celulares. Las especies reactivas de oxígeno responsables del estrés oxidativo son (Dawson y Dawson, 1996):

- el anión superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), que se genera a través de múltiples vías metabólicas y es la ERO que inicia la cascada del estrés oxidativo en la isquemia cerebral
- el radical hidroxilo ( $OH\cdot$ )
- el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), que se forma mediante la acción de la superóxidodismutasa (SOD), que transforma el  $O_2^{\cdot-}$  en este radical y presenta la característica de que tiene fácil difusión dentro de la célula donde se origina y puede difundir también hacia neuronas adyacentes
- el óxido nítrico (NO), que es un gas inorgánico, permeable, difusible, y con gran capacidad reactiva. Se sintetiza a partir de la L- arginina por acción de la óxido nítrico sintasa (NOS). En condiciones normales, NO actúa como mensajero neuronal o como vasodilatador y antiagregante. Sin embargo, en algunas situaciones patológicas, como la isquemia, se origina una elevada producción de NO, que se ha puesto en relación con mecanismos antagónicos de neurotoxicidad y de neuroprotección
- el anión peroxinitrito ( $ONOO^-$ ), que se forma cuando la formación de NO ocurre en presencia de un exceso de  $O_2^{\cdot-}$ . Es el responsable de la lisis neuronal, al reaccionar con radicales sulfhidrilo, grupos tiólicos, proteínas, lípidos y ácidos nucleicos

Además del glutamato, otros neurotransmisores aparecen en el espacio extracelular durante la isquemia cerebral, principalmente la glicina y el ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA). La glicina es un coactivador necesario del receptor NMDA y su excesiva liberación durante la isquemia origina un aumento de la estimulación del receptor y un mayor daño neuronal.

El GABA ejerce una neurotransmisión inhibitoria. Los niveles de GABA en el cerebro son controlados por la descarboxilasa del ácido glutámico (GAD), que sintetiza el GABA a partir del glutamato, y por la GABA transaminasa (GABA-T), que lo degrada. El efecto inhibitorio del GABA se ejerce principalmente a través de dos receptores, el  $GABA_A$ , especialmente significativo en la sustancia gris, y el  $GABA_B$ , más activo en la sustancia blanca. El receptor  $GABA_A$  es ionotrópico y su estimulación origina la entrada de  $Cl^-$  en el interior de la neurona, facilitando su hiperpolarización; el receptor  $GABA_B$  es metabotrópico, acoplado a una proteína G y resultando en la producción de un segundo mensajero. Durante la isquemia cerebral se produce un aumento de la síntesis del GABA, favorecido por el aumento de la concentración de glutamato, por el

aumento de la actividad del GAD (que es independiente del ATP y más activa en presencia de acidosis), y por la inhibición de la enzima GABA-T (más activa con pH elevado). Al mismo tiempo, la despolarización de la membrana neuronal originada por la isquemia conduce a la liberación del GABA en el espacio extracelular, donde llega a alcanzar niveles 250 veces más elevados que en situaciones fisiológicas (Nishikawa et al., 1994).

La muerte neuronal en la zona de penumbra isquémica también es, en parte, el resultado de un proceso apoptótico. La lesión del ADN a través de las endonucleasas o de las EROs inicia un complejo mecanismo autodestructivo en el que está implicado una alteración de la expresión génica. Cada vez existen más evidencias que demuestran el papel de las mitocondrias en la inducción de esta muerte neuronal programada (para revisión, ver Green y Reed, 1998). Reducciones moderadas del ATP mitocondrial originan la liberación de caspasas, citocromo-c y del factor de inducción de la apoptosis, que actúan como iniciadores de la muerte neuronal apoptótica (Susin et al., 1999).

Otros cambios bioquímicos que se detectan durante la isquemia cerebral incluyen la acumulación de ácidos grasos libres y la metabolización de fosfolípidos. Muchos de los ácidos grasos libres derivan de los lípidos de membrana que son degradados como resultado de la activación de lipasas y fosfolipasas. Ciertas fosfolipasas, como la fosfolipasa A2, son dependientes de calcio y se activan en situaciones de isquemia (Adibhatla y Hatcher, 2006). Además, uno de los aspectos más sensibles a la reducción del flujo sanguíneo cerebral es la síntesis proteica, que se inhibe profundamente durante la isquemia (Neumar et al., 1998), a pesar de que no se observan cambios morfológicos en los polirribosomas, que permanecen agregados durante el periodo de isquemia. Esto impide la nueva síntesis de proteínas que, de prolongarse el tiempo suficiente, podría provocar un déficit en proteínas esenciales para la supervivencia celular (Planas, 1997).

#### **1.1.4.C) La inflamación en la isquemia cerebral**

Existe un importante componente inflamatorio en la patología de la isquemia cerebral. Los principales mediadores del daño inflamatorio son citocinas (IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$  y TGF- $\beta$ ), moléculas de adhesión (selectinas, integrinas e inmunoglobulinas), eicosanoides y la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS), que se expresan y/o liberan inmediatamente después de la isquemia y contribuyen al daño neuronal (para revisión, ver Wang et al., 2007). Estas moléculas son producidas por células endoteliales,

neuronas, astrocitos, células microgliales y leucocitos (granulocitos, macrófagos y linfocitos).

El papel de la microglía parece fundamental tras un proceso isquémico. Las células microgliales son los macrófagos residentes del sistema nervioso central (para revisión, ver Kreutzberg, 1996; Fumagalli et al., 2015) y una vez activadas se transforman en fagocitos.

## 1.2 Excitotoxicidad por glutamato

Antes de ahondar en el problema de la excitotoxicidad, es necesario que tratemos los mecanismos que, en condiciones normales, rodean al metabolismo del glutamato para poder comprender mejor los procesos celulares y fisiológicos que ocurren cuando estos mecanismos fallan, ya sea por exceso o por defecto, cómo interaccionan entre sí y cuáles son sus mecanismos reguladores.

### 1.2.1 El glutamato en el SNC

#### 1.2.1.A) El glutamato

El glutamato es el principal neurotransmisor excitador del SNC. A finales de los años 50, Curtis y cols. (Curtis et al., 1959) describió sus efectos excitadores al ver que producía actividad convulsiva, además de despolarización de neuronas e incremento de la frecuencia de los potenciales de acción.

La concentración de glutamato no es homogénea en todo el cerebro: en el espacio extracelular se mantiene próxima a 1  $\mu\text{M}$  en estado basal mientras que la concentración intracelular es aproximadamente 5-10 mM llegando a concentraciones entre 50 y 100 mM en las vesículas sinápticas (Nicholls, 1993; Teichberg et al., 2009).

El glutamato es el principal neurotransmisor en las sinapsis excitadoras rápidas del sistema nervioso central (para revisión ver en Nicholls, 1993). Cuando el glutamato es liberado en la sinapsis, activa los receptores ionotrópicos y metabotrópicos de glutamato (se describirán más adelante) en la hendidura sináptica, que pueden introducir  $\text{Na}^+$  y/o  $\text{Ca}^{2+}$  o interaccionar con proteínas G, respectivamente, para producir la excitación de las células post-sinápticas (Mark et al., 2001; Pittenger et al., 2011).

Como ya hemos visto, la principal función de glutamato es actuar como neurotransmisor. El 90% de las neuronas de las áreas del cerebro implicadas en procesos

cognitivos, tales como la corteza y el hipocampo, usan glutamato como neurotransmisor. Diversas patologías como el ictus, la esquizofrenia, la enfermedad de Alzheimer o la esclerosis múltiple, están asociadas a alteraciones en el sistema glutamatérgico (Medina-Ceja et al., 2007).

### Síntesis de glutamato

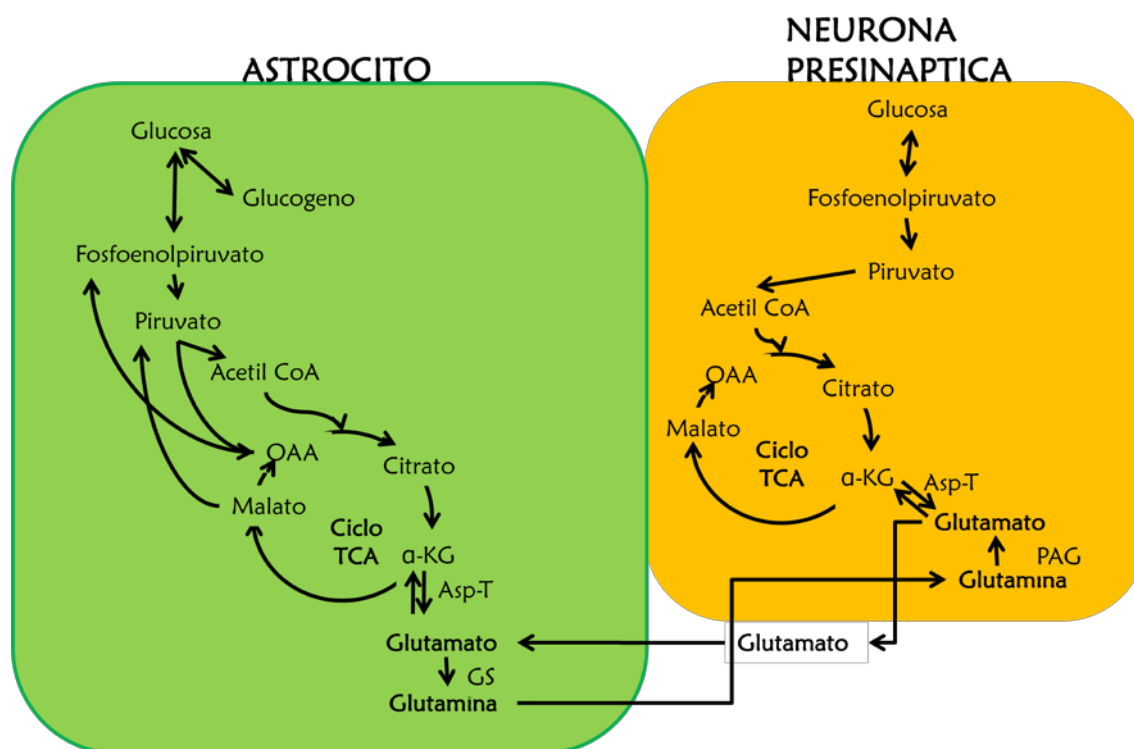
En el tejido nervioso, el glutamato es sintetizado a partir de dos principales precursores: la glucosa (Bak et al., 2006) y la glutamina (McKenna, 2007). En la síntesis de glutamato a partir de glucosa, ésta atraviesa la barrera hematoencefálica e ingresa en los astrocitos y en las neuronas, donde es oxidada a través de la vía glicolítica hasta piruvato (Hertz y Kala, 2007). En el astrocito, la glucosa puede ser convertida en lactato, que es transferido a la neurona donde se transforma en piruvato (Magistretti et al., 1995). El piruvato es convertido por la acción de la piruvato deshidrogenasa (PDH) en acetil coenzima A (acetil CoA), que se incorpora al ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA) al condensarse con oxalacetato (OAA) para formar citrato, que continúa el ciclo hasta la formación de  $\alpha$ -cetoglutarato ( $\alpha$ -KG). La molécula de  $\alpha$ -KG formada puede seguir dos vías: por un lado, el  $\alpha$ -KG puede continuar en el TCA hasta la formación de OAA, el cual se condensa nuevamente con otra molécula de acetil-CoA. La segunda vía posible es que el  $\alpha$ -KG sea transaminado por la enzima aspartato aminotransferasa (Asp-T) dando lugar a la formación de glutamato (Hertz y Kala, 2007).

Aunque tanto neuronas como astrocitos son capaces de sintetizar glutamato a partir de  $\alpha$ -KG, el ciclo de los ácidos tricarboxílicos en los astrocitos es más eficiente. A diferencia de las neuronas, los astrocitos poseen dos vías de entrada de piruvato al TCA, la primera mediada por PDH y una segunda vía exclusiva de los astrocitos en la que ocurre la carboxilación del piruvato formando OAA. Esta vía depende de la actividad de la enzima piruvato carboxilasa (PC) (Zwingmann y Leibfritz, 2003). De este modo, los astrocitos producen intermediarios metabólicos del TCA ( $\alpha$ -cetoglutarato y malato) que pueden ser utilizados por las neuronas glutamatérgicas para la síntesis del neurotransmisor glutamato (Hertz y Kala, 2007) (Fig. 1.5).

El grupo amino del glutamato deriva de aminoácidos que son transportados activamente a través de la barrera hematoencefálica. Se ha demostrado que los aminoácidos ramificados como leucina, isoleucina y valina contribuyen de forma importante como donadores del grupo amino en la síntesis de glutamato (Daikhin y Yudkoff, 2000). Debido a que la captación de aminoácidos por el cerebro es mucho menor que la captura de glucosa, el grupo amino puede ser reutilizado en el cerebro a

partir de aminoácidos que fueron sintetizados localmente. En este caso concreto, el aspartato es un importante reservorio de grupos amino para la síntesis de glutamato (Hassel y Dingledine, 2006).

En cuanto a la glutamina como precursor de glutamato, ha sido ampliamente demostrado que solo se produce en las neuronas que poseen una gran actividad de la enzima glutaminasa, que cataliza la síntesis de glutamato a partir de glutamina. Esta reacción ocurre en la mitocondria de las neuronas y forma parte de un ciclo en el que interactúan astrocitos y neuronas. Cuando el glutamato es liberado desde las terminaciones nerviosas, es captado por los astrocitos circundantes. En el citoplasma astrocitario, el glutamato reacciona con amonio por la actividad de la enzima glutamina sintetasa (GS) y forma glutamina. Esta glutamina es liberada y tomada por las neuronas para convertirla en glutamato por la acción de la glutaminasa dependiente de fosfato (PAG) (Fig. 1.5) (para revisión, ver Danbolt, 2001). Este tráfico de glutamato y glutamina entre astrocito y neuronas ha sido propuesto como la principal vía por la cual el neurotransmisor glutamato es reciclado.



**Figura 1.5. Síntesis de glutamato.** PDH: piruvato deshidrogenasa; PC:piruvato carboxilasa; Asp-T: aspartato aminotransferasa; GS: glutamina sintetasa; PAG: glutaminasa activada por fosfato; OAA: oxalacetato; α-KG:alfa-cetoglutaratociclo TCA ciclo de los ácidos tricarbóxicos (modificado de McKenna, 2007)

### Liberación de glutamato

El control presináptico de la sinapsis es común en todo el sistema nervioso central (Nicoll et al., 1990; Wu y Saggau, 1997; Miller, 1998). La liberación de las vesículas sinápticas es un proceso altamente regulado que involucra una maquinaria molecular compleja provocada por la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de los canales de calcio dependientes de voltaje durante la despolarización axonal (para revisión ver en Murthy y De Camilli, 2003; Sudhof, 2004). El proceso de liberación de las vesículas sinápticas se puede dividir en diferentes pasos. En primer lugar, la sinaptobrevina (VAMP- Vesicle Associated Membrane Protein-) forma un complejo con la sintaxina 1a y SNAP-25 (Synaptosomal Associated Protein 25), que recibe el nombre de complejo SNARE, que aproxima la vesícula a la membrana presináptica y que es esencial para la exocitosis. Después de la fusión, la unión de  $\alpha$ -SNAP y NSF (N-ethyl maleimide Sensitive Factor) facilita el desensamblaje del complejo SNARE y la reutilización de sus componentes. Los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes de voltaje interactúan con proteínas del complejo SNARE. La proximidad de estos canales facilita la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  hacia este complejo y es el elemento final necesario para la fusión completa de la membrana y la liberación de neurotransmisores (DeBello et al., 1995; Martin-Moutot et al., 1996; Matthews, 1996; Zucker, 1996; Stanley, 1997; Sudhof y Rothman, 2009; Rizo y Sudhof, 2012).

### Recaptación de glutamato

El neurotransmisor es recaptado a través de los transportadores de glutamato (ver apartado 1.2.2.C) localizados tanto en la membrana pre-sináptica, como en la post-sináptica, así como también en otros tipos celulares como la astrogliá (Shigeri et al., 2004). En los astrocitos, esta recaptación es realizada mediante transportadores de membrana (principalmente EAAT-1 y EAAT-2), lo que permite controlar la concentración de glutamato presente en la hendidura sináptica (Nicholls y Attwell, 1990). El paso de glutamato al interior del astrocito mediado por estos transportadores utiliza como mecanismo motriz el gradiente de  $\text{Na}^+$  de la membrana plasmática.

Los astrocitos transforman el glutamato en glutamina mediante el ciclo glutamato-glutamina, en un proceso dependiente de ATP y ésta es expulsada del astrocito a través de transportadores específicos y recaptada por la neurona mediante otro tipo de transportador. En la neurona, la glutamina vuelve a convertirse en glutamato. El glutamato, sintetizado o recaptado, se incorpora a las vesículas sinápticas a través de los transportadores vesiculares de glutamato (VGLUTs) y, posteriormente, es liberado al medio extracelular (Danbolt, 2001).

El transporte de glutamato al interior de la vesícula a través de los VGLUTs es dependiente de un gradiente electroquímico producido por una H<sup>+</sup>-ATPasa incorporada a la membrana vesicular. El gliceraldehído-3-fosfato es convertido por la enzima gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) a 1,3-bis-fosfoglicerato, el cual es desfosforilado, suministrando el ATP que necesita la H<sup>+</sup>-ATPasa. Una vez generado el gradiente, el glutamato es transportado al interior de la vesícula (Shigeri et al., 2004; El Mestikawy et al., 2011).

### Metabolismo del glutamato

El glutamato, además de neurotransmisor, es un importante intermedio en el metabolismo energético, en concreto entre el ciclo TCA y la síntesis de aminoácidos (Erecinska y Silver, 1990). El glutamato es también parte de la lanzadera del malato-aspartato, transfiriendo equivalentes reductores desde el citosol a las mitocondrias para la reoxidación y para la generación de ATP en la cadena transportadora de electrones (McKenna et al., 2006b). Esta lanzadera malato-aspartato es de particular importancia en un órgano altamente aeróbico como el cerebro, el cual utiliza la glucosa casi exclusivamente como sustrato energético.

El glutamato se sintetiza a partir de  $\alpha$ -KG a través de transaminación o aminación reductora, proceso este último catalizado por la glutamato deshidrogenasa (GDH). Las transaminasas de importancia para el mantenimiento de la homeostasis del glutamato en el cerebro son principalmente la aspartato aminotransferasa (AAT), la aminotransferasa de cadena ramificada (BCAT), y la alanina aminotransferasa (ALAT).

El glutamato además es un precursor de GABA, glutamina, prolina y arginina, y también participa en la degradación de los esqueletos de carbono de estos aminoácidos, así como de la histidina, antes de la conversión a alfa-cetoglutarato y la degradación oxidativa en el ciclo TCA. El glutamato es también parte del glutatión, que además consta de una molécula de cisteína y otra de glicina. El glutatión es un importante antioxidante intracelular en el cerebro y se sintetiza en astrocitos y neuronas, en estas últimas preferentemente por un suministro del precursor CysGly a partir de astrocitos (Dringen et al., 1999).

### Eliminación del glutamato

Las concentraciones de glutamato en el espacio extracelular en condiciones normales se mantienen bajas y estrechamente controladas por los transportadores presentes en las terminaciones nerviosas, células gliales circundantes y las neuronas

postsinápticas. Las perturbaciones de este sistema de regulación pueden tener efectos deletéreos tales como el exceso de liberación de glutamato, hasta el punto de desencadenar excitotoxicidad y muerte celular (Choi y Rothman, 1990). El proceso de transporte se considera que es el principal responsable de la terminación de la acción del neurotransmisor de glutamato y la prevención de daño neuronal a partir de la activación excesiva de receptores de glutamato (Minami et al., 2001). Más adelante detallaremos este transporte y sus transportadores.

### 1.2.1.B) Receptores de glutamato

Los estudios realizados con glutamato han permitido clasificar los receptores de este en función de sus propiedades farmacológicas y moleculares. De este modo, se han diferenciado dos tipos de receptores: receptores ionotrópicos (iGluR), implicados en la neurotransmisión rápida en el SNC, y receptores metabotrópicos (mGluR), que median la actividad sináptica lenta.

Los receptores ionotrópicos de glutamato, a su vez, se clasificaron en función de sus agonistas específicos (Tabla 1.2). De esta manera, encontramos receptores NMDA (N-metil-D-aspartato), receptores AMPA ( $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol-propionato) y receptores kainato.

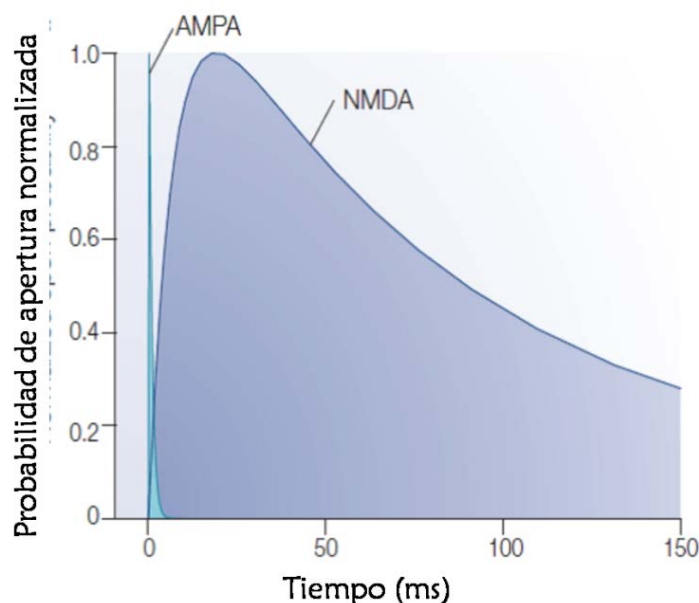
RECEPTORES IONOTRÓPICOS			
	NMDA	AMPA	KAINATO
Agonistas endógenos	Glutamato, Aspartato	Glutamato	Glutamato
Agonistas selectivos	NMDA	AMPA	Ácido kaínico
Antagonistas y bloqueantes del canal	AP-5, dizolcipina, fenciclidina, ketamina, memantina, Mg <sup>2+</sup> ,	Ácido 7-cloroquinurénico	NBQX

**Tabla. 1.3. Receptores ionotrópicos de glutamato.** AP-5: ácido 2-amino-5-fosfonopentanoico; NBQX: 2,3-dihidro-6-nitro-7-sulfamoilbenzoquinoxalina.

Por otro lado, los iGluR son canales de cationes cuya probabilidad de apertura se ve incrementada cuando el glutamato se une al receptor. (Monaghan et al., 1989; Hollmann et al., 1994b; Hollmann y Heinemann, 1994; Hollmann et al., 1994a).

Los **receptores AMPA** y **kainato** tienen una cinética rápida (Fig. 1.6) y dejan pasar principalmente  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$ , y en menor medida  $\text{Ca}^{2+}$ , lo que produce una gran despolarización de la neurona (Hollmann et al., 1991). Los receptores AMPA son principalmente permeables al  $\text{Na}^+$  y están implicados en la respuesta rápida de la neurotransmisión (generación de potenciales de acción).

Los **receptores NMDA**, sin embargo, son permeables a cationes monovalentes ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ) y divalentes ( $\text{Ca}^{2+}$ ), por lo que estos canales juegan un papel más importante en la excitotoxicidad (Ichinose et al., 2003). Su cinética es más lenta (Fig. 1.6) que la de los receptores anteriores (AMPA) y presentan una alta permeabilidad a  $\text{Ca}^{2+}$  (Wisden y Seeburg, 1993), permitiendo la activación de quinasas dependientes de calcio-calmodulina, la proteína quinasa C (PKC) o la proteínaquinasa A (PKA). La entrada masiva de  $\text{Ca}^{2+}$  puede inducir la formación de especies reactivas de oxígeno, aunque también la actividad de los receptores NMDA ha sido vinculada a la reparación de los daños en el ADN, precisamente a través de la inducción de expresión de enzimas reparadoras controladas por el factor de transcripción CREB (*cAMP Response Element-Binding*) y a la expresión de BDNF (*Brain Derived Neurotrophic Factor*) (Hardingham et al., 2002; Papadia et al., 2005; Yang et al., 2011).



**Figura 1.6. Activación de los receptores AMPA y NMDA en el tiempo.** La respuesta a este pulso de glutamato en el caso de los receptores AMPA es rápida y de corta duración, mientras que en el caso de los receptores NMDA, la respuesta es más tardía y se mantiene activa durante más tiempo. (Attwell y Gibb, 2005)

Los **receptores metabotrópicos** de glutamato (mGluRs) están acoplados a proteínas G y producen sus efectos mediante mecanismos de señalización regulados por AMPc, proteína quinasa C (PKC),  $Ca^{2+}$  o inositoltrifosfato, debido a lo cual la respuesta es más lenta. Se clasifican, a su vez, en tres clases (I, II y III) dependiendo de su mecanismo de transducción de señal, la secuencia de aminoácidos y sus agonistas. El grupo I incluye los receptores mGluR1 y 5, que están acoplados a proteínas  $G_q$ , que activan la fosfolipasa C, promueven la formación de diacilglicerol y 1,4,5-inositol trifosfato. Esto a su vez lleva a la activación de PKC y activación de CREB y la liberación de  $Ca^{2+}$  desde compartimentos intracelulares como el retículo endoplasmático (para revisión, ver Nakamichi et al., 2009). Además de su función individual, mGluR5 puede amplificar la potenciación a largo plazo por su interacción a nivel intracelular mediante proteínas de anclaje con el receptor NMDA y puede formar dímeros y afectar la función de otros receptores como receptores de  $Ca^{2+}$ , adenosina, opioides y de factores de crecimiento como el factor de crecimiento epidérmico (EGF) (Bird y Lawrence, 2009). Los receptores de los grupos II (mGluR2 y 3) y III (mGluR 4, 5, 6 7 y 8) están acoplados a proteínas G inhibitorias ( $G_i/o$ ) que reducen la formación de AMPc interrumpiendo su función como segundo mensajero (para revisión ver Nakamichi et al., 2009).

### 1.2.2.C) Transportadores de glutamato

Hasta el momento se ha descrito la existencia de dos familias de transportadores de glutamato, los transportadores de aminoácidos excitadores o EAATs y los transportadores vesiculares de glutamato o VGLUTs.

#### Transportadores de aminoácidos excitadores de la membrana plasmática (EAAT)

Debido al papel de neurotransmisor excitador del glutamato, los transportadores de este aminoácido juegan un papel crucial en el control de la concentración de este neurotransmisor en el cerebro (Beart y O'Shea, 2007). El proceso de retirada del glutamato del espacio extracelular es llevado a cabo por una familia de proteínas que tienen función transportadora y son dependientes de  $Na^+$  y de alta afinidad por glutamato denominadas EAAT (Excitatory Amino Acid Transporters), que posee 5 miembros: EAAT-1 (GLAST-1), EAAT-2 (GLT-1), EAAT-3 (EAAC-1), EAAT-4 y EAAT-5 (Gegelashvili y Schousboe, 1997; Seal y Amara, 1999).

Los transportadores EAAT-1 y EAAT-2 son transportadores exclusivos de cerebro. Sin embargo, los otros transportadores (EAAT-3, EAAT-4 y EAAT-5) se pueden encontrar tanto en cerebro como en otros órganos.

EAAT-1 (GLAST-1): en el cerebro se localiza principalmente en la membrana plasmática de los astrocitos y en la glía del cerebelo, aunque también puede encontrarse en las células endoteliales que recubren los ventrículos (Pines et al., 1992; Storck et al., 1992; Nakayama et al., 1996).

EAAT-2 (GLT1): los niveles de este transportador son elevados en corteza cerebral, el hipocampo, el septo lateral, el tálamo, el estriado, el núcleo accumbens y el cerebelo. Se localiza principalmente en la membrana plasmática de astrocitos y células de la glía (Lehre et al., 1995), pero también lo podemos encontrar en neuronas (Chen et al., 2002). También se localiza junto a los cuerpos celulares de los astrocitos del giro temporal medio de humanos (Tessler et al., 1999) y se expresa en subgrupos de neuronas del hipocampo y la corteza (Schmitt et al., 1996; Torp et al., 1997). Es el transportador más activo en la corteza cerebral, siendo responsable de más del 90% del transporte total de glutamato en el cerebro, de forma que es esencial para el mantenimiento del equilibrio del tejido (para revisión, ver Haugeto et al., 1996; Danbolt, 2001).

EAAT-3: se encuentra solamente en neuronas (Rothstein et al., 1994) tanto glutamatergicas como gabaérgicas, en la membrana plasmática de somas y dendritas (Coco et al., 1997) y en los axones terminales de las células de Purkinje de los núcleos profundos cerebrales (Rothstein et al., 1994; Coco et al., 1997). En general se encuentra fuera de la sinapsis (Bergles et al., 1999).

EAAT-4: se restringe a la membrana plasmática y espinas dendríticas de las células de Purkinje en el cerebelo (Furuta et al., 1997; Nagao et al., 1997). Se localizan predominantemente fuera de las sinapsis (Bergles et al., 1999).

EAAT-5: se localiza solamente en las neuronas de la retina (Arriza et al., 1997).

El transporte de glutamato al interior de las células gliales permite limitar el tiempo de activación de los receptores y evita la aparición de daño debido a la excitotoxicidad que puede causar el glutamato. Además, gracias a este transporte de glutamato, parte de este aminoácido es reciclado, retornando a la neurona para ser reutilizado gracias también a los transportadores vesiculares VGLUT (Beart y O'Shea, 2007).

Inicialmente, se observó que para transportar una molécula de glutamato era necesario el cotransporte de  $\text{Na}^+$  y el intercambio de una molécula de  $\text{K}^+$  y un  $\text{OH}^-$  (Kanai et al., 1995). Más tarde, trabajos realizados con los transportador EAAT-3 y

EAAT-2 determinaron que el balance final en estos dos transportadores es diferente, se cotransportan tres  $\text{Na}^+$  y un  $\text{H}^+$  con cada glutamato y se intercambia un  $\text{K}^+$  (Levy et al., 1998; Attwell, 2000). El ciclo completo del transporte de glutamato se lleva a cabo en varias etapas (Fig.1.7):

- Traslocación: el transportador vacío se carga con tres iones  $\text{Na}^+$  y el glutamato/ $\text{H}^+$  para pasar la membrana plasmática y liberarse en el interior de la célula; este paso se caracteriza midiendo las corrientes dependientes de voltaje producidas por glutamato.
- Reubicación del transportador: el  $\text{K}^+$  se une al transportador en el interior de la célula y lo libera al exterior, para tener la proteína lista para cargarse nuevamente con  $\text{Na}^+$  y glutamato/ $\text{H}^+$  (Kanai et al., 1995; Nussberger et al., 1996).

Si el ciclo completo no se realiza debido a que no se reubica el transportador, éste se unirá a  $\text{Na}^+$  y glutamato nuevamente en el interior de la célula y los trasladará en dirección inversa (del interior celular al exterior) (Kanai y Hediger, 2003).

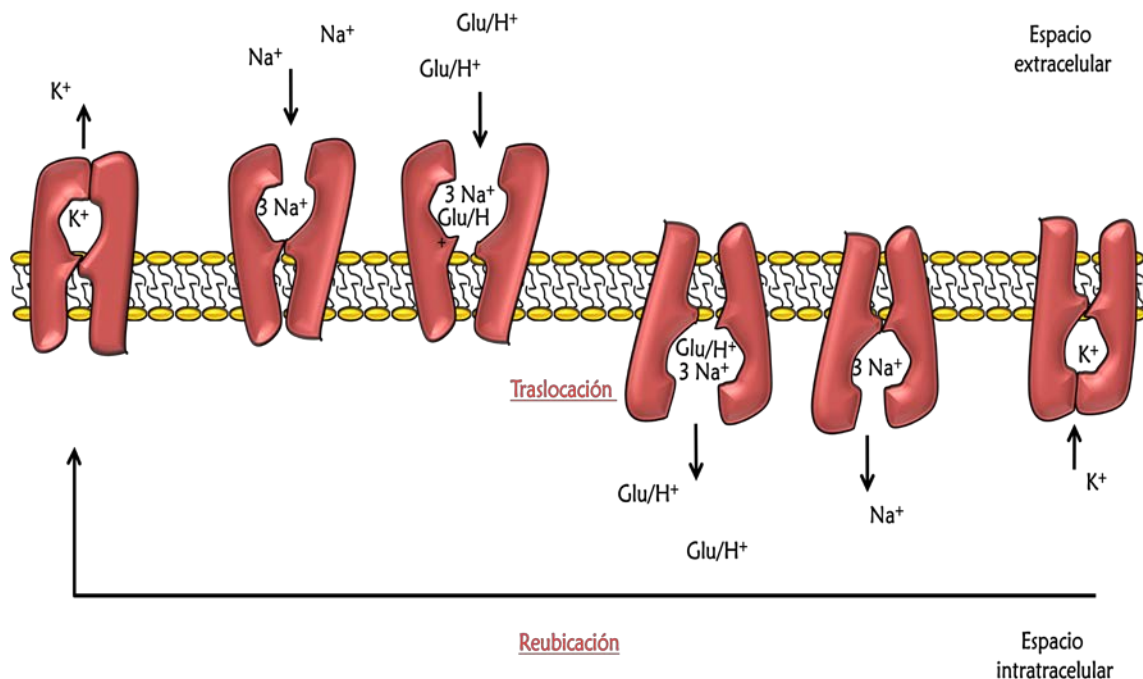


Figura 1.7. Mecanismo de transporte de glutamato (Glu) por los transportadores de aminoácidos excitadores. El ciclo completo comprende las etapas de traslocación y reubicación (Modificado de Medina-Ceja et al. 2007)

### Transportadores vesiculares de glutamato (VGLUTs)

El mecanismo de transporte utilizado por los VGLUTs para introducir el glutamato en las vesículas sinápticas depende del gradiente electroquímico de protones (Lee et al., 1999; Bellocchio et al., 2000; Bai et al., 2001; Takamori et al., 2001). La regulación de la concentración citosólica del glutamato por estos transportadores permite a su vez el control de los niveles extracelulares de glutamato, manteniéndolo en niveles suficientemente bajos para evitar la sobreestimulación de los receptores de glutamato. De esta forma se restringe el daño neuronal provocado por la excitotoxicidad (Struzyńska et al., 2005).

Se han descrito tres subtipos de transportadores vesiculares de glutamato (VGLUTs 1-3) (Hisano et al., 1997; Lee et al., 1999; Aihara et al., 2000; Bellocchio et al., 2000; Bai et al., 2001; Herzog et al., 2001; Takamori et al., 2001; Kim et al., 2006).

Los distintos subtipos de VGLUTs se expresan diferencialmente en el cerebro adulto de rata. Los VGLUTs 1 y 2 tienen una distribución amplia y complementaria, expresándose en los terminales de todas las sinapsis glutamatérgicas. El VGLUT1 es más abundante en la corteza cerebral, hipocampo y corteza cerebelosa, mientras que el VGLUT2 se localiza preferentemente en el diencefalo y rombencéfalo (Fremeau et al., 2001; Kaneko et al., 2002; Li et al., 2003). El VGLUT3 se expresa en poblaciones de neuronas que promueven la liberación de otros neurotransmisores clásicos, como interneuronas colinérgicas del cuerpo estriado, interneuronas gabérgicas de la corteza y el hipocampo y en las neuronas serotoninérgicas, y tiene una distribución subcelular tanto axonal como somatodendrítica (Santos et al., 2009). Además, el VGLUT3 se expresa también en tejidos fuera del SNC incluyendo el hígado y el riñón (Fremeau et al., 2002; Gras et al., 2002; Schafer et al., 2002).

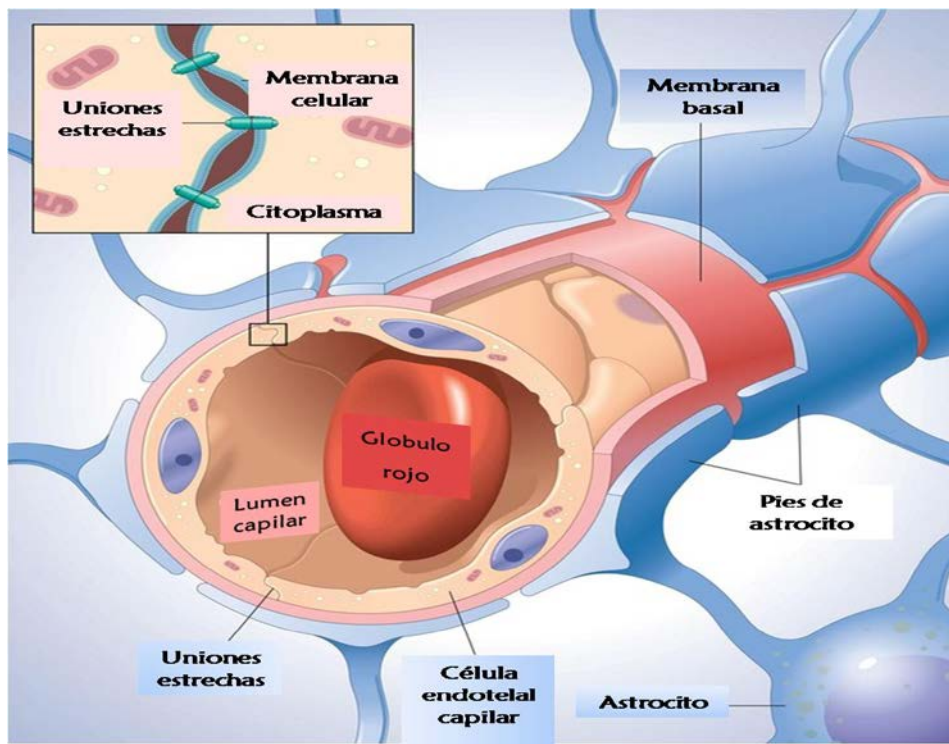
#### 1.2.2.D) Transporte cerebro-sangre

El sistema nervioso central se encuentra muy protegido y aislado. Las células endoteliales en esta región regulan de forma muy estricta el paso de sustancias, pero tienen que permitir un rápido intercambio de O<sub>2</sub> y glucosa, entre otras sustancias, para que el cerebro pueda realizar sus funciones con normalidad. Debido a este aislamiento del SNC se define el concepto de barrera hematoencefálica (BHE) como una estructura funcional de los vasos sanguíneos del SNC, que impide el intercambio libre de iones y moléculas orgánicas entre el plasma sanguíneo y el tejido nervioso (para revisión, ver Goldstein y Betz, 1986). Por tanto, la principal función de la barrera hematoencefálica es

regular el movimiento de nutrientes y otras moléculas desde el cerebro hacia fuera de éste y viceversa, de forma que se mantenga estable la composición del medio extracelular del tejido nervioso, al tiempo que protege a éste de agentes extraños.

Para lograr este aislamiento, las células endoteliales del SNC presentan ciertas características especiales que las diferencian de las células endoteliales presentes en otros tejidos (Fig. 1.8) (Pascual-Garvi et al., 2004):

- Sellado intercelular del endotelio únicamente por uniones intercelulares fuertes (uniones estrechas), de mayor complejidad, que impiden la comunicación a través de los espacios intercelulares y que permite diferenciar funcionalmente la membrana luminal (en contacto con la luz del vaso) y la membrana abluminal (contraria a la luz del vaso)
- Ausencia de fenestraciones (discontinuidades de la membrana), salvo en regiones sin barrera hematoencefálica
- Reducido número de vesículas de endocitosis intraendoteliales
- Elevado número relativo de mitocondrias
- Lamina basal simple en vez de doble, salvo en las arteriolas que cubren los pericitos



**Figura 1.8. Barrera hematoencefálica.** La barrera hematoencefálica controla el intercambio de sustancias entre la sangre y el cerebro.

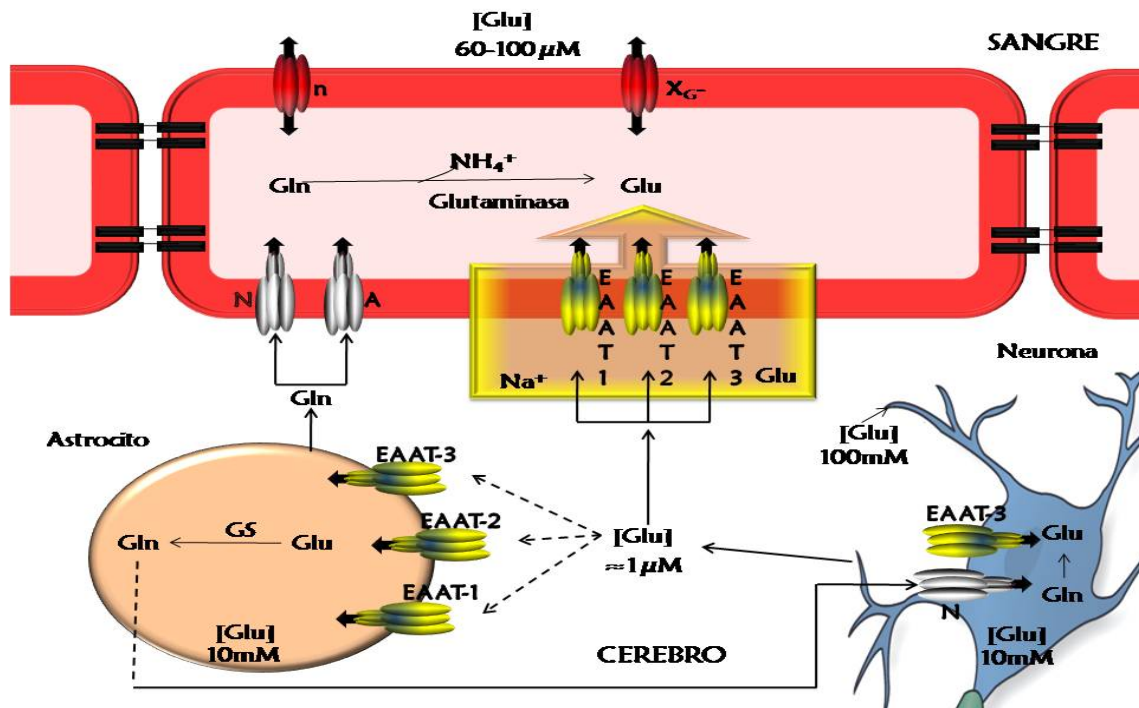
Sin embargo, debido a esta impermeabilidad del SNC deben existir mecanismos que aseguren que el aporte y retirada de nutrientes, desechos y otras moléculas necesarias o sobrantes sea el adecuado. Este intercambio se realiza gracias a la existencia de diversos tipos de transporte en las membranas celulares. De todos estos, los que tienen mayor importancia para el desarrollo de esta tesis doctoral son los transportadores de glutamato.

Existen transportadores de glutamato no solo en las células de la glía y las neuronas, sino también en otros tipos celulares, de forma que participan también en la retirada de glutamato del cerebro. Se ha descrito que en la membrana abluminal de la barrera hematoencefálica hay transportadores dependientes de  $\text{Na}^+$  para el glutamato, correspondiéndose con los transportadores de glutamato EAAT-1, EAAT-2 y EAAT-3. Sin embargo ninguno de estos transportadores se encuentra en la membrana luminal (O'Kane et al., 1999). Previamente, Lee y cols. (1998) observaron que en la membrana luminal existía un tipo de transporte para glutamato, con transportadores no dependientes de  $\text{Na}^+$  y por tanto sin gasto de energía, que transporta el aminoácido a favor de gradiente. Además este tipo de transporte solo se encontraba en este lado de la membrana.

Teniendo todo esto en cuenta, el proceso de transporte de glutamato en las células endoteliales de la BHE se desarrollaría de la siguiente forma (Fig. 1.9):

- Los EAATs presentes en la membrana abluminal mueven el glutamato al interior de la célula endotelial, mediante transportadores dependientes de  $\text{Na}^+$ .
- La concentración intracelular de glutamato aumenta en las células endoteliales hasta alcanzar la concentración de glutamato en sangre, de forma que éste pasa a la sangre a través del transporte no dependiente de energía que se encuentra en la membrana luminal y a favor de gradiente, hasta alcanzar el equilibrio entre el interior de la célula y la sangre. De esta manera, en condiciones fisiológicas hay una salida de glutamato del parénquima cerebral a sangre.

Esta salida de glutamato del cerebro a sangre aumenta ante determinados estímulos o en determinadas patologías cerebrales, como la enfermedad cerebrovascular, donde los niveles de glutamato aumentan considerablemente, este tipo de transporte adquiere importancia.



**Figura. 1.9. Homeostasis de glutamato.** La presencia de transportadores  $\text{Na}^+$ -dependientes capaces de bombear glutamato desde el cerebro a las células endoteliales, y el transporte facilitado de glutamina y glutamato en la membrana luminal proporcionan un mecanismo para la eliminación del exceso de glutamato en la matriz extracelular. EAAT1, 2 y 3 están presentes en las células endoteliales y astrocitos. A, sistema dependiente de  $\text{Na}^+$ ; N, - sistema dependiente de  $\text{Na}^+$  N; EAAT, transportador de glutamato  $\text{Na}^+$ -dependiente,  $\text{X}_{\text{G}^-}$ , transportador de glutamato, n, transportador de glutamina; GS, Glutamina Sintetasa. . Modificado de (Hawkins et al., 2006b)

La disminución de ATP produce la reversión de los transportadores de glutamato, de manera que promueve la salida de glutamato del interior celular. Rao y cols. observaron que, tras una isquemia transitoria, los niveles de EAAT-2, tanto de proteína como de ARNm, disminuían entre las 6 y las 72 horas post-reperusión (Rao et al., 2001a). Estos datos invitan a pensar que la eliminación de estos transportadores antes de la isquemia disminuiría la lesión al evitar el transporte inverso de glutamato. Sin embargo, se ha observado que la inhibición de EAAT-2 antes de la isquemia tiene como resultado un aumento de la lesión, aumentando el volumen del área infartada y el edema (Rao et al., 2001b). Posiblemente, este efecto estaría unido a la eliminación de los transportadores presentes en las células endoteliales, que eliminarían el exceso de glutamato hacia la sangre (para revisión, ver Teichberg et al., 2009). El papel de estos transportadores en la eliminación de glutamato cerebral se ha visto reforzado al comprobar en la clínica que los niveles plasmáticos de glutamato se ven incrementados tras un ictus, de forma que puede ser usado como biomarcador de la lesión (Castellanos et al., 2008). Estos datos sugieren que podemos encontrar un mecanismo de

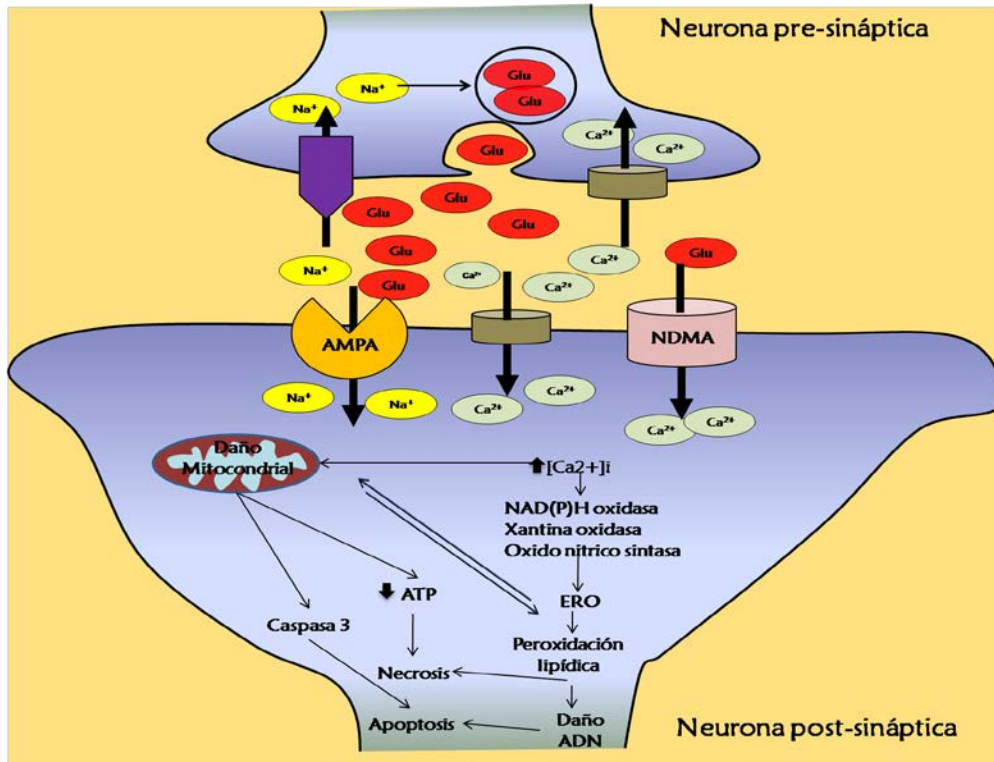
neuroprotección en la regulación de los transportadores de glutamato de las células endoteliales o actuando sobre los niveles de glutamato plasmáticos. Sobre esto ya se han realizado algunos estudios, como veremos más adelante.

### **1.2.2 Excitotoxicidad por glutamato en la isquemia**

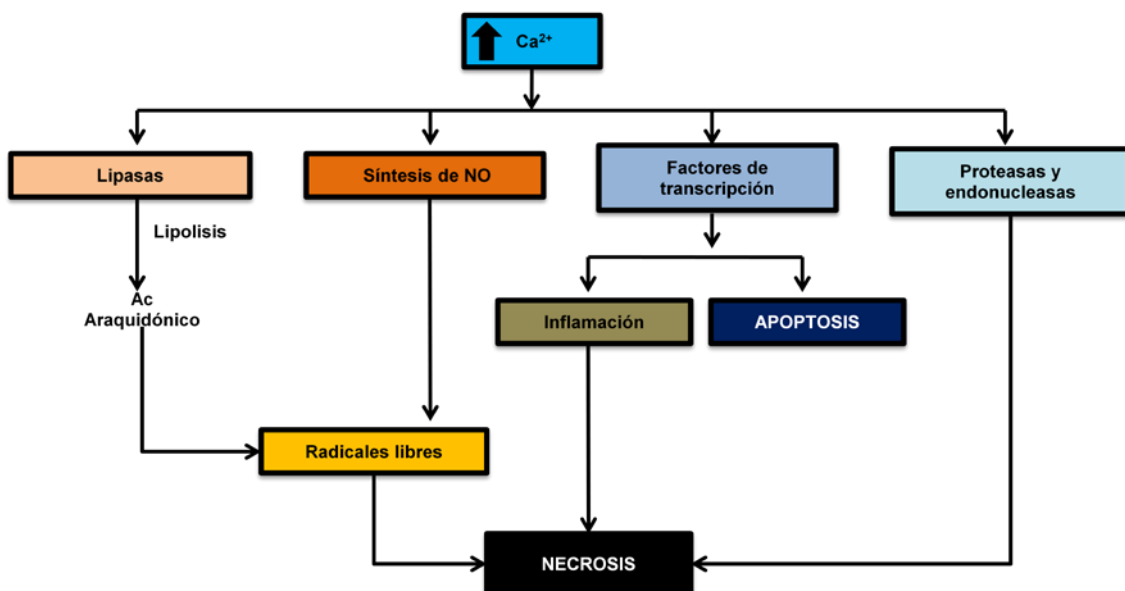
La excitotoxicidad se refiere a la muerte neuronal provocada por la activación sostenida de los receptores de aminoácidos excitadores. Dado que el glutamato es el principal neurotransmisor, la excitotoxicidad suele referirse a la muerte neuronal debida a la sobreexposición de las células a este aminoácido, asociada al flujo de iones que entran en la célula (Olney, 1986) (Fig. 1.10).

La sobreactivación de receptores de glutamato provoca la entrada excesiva  $\text{Ca}^{2+}$  a la célula, que a su vez entra en la mitocondria, provocando un incremento del calcio mitocondrial. La elevada concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  mitocondrial provoca la disfunción metabólica, la producción de radicales libres. El incremento del  $\text{Ca}^{2+}$  celular también lleva a la activación de proteasas, fosfolipasas, óxido nítrico sintasas constitutivas y endonucleasas, y la inhibición de la síntesis de proteínas (para revisión ver en Kristian y Siesjo, 1998) (Fig.1.11).

Se ha demostrado que existen diferencias en la participación de los receptores en la muerte neuronal en función de la localización de estos. La entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de los receptores NMDA extrasinápticos desembocaría en efectos perjudiciales para la neurona terminando en muerte neuronal, mientras que la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de los receptores NMDA sinápticos promovería la supervivencia neuronal. Sin embargo, en el proceso de excitotoxicidad, ante la estimulación simultánea de los receptores NMDA sinápticos y extrasinápticos, la ruta promovida por los receptores NMDA extrasinápticos actúa como ruta dominante, inhibiendo a distintos niveles el factor de transcripción CREB (Hardingham y Bading, 2002, 2010; Papadia et al., 2005, 2008; Hardingham, 2006a, b; Al-Mubarak et al., 2009; Martel et al., 2009; Leveille et al., 2010).



**Fig. 1.10. Mecanismos de excitotoxicidad.** La activación sostenida del receptor NMDA por concentraciones incrementadas de glutamato (Glu) provoca la entrada masiva de calcio a la célula que activa a las enzimas líticas y la óxido nítrico sintasa (NOS). El daño mitocondrial es uno de los factores implicados en el incremento de la generación de especies reactivas de oxígeno, que conducen a la muerte neuronal y a la activación de programas de muerte apoptóticos. El déficit energético contribuye a la perpetuación del proceso degenerativo debido a que favorece la despolarización de la membrana por el déficit en el funcionamiento de la bomba sodio/potasio (Na/K- ATPasa) y mantiene el estado activo del receptor NMDA.



**Fig. 1.11. Representación esquemática de los mecanismos neurotóxicos derivados del aumento de calcio intracelular.**

### **1.2.2.A) Liberación de glutamato en la isquemia**

La excitotoxicidad y la sobrecarga de calcio son los principales factores que contribuyen a las primeras etapas de la muerte celular isquémica. El glutamato se acumula en el espacio extracelular como consecuencia de la depleción energética y el fallo de la bomba de iones, así como por el fallo de los mecanismos de recaptación (para revisión, ver Choi y Rothman, 1990).

En condiciones normales el glutamato liberado en el cerebro no es tóxico para las neuronas debido a su difusión y al transporte junto a  $\text{Na}^+$  de este por los transportadores de glutamato, que disminuyen rápidamente la concentración del neurotransmisor a concentraciones normales en el tejido, de forma que se previene la activación tónica de los receptores NMDA (Bergles y Jahr, 1997; Danbolt, 2001; Attwell y Gibb, 2005).

La despolarización que ocurre durante la isquemia cerebral induce por sí misma liberación de neurotransmisores. De todos los neurotransmisores liberados durante la cascada isquémica, el glutamato es el que juega un papel más importante por su toxicidad sobre las neuronas. El glutamato actúa sobre sus receptores (principalmente del tipo NMDA y AMPA). En condiciones normales los receptores NMDA se encuentran bloqueados por  $\text{Mg}^{2+}$ , por lo que son inactivos. Tras la isquemia, la acción del glutamato sobre los receptores AMPA despolariza la neurona, provocando la eliminación del  $\text{Mg}^{2+}$  de los receptores NMDA y por tanto la acción del glutamato sobre estos receptores, de modo que se abre una nueva vía que permite el paso de iones calcio al interior de la célula (Rothman y Olney, 1986). El exceso de calcio intracelular tiene como consecuencia la activación de diversas enzimas que desembocan en muerte neuronal (Sattler y Tymianski, 2000).

### **1.2.2.B) Mecanismos de excitotoxicidad**

Pocos minutos después de la reducción del flujo sanguíneo, las neuronas y la glía empiezan a sufrir daño debido a excitotoxicidad. La excitotoxicidad también desencadena una serie de acontecimientos que pueden contribuir al daño tisular, como son la despolarización peri-infarto y los mecanismos de inflamación y apoptosis (Fig. 1.12) (para revisión, ver Dirnagl et al., 1999).

La acumulación excesiva en el espacio extracelular de glutamato también produce toxicidad porque afecta al sistema de transporte cisteína-glutamato (Murphy et al., 1990). Este sistema se encarga de transportar glutamato al exterior celular a cambio

de cisteína, la cual constituye una fuente importante para la formación del sistema antioxidante más importante de la célula, el glutatión. Lewerenz y colaboradores han demostrado que un exceso del glutamato extracelular bloquea este sistema de transporte en células HT22, un tipo de línea celular de estirpe neuronal (Lewerenz et al., 2006).

Otro mecanismo que contribuye a la excitotoxicidad por glutamato es el aumento en la liberación de glicina en la isquemia cerebral. La glicina es un co-activador necesario del receptor NMDA y su excesiva liberación durante esta patología origina un aumento de la estimulación del receptor y un mayor daño neuronal (Monaghan et al., 1988; Wallis et al., 1995).



Figura 1.12. Cascada de eventos dañinos en la isquemia cerebral focal.

### 1.2.3 Tratamiento y neuroprotección

Pese al gran impacto del ictus, el único tratamiento aprobado es el activador tisular del plasminógeno (t-PA), un trombolítico para la recanalización de la/s arteria/s ocluida/s. A pesar de contar con esta herramienta farmacológica, tan solo entre un 5-10% de los pacientes pueden beneficiarse de ella, debido a la reducida ventana terapéutica que este tratamiento presenta (Hacke et al., 2008).

La reducida ventana terapéutica, como consecuencia del elevado riesgo de producir transformación hemorrágica, hace necesario el desarrollo de nuevos tratamientos que puedan ser aplicados sin riesgos para los pacientes y con una ventana terapéutica más amplia. A pesar de ello, en la actualidad, ningún agente neuroprotector se ha aprobado, debido a los fracasos en los ensayos clínicos realizados, a pesar de que más de 1000 de estos fármacos parecían prometedores en la investigación en animales (para revisión, ver O'Collins et al., 2006).

Para el desarrollo de estos tratamientos, se tiene muy en cuenta la fisiopatología del ictus y, en concreto, la cascada isquémica, tomando varios de sus puntos como posibles dianas.

Una de las principales dianas terapéuticas elegidas para prevenir la evolución de los eventos que se producen durante la cascada isquémica es el glutamato. Se ha intentado actuar a tres niveles sobre el glutamato: bloquear su acción en los receptores postsinápticos, disminuir su liberación presináptica y/o eliminar el glutamato sanguíneo para así promover la salida de glutamato cerebral a la sangre (Tabla 1.4).

Modo de acción	Tratamientos	Fase	Motivo de parar ensayo
<b>Antagonistas de los receptores NMDA</b>	Selfotel	3	Efectos adversos
	Dizocilpina	2	Falta de eficacia
	Dextrorfano	1	Efectos adversos
	Aptiganel	3	Falta de eficacia
	Eliprodil	3	Falta de eficacia
	Gavestinel	3	Falta de eficacia
	Magnesio	3	Falta de eficacia
<b>Antagonistas de los receptores AMPA</b>	NBQX	Piloto	Efectos adversos
	ZK 200755	Piloto	Efectos adversos
	Zonampanel	2	Falta de eficacia
<b>Bloqueantes de los canales del Na<sup>+</sup></b>	Lubeluzol	3	Efectos adversos
	Fosfenitoína	3	Falta de eficacia
<b>Bloqueantes de los canales del Ca<sup>2+</sup></b>	Flunaricina	2	Falta de eficacia/Efectos adversos
	Nimodipino	3	Falta de eficacia/Efectos adversos
<b>Hiperpolarizantes de las membranas neuronales</b>	BMS-204 352	3	Falta de eficacia
	Clometiazol	3	Falta de eficacia
<b>Reducción del glutamato</b>	Oxalacetato	-	En experimentación
<b>Antioxidantes</b>	Albúmina	3	Falta de eficacia
	NXY-059	3	No se reprodujeron los resultados
	Estatinas	¾	Falta de pacientes/En curso
	Ebselen	3	Falta de eficacia
	Tirilazad	3	Falta de eficacia
<b>Protectores de membranas</b>	Piracetam	3	Falta de eficacia
	Citicolina	3	Falta de eficacia
<b>Antiinflamatorios</b>	Enlimomab	3	Efectos adversos
<b>Antibiótico</b>	Minociclina	4	Falta de eficacia

Tabla 1.4. Fármacos neuroprotectores usados en ensayos clínicos para el ictus

### 1.2.3.A) Bloqueo de receptores de glutamato

Los bloqueantes de los receptores de glutamato, sobre todo los antagonistas de los receptores de NMDA, disminuyen la lesión isquémica y el déficit neurológico en modelos de isquemia cerebral focal (para revisión, ver Moskowitz et al., 2010), pero su utilización clínica ha presentado muchos efectos adversos, por lo que su uso está muy limitado o incluso contraindicado.

#### Antagonistas de los receptores NMDA

Los bloqueantes de los receptores de NMDA son los agentes neuroprotectores más estudiados, ya que tienen una importancia destacada en la evolución de la excitotoxicidad. Se han estudiado numerosos compuestos frente a estos receptores, tanto antagonistas competitivos, como el **selfotel** (Davis et al., 1997), como no competitivos, como el **dizolcipina**, el **dextrorfanol** y el **aptiganel** (para revisión, ver Ginsberg, 1995b, a). Estos compuestos fueron descartados por presentar poca o ninguna eficacia, así como por los efectos adversos que producían.

Se han desarrollado también antagonistas de los receptores de NMDA que interfieren en lugares distintos al glutamato, como son el **eliprodil**, que interfiere en el sitio de poliaminas, o el **gavestinel**, que impiden la unión de la glicina, co-activador necesario para la apertura del canal iónico (Lees et al., 2000; Reggiani et al., 2001; Sacco et al., 2001). En estos ensayos tampoco se encontraron mejoras en la evolución de los pacientes, por lo que también fueron descartados.

Otro fármaco modulador del receptor de NMDA es el **sulfato de magnesio** ( $MgSO_4$ ). El magnesio, a dosis altas, actúa como un vasodilatador endógeno de la circulación cerebral y se comporta farmacológicamente como un antagonista de los receptores NMDA. Su efecto neuroprotector ha quedado demostrado en modelos experimentales. Muir y cols. realizaron un estudio en pacientes con isquemia del territorio de la arteria silviana, administraron sulfato de magnesio hasta las 24 horas y observaron un descenso en la mortalidad y una mejor evolución neurológica, sin efectos colaterales de importancia (Muir et al., 2004). Un ensayo clínico en fase III ha sido recientemente completado sin encontrar diferencias significativas a los 90 días entre pacientes tratados con el placebo y con magnesio (FAST-MAG-<http://www.strokecenter.org>).

### Antagonistas de los receptores AMPA

En el intento por conseguir una terapia neuroprotectora efectiva, se han desarrollado también agentes antagonistas del receptor de AMPA. El primer intento fue el **NBQX** (2,3-dihidroxi-6-nitro-7-sulfamoíl-benzo[f]quinoxalina-2,3-diona), con buenos resultados en animales (Gressens et al., 2005), pero fue abandonado por su baja solubilidad y su precipitación en el riñón. Otro intento con este tipo de antagonistas fue el **ZK 200755**, descartado por producir un empeoramiento neurológico en estudios preliminares (Walters et al., 2005). El **zonampanel** (YM872) demostró neuroprotección en gatos sometidos a isquemia cerebral focal (Takahashi et al., 1998), pero finalmente fue descartado por no producir efectos beneficiosos en humanos (ARTIST+ <http://www.strokecenter.org>).

### 1.2.3.B) Inhibidores de la liberación de glutamato

Los tratamientos que impiden la liberación de glutamato se centran principalmente en bloquear la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Na}^{+}$  al interior de la neurona presináptica, evitando así la despolarización de la membrana y, por tanto, la liberación del neurotransmisor.

#### Bloqueantes de los canales del $\text{Na}^{+}$

Entre los inhibidores de los canales de  $\text{Na}^{+}$  encontramos los ensayos realizados con la **fosfenitoína**, precursor de la fenitoína, que no demostró beneficio (“Fosphenytoin Phase 3” <http://www.strokecenter.org>) y el **lubeluzol**, compuesto benzotiazólico que bloquea los canales de sodio que inhibe la liberación de glutamato en el espacio extracelular y que parecía inhibir también la neurotoxicidad por iNOS (Diener et al., 1996). Los estudios clínicos con lubeluzol han sido controvertidos (Grotta, 1997; Diener, 1998), con un resultado negativo en un estudio final.

#### Bloqueantes de los canales del $\text{Ca}^{2+}$ voltaje-dependientes

Debido a la importancia que el calcio tiene en la patogénesis de la isquemia, la regulación de la entrada de este al interior de las neuronas ha sido una de las estrategias de neuroprotección más ensayadas. El **nimodipino**, un inhibidor de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L administrado por vía oral no demostró eficacia, aunque en el subgrupo de pacientes tratados en las primeras horas existió un beneficio significativo (Mohr et al., 1994). El estudio VENUS (Very Early Nimodipine Use in Stroke) fue interrumpido por

falta de beneficio (Horn et al., 2001). Cuando se ensayó la administración intravenosa del fármaco, se descartó por sus efectos hemodinámicos (Wahlgren et al., 1994).

Otro bloqueante ensayado es la **flunaricina**, que actúa principalmente sobre los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo T. Tampoco demostró eficacia como neuroprotector en el ictus isquémico (Franke et al., 1996).

### Hiperpolarizantes de las membranas neuronales

El **clometiazol** aumenta la actividad del GABA a través de la estimulación de los receptores  $\text{GABA}_A$ . La hiperpolarización neuronal originada por el GABA contrarresta la despolarización celular originada por la isquemia. El fármaco fue efectivo en modelos experimentales, pero un gran estudio en fase III resultó negativo (Wahlgren et al., 1999).

El **BMS-204 352** (MaxiPost™) consigue la hiperpolarización de las neuronas a través de la apertura de los canales del  $\text{K}^+$ , disminuyendo asimismo la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  y la liberación de glutamato. Un estudio en fase III no demostró beneficio alguno (Jensen, 2002).

### 1.2.3.C) Retirada de glutamato periférico

El grupo de Teichberg realizó estudios en traumatismo cerebral, administrando **oxalacetato** en ratas, que producía la transformación de glutamato en  $\alpha$ 2-cetoglutarato, por medio de la enzima glutamato-oxalacetato transaminasa presente en la sangre. De esta manera la concentración de glutamato en sangre disminuía, aumentando así el gradiente de concentración cerebro-sangre, proporcionando neuroprotección en los animales tratados (Zlotnik et al., 2007; 2008; 2009).

En relación con estos estudios, existen datos que relacionan la reducción de glutamato sérico inducida por la administración de oxalacetato y piruvato con neuroprotección en modelos de isquemia cerebral focal (Campos et al., 2011) y global (Marosi et al., 2009; Nagy et al., 2009). Campos y cols. observaron también que existía una correlación entre niveles elevados de GOT sanguíneos con pacientes que tenían buen pronóstico tras un ictus isquémico (Campos et al., 2014). Sin embargo, se han descrito efectos secundarios de la administración de oxalacetato *in vivo*, incluyendo el aumento de la transmisión excitatoria en la corteza (Nagy et al., 2010).

### 1.2.3.D) Otros tratamientos

#### Antioxidantes

El **tirilazad** inhibe la peroxidación de los ácidos grasos de las membranas celulares mediada por radicales libres. No se observó mejoría en pacientes con ictus y fue suspendido por motivos de seguridad (The RANTTAS Investigators, 1996).

El **ebsele**n es un compuesto con actividad antioxidante que inhibe la peroxidación lipídica. Se percibió mejoría solo en los pacientes que recibieron el fármaco durante las primeras 24 horas. Esta mejor evolución se observó durante el primer mes, sin embargo no se observó diferencia a largo plazo (tres meses) respecto a los pacientes tratados con placebo (Yamaguchi et al., 1998) (Ebselen in Acute Ischemic Stroke – <http://www.strokecenter.org>).

Las **estatinas** son una familia de fármacos usados para reducir los niveles de colesterol, aunque se ha visto que tienen otros efectos adicionales, interviniendo por ejemplo en neurogénesis y angiogénesis (Chen et al., 2003). Actualmente se están llevando a cabo numerosos ensayos clínicos con diferentes estatinas en diferentes fases, con resultados prometedores en neuroprotección (Amarenco et al., 2004; Ní Chróinín et al., 2013). Dos ensayos clínicos se esperaban más prometedores, el ensayo EUREKA, que se detuvo por falta de pacientes, y el STARS07, que actualmente se encuentra en fase de reclutamiento de pacientes (EUREKA/ STARS07-<http://www.strokecenter.org>).

El **NXY-059** (Cerovive) actúa como secuestrador de los radicales libres. Demostró ser eficaz para reducir el volumen de la lesión y el déficit neurológico en estudios preclínicos con modelos animales, primates incluidos. Sin embargo, los resultados positivos del primer ensayo clínico, *Stroke-Acute-Ischemic-NXY-Treatment* (SAINT-I), no han podido ser reproducidos por el estudio más amplio SAINT-II, lo que provocó la detención de la investigación sobre la utilidad clínica de Cerovive en el ictus (Diener et al., 2008).

Estudios con **albúmina** en modelos experimentales de isquemia cerebral mostraban que su administración a dosis altas disminuía el volumen del infarto, reducía el edema (Belayev et al., 1997; Belayev et al., 1998) y mejoraba la perfusión cerebral en tejido afectado (Huh et al., 1998). Los estudios clínicos se suspendieron por no producir beneficios en los pacientes (Ginsberg et al., 2013).

### Protectores de las membranas celulares

La **citicolina** es un compuesto que estimula la síntesis de fosfatidilcolina, esencial para el mantenimiento de las membranas celulares. La citicolina reduce el daño en modelos experimentales de isquemia cerebral (2005; Hurtado et al., 2007; 2008; 2013). Los ensayos clínicos no demostraron eficacia para el tratamiento del ictus pero un metaanálisis refería que pacientes con ictus moderado o grave podrían beneficiarse del tratamiento si este se aplicaba dentro de las primeras 24 horas (Davalos et al., 2002; Adams et al., 2007). Finalmente, un estudio clínico multicéntrico aleatorio ha determinado que la citicolina no tiene efecto neuroprotector en pacientes de ictus (Dávalos et al., 2012),

El **piracetam** es otro fármaco que actúa sobre las membranas de las neuronas y de los hematíes, restaurando su fluidez. Un estudio en fase III resultó negativo, pero un análisis posterior evidenció beneficio en un subgrupo de pacientes tratados en las 7 primeras horas desde el inicio de los síntomas (De Deyn et al., 1997). Aunque se ha sugerido un efecto perjudicial del piracetam en pacientes con isquemia (Ricci et al., 2012), actualmente se está realizando un estudio en fase III para comprobar si es efectivo (PASSII- <http://www.strokecenter.org>).

### Antiinflamatorios

El **enlimomab**, un anticuerpo monoclonal contra la ICAM-1 (*Intercellular Adhesion Molecule-1*), que actúa inhibiendo la adhesión leucocitaria y su migración a través del endotelio vascular, logró disminuir el tamaño del infarto en modelos animales de isquemia focal transitoria. Sin embargo, en un estudio en fase III, el enlimomab ha resultado negativo (Enlimomab Acute Stroke Trial, 2001).

### Antibióticos

La **minociclina** es un antibiótico oral, que también posee propiedades antiinflamatorias y antiapoptóticas, que demostraron ser propiedades neuroprotectoras en modelos animales de ictus isquémico (Domercq y Matute, 2004; Machado et al., 2009) y en ensayos clínicos (Srivastava et al., 2012). Sin embargo un reciente ensayo en fase 4 se detuvo por no encontrarse efecto neuroprotector en pacientes (NeuMAST - <http://www.strokecenter.org>).

Son muchos los tratamientos farmacológicos y de otra índole que no se describen en esta introducción, pero la intención de este apartado no es realizar una revisión exhaustiva de todos los tratamientos en detalle, sino realizar una visión general de los

mecanismos que se están estudiando para solucionar o paliar la problemática que presenta la enfermedad neurovascular en el mundo y hacer ver la importancia de trabajar en este sentido.

## 1.3 La diálisis peritoneal

### 1.3.1 Definición e importancia

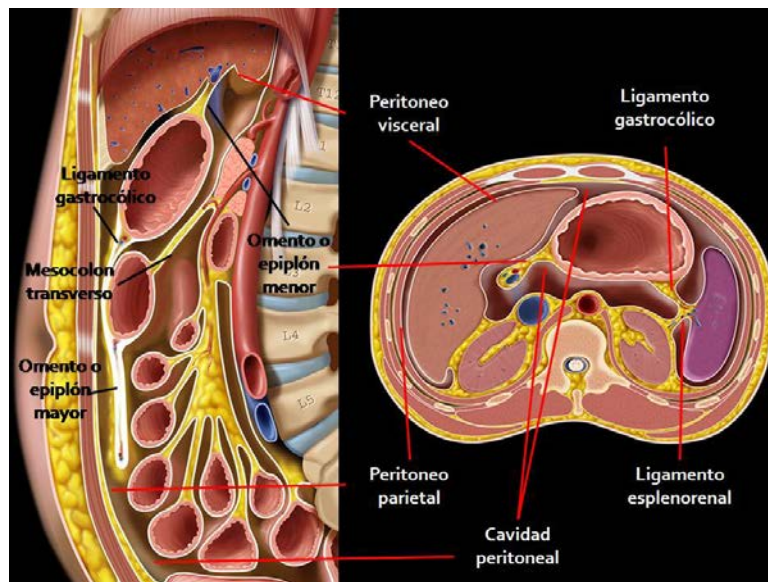
Con el término de **diálisis peritoneal** (DP) englobamos todas aquellas técnicas que utilizan el peritoneo como membrana de diálisis y su capacidad para permitir, tras un periodo de equilibrio, la transferencia de agua y solutos entre la sangre y la solución de diálisis. La estructura anatómico-funcional de la membrana peritoneal, las características de la solución de diálisis y el catéter, constituyen los tres elementos básicos de ésta técnica de diálisis (Macias Heras, 2005; Arrieta et al., 2006). La diálisis peritoneal representa el 16.4% de los tratamientos con diálisis de los pacientes con enfermedad renal crónica en España en 2012 (Registro español de diálisis y trasplante del año 2012, SEN, 2013).

### 1.3.2 Fisiología del peritoneo y la cavidad peritoneal

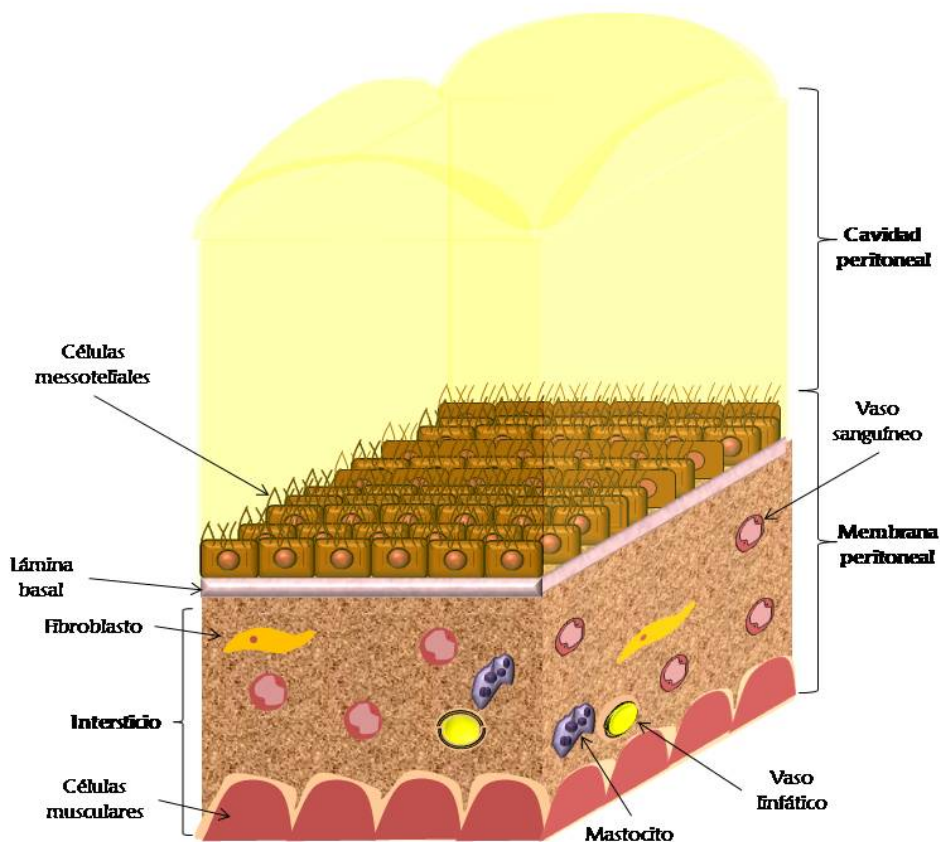
El **peritoneo** o **membrana peritoneal** (Fig.1.13) es una membrana serosa delgada que cubre la cara interna de la pared abdominal (peritoneo parietal) y los órganos que se encuentran en ésta (peritoneo visceral). Ambos tipos de peritoneo están constituidos por una capa de células mesoteliales sobre una delgada membrana basal y una capa de tejido conectivo (el intersticio). La superficie total del peritoneo (parietal más visceral) es algo diferente de unas personas a otras, pero suele oscilar entre 1,72 y 2,08 m<sup>2</sup> (Gotloib, 2009b).

La **cavidad peritoneal** es el espacio que queda entre el peritoneo parietal y el visceral.

Vamos a encontrar cuatro componentes fisiológicos de gran interés para el desarrollo de la diálisis peritoneal (Fig. 1.14): mesotelio, intersticio (tejido conectivo submesotelial), capilares sanguíneos y vasos linfáticos.



**Figura 1.13. Peritoneo y cavidad peritoneal.** La cavidad peritoneal no contiene órganos, pero se encuentra rellena de líquido para facilitar el movimiento de las vísceras (50-100ml), el líquido peritoneal. En los hombres, la cavidad peritoneal está completamente cerrada, pero en las mujeres, se comunica hacia el exterior a través de las trompas de Falopio, el útero y la vagina (Tirkes et al., 2012). Los ligamentos peritoneales (capas dobles o pliegues del peritoneo que soportan una estructura dentro de la cavidad peritoneal), omentos o epiplones (mesenterio con doble capa de peritoneo que se extiende desde el estómago y el bulbo duodenal a los órganos adyacentes) y mesenterios (capa doble de peritoneo que encierra un órgano y la conecta a la pared abdominal) dividen la cavidad peritoneal en compartimentos.



**Figura 1.14. Representación de la membrana peritoneal.**

- El **mesotelio**. Es una monocapa de células mononucleares de aspecto poligonal y con microvellosidades y cilios hacia la cavidad peritoneal. El mesotelio descansa sobre una membrana basal. La función principal del mesotelio es mantener la homeostasis peritoneal. En condiciones fisiológicas, las células mesoteliales segregan numerosos glicosaminoglicanos, proteoglicanos, y fosfolípidos que constituyen un glicocálix que rodea las células y proporciona una barrera protectora contra la abrasión y una superficie no adhesiva resbaladiza para el movimiento visceral. Además las células mesoteliales participan tanto en la inducción como en la resolución de la inflamación peritoneal a través de su capacidad para sintetizar una gran cantidad de citocinas, quimiocinas y factores de crecimiento que se secretan en la cavidad peritoneal. Las células mesoteliales también sintetizan proteínas de la matriz que se depositan en la lámina basal, proporcionando así soporte estructural y el mantenimiento de la arquitectura de la membrana peritoneal. Las células mesoteliales pueden facilitar el transporte de fluidos y solutos a través de la membrana peritoneal, son la primera línea de defensa durante la peritonitis bacteriana, y puede mantener un gradiente quimiotáctico para ayudar en la infiltración de leucocitos (Yung y Chan, 2007), aunque no son determinantes en el transporte de sustancias (Flessner, 2005).
- El **intersticio** es una capa de tejido conjuntivo que se encuentra por debajo del mesotelio. Está compuesto por células y fibras en el seno de una sustancia amorfa donde podemos encontrar también capilares sanguíneos y vasos linfáticos. El tejido conectivo submesotelial tiene una baja población de células rodeadas de material intercelular de elevado peso molecular. En la proximidad de los microvasos sanguíneos se encuentran fibroblastos, célula principal de este tejido, junto con mastocitos, y ocasionalmente se pueden observar monocitos y macrófagos. Entre los capilares y la capa mesotelial se interponen grandes paquetes de fibras de colágeno, junto con glicoproteínas y ácido hialurónico, que juntos forman una matriz gelatinosa. El intersticio tiene un grosor variable, de forma que la distancia entre los capilares sanguíneos y la cavidad peritoneal puede oscilar desde 1 a 30  $\mu\text{m}$ , teniendo su máximo grosor a nivel del peritoneo parietal. El grosor del tejido intersticial es determinante para el paso de solutos y líquido desde o hacia la cavidad peritoneal a los capilares sanguíneos y los vasos linfáticos, siendo más difícil el paso al aumentar el grosor de la capa. Debido a estas características, el intersticio es responsable de entre 20-30% de la resistencia

al paso de solutos (Flessner, 2005; Khanna et al., 2009a; Devuyst y Rippe, 2014).

- Los **capilares** son la principal barrera para el intercambio de sustancias con la cavidad peritoneal. Se encuentran distribuidos en el intersticio y constituyen el compartimiento sanguíneo desde el que se van a intercambiar agua y solutos con la cavidad peritoneal. La pared de los capilares está formada por una capa de células endoteliales rodeada por fuera por una membrana basal (Flessner, 2005; Khanna et al., 2009a; Devuyst y Rippe, 2013). En el interior de los capilares, recubriendo la luz del capilar, se observa el glicocáliz, una red de proteoglicanos y glicosaminoglicanos, que juega un papel importante en la permeabilidad trans-endotelial (Flessner, 2008).
- Los **vasos linfáticos** tienen la función de absorber el exceso de líquido y proteínas, e incluso células, devolviéndolas a la circulación sanguínea. Esta absorción ocurre principalmente en los vasos linfáticos subdiafragmáticos, que comprenden entre el 70 y el 80% del drenaje linfático (Abu-Hijleh et al., 1995; Moriondo et al., 2007). Además de absorber sustancias de la cavidad peritoneal, el sistema linfático interviene en la resolución de situaciones patológicas, como la ascitis, y tiene un papel importante en el sistema inmune en la cavidad y membrana peritoneal, al ser la puerta de entrada de macrófagos y linfocitos (Wang et al., 2010)

### **1.3.3 Fundamento de la técnica de diálisis peritoneal**

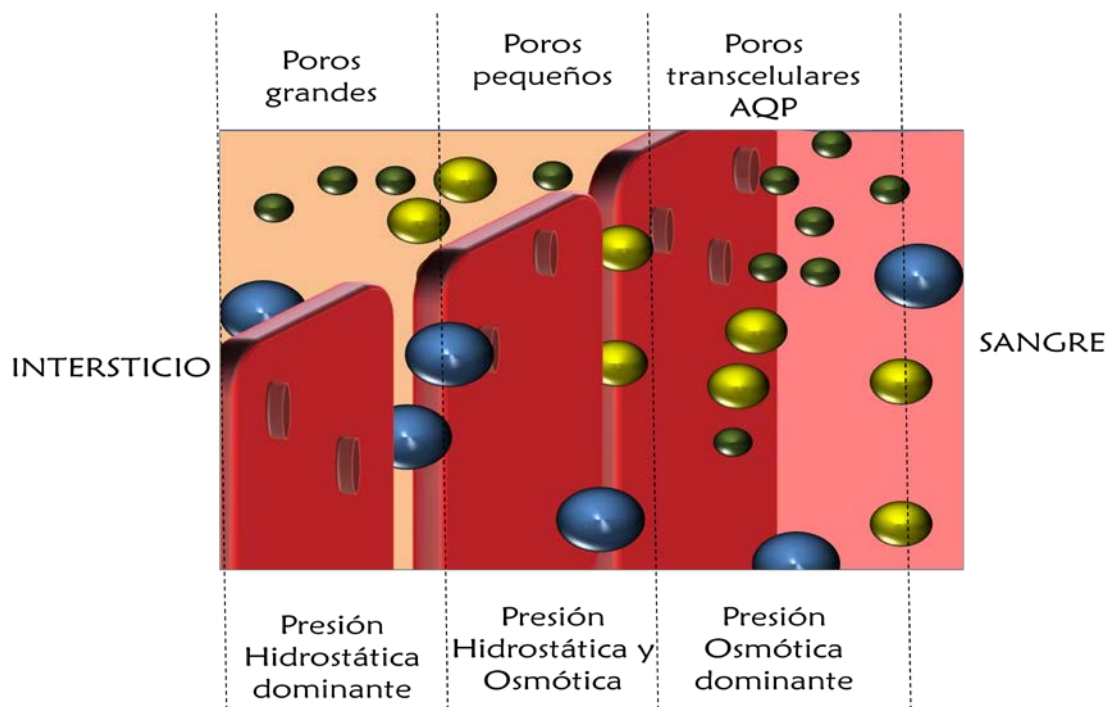
#### **1.3.3.A) Modelos de transporte a través de la membrana peritoneal**

En los años 80, Dedrick y Flessner desarrollaron el **modelo distribuido** para explicar el transporte a través de la membrana peritoneal, que considera que el principal factor para el transporte peritoneal es la distribución de los capilares en el tejido, y debido a ésta distribución, la distancia que el agua y los solutos tendrán que recorrer hasta la cavidad peritoneal tal que, a mayor distancia, más difícil será el transporte por tener que atravesar mayor cantidad de tejido. Este modelo no se ajusta a lo que ocurre en la clínica (Flessner et al., 1984, 1985a; Flessner et al., 1985b).

En 1993 Rippe y cols. desarrollaron la **teoría de los tres poros** (Fig. 1.15) (Rippe, 1993), un modelo teórico basado en simulaciones por ordenador, para explicar el transporte peritoneal de agua y solutos que incluía la existencia de tres tipos de poros de

diferente tamaño en las células endoteliales. Más tarde se les ha asociado estructuras celulares a estos tipos de poros. Los tres poros que se describen son:

- Poros ultra pequeños o ultra poros de 2 a 4 Å de radio. Son poros situados en la membrana celular de la célula endotelial; son, por tanto, transcelulares, y permeables al agua y a sustancias liposolubles. Se ha identificado que estos poros corresponden con canales de agua o acuaporinas-1 (AQP-1). La extracción de agua en la diálisis ocurre principalmente por ósmosis, gracias a la introducción en el líquido dializante de una sustancia que aumenta la presión osmótica a un nivel más alto que en el plasma (para revisión, ver Devuyt y Rippe, 2013).
- Poros de tamaño pequeño, de radio 40–55 Å. Se cree que pueden corresponder funcionalmente a las uniones interendoteliales. A través de ellos pasan agua y pequeñas moléculas que pueden tener un radio de unos 50 Å, como la albumina (Rippe et al., 2004).
- Poros grandes, también intercelulares con 150–250 Å de radio. Explican el paso de macromoléculas que a veces se encuentran en el líquido dializante (Rippe et al., 2004).



**Figura 1.15. Esquema del modelo de membrana de tres poros.** La barrera de células corresponde al endotelio capilar. Las fuerzas que actúan en los distintos poros son: presión hidrostática sobre poros pequeños y grandes; presión coloidosmótica de proteínas sobre poros pequeños; presión osmótica cristaloides sobre acuaporinas. Adaptado de Flessner (2006)

Probablemente el modelo más correcto sea un modelo mixto, uniendo la teoría de los tres poros con el modelo distribuido, a fin de tener en cuenta los mecanismos de transporte de la célula endotelial (los tres poros) pero también la distribución de los tejidos intermedios (principalmente el intersticio) (Gotloib, 2009b).

### Transporte de sustancias a través de la membrana peritoneal

La diálisis peritoneal se basa en dos procesos fisiológicos para el aclaramiento de la sangre, el transporte de solutos y el transporte de fluidos.

Para el estudio del transporte a través de la membrana peritoneal diferenciamos dos tipos de transporte, el transporte de solutos (mediante difusión y convección) y el transporte de agua (por ultrafiltración).

#### Transporte de solutos

El transporte de solutos a través de la membrana peritoneal se realiza fundamentalmente en el peritoneo parietal (Davies, 2000).

La **difusión** es el principal mecanismo de transporte de solutos a través de la membrana peritoneal, como resultado de un gradiente de concentración. En la difusión, el soluto se mueve de las zonas con alta concentración del soluto a las zonas con baja o nula concentración de este. La intensidad del transporte de los solutos por difusión es proporcional a la diferencia de concentración entre los dos lados de la membrana, por lo que será máximo al inicio y disminuye en con el tiempo. La difusión también es directamente proporcional al área de la membrana peritoneal y a la permeabilidad de la membrana peritoneal.

La **convección** o transporte convectivo se refiere al transporte de solutos que se produce junto con el transporte de agua debido a un gradiente de presión. Tiene su principal efecto sobre el movimiento del agua junto con el movimiento de solutos. El aumento de la diferencia de presión transmembrana es responsable del aumento de la movilidad del agua a través de la membrana. Este flujo mayor de agua desde el plasma transporta solutos al mismo tiempo (Leypoldt, 2002; Teixidó Planas et al., 2009).

El transporte de solutos de pequeño tamaño (<1000 Da) se realiza principalmente por difusión desde la sangre que circula en la microcirculación subperitoneal hacia la solución en la cavidad peritoneal. La convección es el segundo mecanismo de transporte de solutos transperitoneal y es particularmente importante para macromoléculas (Flessner, 2005).

Transporte de agua

La **ultrafiltración** (UF) es el transporte de agua a través de la membrana peritoneal mediante un mecanismo de ósmosis. La ultrafiltración a través de la membrana peritoneal es el efecto neto de la presión osmótica que mueve el fluido hacia la cavidad peritoneal y las fuerzas hidrostáticas que lo mueven hacia el intersticio y la reabsorción linfática. Por tanto la UF es dependiente del gradiente de presión hidrostática capilar y del gradiente de presión osmótica del líquido de diálisis (Margetts y Churchill, 2002).

**1.3.4 Tipos de diálisis peritoneal**

Según la Sociedad Española de Nefrología, podemos decir que hay dos grandes tipos de DP en función de los regímenes, técnicas y métodos que usen (Tabla 1.5) (Arrieta et al., 2006):

REGÍMENES	
Intermitente /Continuo	Tratamientos periódicos. Periodos con tratamiento alternados con periodos sin líquido en el abdomen
	Siempre hay líquido en la cavidad peritoneal
Supino/Ambulatorio	DP en posición supina
	Al menos parte del tiempo de la DP se realiza en un ambulatorio
TECNICAS DE DP	
Flujo Continuo	Infusión del líquido de diálisis y drenaje por conductos diferentes
Flujo intermitente	Infusión del líquido de diálisis y drenaje por el mismo conducto. Se diferencian tres periodos: llenado, reposo y vaciado
DP Tidal	Tras un llenado inicial se drena solo parte del líquido que es sustituido por el mismo volumen de líquido nuevo, hasta el final de la sesión que se drena completamente
MÉTODOS DE DP	
Manual	Intercambios manuales con participación de una persona
Manual asistida	Usa dispositivos de asistencia pero los intercambios se realizan con participación de una persona
Automatizada	Los intercambios son realizados por una máquina (cicladora)

**Tabla 1.5.Descripción de los regímenes, técnicas y métodos usados en los diferentes tipos de DP**

**1. Diálisis peritoneal continua ambulatoria (DPCA).** Es una prescripción de DP que combina un régimen continuo, ambulatorio, una técnica de flujo intermitente y un método manual o manual-asistido.

**2. Diálisis peritoneal automatizada (DPA).** Es una prescripción genérica de DP en la que se utiliza una máquina -cicladora- para hacer los recambios peritoneales.

Dentro de estas dos modalidades podremos encontrar diferentes combinaciones de regímenes y técnicas en función de las necesidades del paciente. Nosotros nos vamos a centrar en la diálisis peritoneal ambulatoria, que es el tipo que se ha empleado en esta tesis, en concreto una diálisis peritoneal ambulatoria con flujo intermitente y un método manual asistido.

### **1.3.5 La solución de diálisis peritoneal**

La solución de diálisis peritoneal es una mezcla de agua, agentes osmóticos, tampones, electrolitos y minerales a la que a veces se le añade diferentes sustancias en función de las necesidades del paciente.

Las características ideales de una solución de diálisis son: permitir un aclaramiento de solutos predecible y estable, mínima absorción del agente osmótico, permitir el aporte de nutrientes y electrolitos en caso de necesidad, corregir el equilibrio ácido-base sin interacciones con el resto de componentes de la solución, estar libre de pirógenos, ser estéril y evitar el crecimiento de microorganismos, no tener metales tóxicos y ser inerte para el peritoneo (Arduan, 2009; Khanna et al., 2009b).

En la Tabla 1.6 se expone la composición de las soluciones actualmente disponibles y sus principales diferencias en cuanto su composición.

#### **1.3.5.A) Electrolitos**

Las concentraciones de electrolitos varían muy poco entre las distintas soluciones de DP. No contienen K. La concentración de Na<sup>+</sup> es 132-134 mM, ya que concentraciones de sodio más elevadas limitarían el aclaramiento peritoneal de sodio por difusión. La concentración de Ca<sup>2+</sup> en las soluciones más habituales oscila entre 1,25 y 1,75 mM. La concentración de 1,25 mM puede producir un balance negativo de calcio, especialmente con las soluciones que consiguen una mayor ultrafiltración mientras que la concentración de 1,75 mM favorece un balance positivo de calcio (Hutchison et al., 1993). Las soluciones con 1,25 mM de calcio fueron diseñadas para

poder administrar quelantes del fósforo con calcio, sin riesgo de hipercalcemia. Como estos quelantes aportan bases, la asociación de altas dosis de quelantes con un alto volumen de soluciones de DP con alto tampón puede causar alcalosis metabólica en algunos pacientes (Tattersall et al., 1995). La concentración de  $Mg^{2+}$  suele oscilar entre 0,25 y 0,5 mM, aunque hay soluciones con 0,75 mM. La concentración de 0,75 mM se ha asociado con hipermagnesemia (Sanchez et al., 2004), que puede contribuir a la supresión excesiva de la PTH (Navarro et al., 1999), aunque niveles de 0,25 mM también se han asociado a hipomagnesemia (Ejaz et al., 1995; Tattersall et al., 1995).

En función de las necesidades del paciente, existen diversos tipos de soluciones que permite individualizar el tratamiento.

SOLUCIÓN	AGENTE OSMOTICO	VARIANTES DISPONIBLES		LABORATORIO
BALANCE®	Glucosa (glucosa monohidrato)	%Glucosa 1,5 2,3 y 4,25	[Ca] 1,25mM 1,75 mM	Fresenius Medical Care Deutschland Gmbh
BICANOVA®	Glucosa (glucosa monohidrato)	%Glucosa 1,5 2,3 y 4,25%	[Ca] 1,25mM 1,75 mM	Fresenius Medical Care Deutschland Gmbh
BICAVERA®	Glucosa (glucosa monohidrato)	%Glucosa 1,5 2,3 y 4,25%		Fresenius Medical Care Deutschland Gmbh
CAPD/DCPA®	Glucosa (glucosa monohidrato)	% Glucosa* 1,5 2,27 4,25		Fresenius Medical Care España, S.A.
DIANEAL®	Glucosa (dextrosa anhídrida)	%Glucosa 1,36 2,27 y 3,86		Baxter, S.L.
EXTRANEAL®	Icodextrina	Icodextrina 7,5%		Baxter, S.L.
NUTRINEAL®	Aminoácidos	Aminoácidos 1,1%		Baxter, S.L.
PHYSIONEAL®	Glucosa (dextrosa anhídrida)	%Glucosa 1,36 2,27 y 3,86	B+L** 35 40	Baxter, S.L.
SELUTRIO®	Glucosa (dextrosa anhídrida)	[Ca] 1,70-1,79mM 1,31-1,38mM		Fresenius Medical Care Deutschland Gmbh

**Tabla 1.6. Soluciones comerciales para diálisis peritoneal.** \*Se presenta también en soluciones con 15 g/l de glucosa anhídrida y hasta 0,75g/L de fructosa; 22,73 g/l glucosa anhídrida y hasta 1,1 g/l fructosa y 42,5 g/l glucosa anhídrida y hasta 2,1 g/l fructosa. \*\*B+L bicarbonato +lactato (10 mmol/l de lactato + 25 mmol/l de bicarbonato = 35 mmol/l; 15 mmol/l de lactato + 25 mmol/l de bicarbonato = 40 mmol/l). Extraído de la Agencia Española del Medicamento y Productos Sanitarios

### 1.3.5.B) Agentes osmóticos

La glucosa continúa siendo el agente osmótico más utilizado. Existen soluciones con tres concentraciones diferentes de glucosa (1,36%, 2,27% y 3,86% de dextrosa anhidra) para adaptar la ultrafiltración conseguida a las necesidades del paciente. Las concentraciones más altas de glucosa obtienen mayor ultrafiltración, pero también potencian sus efectos adversos. Existe cierta confusión en la literatura en cuanto a la concentración de glucosa en las distintas soluciones, porque en EE. UU. se expresa como concentración de dextrosa (glucosa monohidrato con un peso molecular de 198 Da) y en Europa, como concentración de glucosa (glucosa anhidra, peso molecular 180 Da). De esta manera unas concentraciones de dextrosa de 1,5%, 2,5% o 4,25% corresponden a una concentración de glucosa de 1,36%, 2,27% y 3,86%, respectivamente; sin embargo, una concentración de glucosa 1,5% corresponde a 1,65% dextrosa.

La glucosa no es el agente osmótico ideal, ya que se absorbe fácilmente, lo que lleva a una ultrafiltración de corta duración y su absorción también puede conducir a varias complicaciones metabólicas a nivel sistémico como la hiperglucemia, el hiperinsulismo, la obesidad y la dislipemia. Además, la glucosa es tóxica *per se*, afectando a la viabilidad y funcionalidad de las células peritoneales, favoreciendo la formación y acumulación de productos de glucosilación avanzada (AGEs) y condicionando la aparición de alteraciones funcionales de la membrana peritoneal (Bajo et al., 2008).

La esterilización por calor de las soluciones facilita la formación de productos de degradación de la glucosa (PDG). Los PDG son moléculas pequeñas generadas a partir de la glucosa, muchas de ellas tóxicas y con mayor capacidad que la glucosa para reaccionar con proteínas, formando AGE. Los AGEs causan disfunción de proteínas y activan el receptor para AGE que transmite señales intracelulares que modifican el comportamiento celular. Varios PDG son tóxicos, pero solo 3,4-dideoxiglucosona (3,4-DGE) ha demostrado ser letal para los leucocitos y células mesoteliales en las concentraciones habitualmente encontradas en las bolsas de DP (Catalan et al., 2005; Justo et al., 2005; Santamaria et al., 2008).

La concentración de PDG depende fundamentalmente del pH de esterilización de la glucosa y, también, de la concentración de glucosa (mayor en las soluciones de 4,25% glucosa) y de la temperatura de almacenamiento (Erixon et al., 2004; 2005, 2006). A menor pH de esterilización de la glucosa, menos PDG. El pH óptimo de

esterilización para disminuir la producción de PDG es 2,0-3,1 (Erixon et al., 2006). No es posible alcanzar este pH tan bajo en bolsas unicamerales, porque no sería viable infundirlas en el peritoneo. Por ello, las bolsas glucosadas convencionales unicamerales tienen un pH aproximado de 5,5 y una alta concentración de PDG.

Existen otros agentes osmóticos que se han desarrollado en los últimos años, como la icodextrina (un polímero de la glucosa) y las soluciones de aminoácidos. Las soluciones de DP con icodextrina al 7,5%, tienen la capacidad de mantener la ultrafiltración (UF) de forma sostenida durante tiempos de permanencia prolongados y su UF es similar a la alcanzada con la glucosa al 3,86% y superior al de glucosa al 2,27%. Este polímero de glucosa, una vez absorbido, es degradado a maltosa y metabolitos derivados. Las concentraciones séricas de estos metabolitos están elevadas en los pacientes durante el uso de icodextrina, aunque tras períodos de seguimiento prolongados no se han visto efectos adversos. La eficacia del tratamiento con icodextrina es superior cuando hay un incremento de la superficie vascular como es el caso de pacientes con fallo severo de UF o durante los episodios de peritonitis y ofrece la ventaja de actuar como un sustituto de las soluciones de glucosa, particularmente útil en el caso de pacientes diabéticos, que requieran permanencias largas.

Por otra parte, las soluciones con aminoácidos están compuestas por una mezcla de aminoácidos esenciales y no esenciales al 1,1% y su poder osmótico es semejante al de la glucosa al 1,36%. En general, sus efectos sobre el estado nutricional son controvertidos, aunque su eficacia parece incrementarse en el caso de pacientes desnutridos (Bajo et al., 2008).

### 1.3.5.C) Tampones y pH

Las soluciones convencionales con glucosa tienen un pH de 5,5. El pH bajo previene la caramelización de la glucosa durante la esterilización por calor y disminuye, aunque no evita, la generación de PDG. Un mayor descenso del pH disminuye más la generación de PDG, pero provocaría dolor a la infusión y quizá otros efectos adversos a más largo plazo. De hecho, el pH de 5,5 produce dolor en algunos pacientes. Este pH es tamponado por bicarbonato que difunde desde la circulación al interior de la cavidad peritoneal, alcanzando un pH de 7 en media hora y por encima de 7,30 en 90-120 minutos (Schmitt et al., 2002).

Se han empleado diferentes tampones. El lactato era el más utilizado (35-40 mmol/l; pH=5,5), se metaboliza a bicarbonato y sus efectos indeseables son escasos

(dolor a la infusión, encefalopatía) pero ha sido sustituido en la mayoría de los pacientes por el bicarbonato, ya que este es el más fisiológico (pH=7,4) siendo el más utilizado (Tranaeus, 2000). Hay también soluciones con mezcla de lactato (15 mmol/l) y bicarbonato (25 mmol/l), o con pequeñas cantidades de bicarbonato (2 mmol/l) y el resto lactato, e incluso alguna con solo bicarbonato (34 mmol/l) que contienen muy bajas concentraciones de productos de degradación de la glucosa (PDG) (Himmele et al., 2012) y con resultado final de pH 7-7,4.

La combinación de 2 bolsas con glucosa/lactato/bicarbonato y dos bolsas sin glucosa (1 de Icodextrina y 1 de aminoácidos) inducen también menor concentración de PDG (le Poole et al., 2012).

En general todas las nuevas soluciones y sus combinaciones muestran buenos resultados clínicos (menos dolor a la infusión, mejor biocompatibilidad, y buen perfil de ultrafiltración y aclaramiento). El menor contenido de PDG, que induce menor formación de productos de glucosilación avanzada (AGE), contribuye al mantenimiento, la integridad y duración de las células mesoteliales peritoneales y a la prevención de la inflamación, neoangiogénesis y fibrosis de la membrana, preservando la ultrafiltración (Theodoridis et al., 2011).

### **1.3.5 Complicaciones de la diálisis peritoneal**

El estudio de las diferentes complicaciones que pueden aparecer en los pacientes sometidos a diálisis peritoneal es fundamental, por un lado para los cuidados que precisa el paciente en caso de presentarse alguna de estas complicaciones y por otro para poder prevenir la aparición de las mismas (para revisión, ver Diaz-Buxo, 2006). En la tabla 1.7 podemos ver la frecuencia en la que aparecen estas complicaciones. Las diferentes complicaciones se pueden clasificar en dos grandes grupos, según el momento de aparición: complicaciones precoces y complicaciones tardías.

#### **1.3.5.A) Complicaciones precoces o tempranas**

Las complicaciones precoces son las que surgen derivadas del proceso de implantación del catéter o durante el período de tiempo requerido para la curación adecuada. Las complicaciones relacionadas con el catéter a menudo son el resultado de errores cometidos durante la inserción de éste y se ven agravados por alguna/s patología del paciente y por el aumento de la presión hidrostática generada por contenidos intraabdominales. La evaluación cuidadosa del paciente, la atención a la técnica de

implantación y el cuidado riguroso durante el período intra y postoperatorio puede prevenir muchas de estas complicaciones. Las complicaciones más frecuentes son:

- **Dolor.** El más común es por lo general el dolor asociado con la manipulación del catéter durante el procedimiento. El dolor asociado con la infusión de la solución puede ser debido a la hipersensibilidad al bajo pH de las soluciones, a la colocación del catéter en un compartimiento funcional (por ejemplo, limitado por adherencias) o a la posición de la punta del catéter contra la pared de la pelvis, la vejiga o recto. La infusión de aire en el momento de la inserción del catéter o durante las conexiones también puede causar dolor transitorio. Este último puede ser confirmada por la desaparición del dolor después de mover la punta del catéter a otra ubicación o reemplazar el catéter con uno más corto.
- **Sangrado.** El sangrado puede ser el resultado de la laceración de los vasos de la pared abdominal anterior (es decir, la arteria epigástrica inferior) o con menor frecuencia, la punción de los vasos intraabdominales (mesentérica, vena cava inferior, la aorta, ilíacas). El sangrado arterial por la inserción de la aguja en un vaso sanguíneo es generalmente fácil de reconocer y la mayoría del las veces se puede controlar por la simple eliminación del instrumento que lo causa. La laceración de los vasos requerirá una intervención inmediata y la ligadura de los vasos afectados. La hemorragia venosa puede ser más difícil de identificar y controlar ya que las venas no tienen una capa muscular.
- **Perforaciones.** La perforación de un órgano interno durante la implantación del catéter se debe considerar siempre si se observa dolor, peritonitis o sangrado. El íleo paralítico o la obstrucción, la enfermedad renal poliquística y las hernias internas son factores que predisponen a una posible perforación. El diagnóstico de un órgano perforado es a menudo evidente inmediatamente después de que se haya perforado, pero desafortunadamente puede permanecer en silencio durante algún tiempo, dando lugar a otras complicaciones. Los signos más evidentes de perforación son: el retorno del contenido intestinal u orina a través del catéter, un silbido de liberación de gas, el olor fétido de la materia fecal, urgencia inmediata de orinar o liberación vaginal de líquido peritoneal. Por tanto, la implantación laparoscópica o quirúrgica del catéter reduce la incidencia de perforación y proporciona un diagnóstico rápido en caso de producirse. La perforación del intestino delgado o de la vejiga después de la inserción ciega del catéter puede permanecer silente durante algún tiempo después del

procedimiento, incluso puede ocurrir que el catéter funcione correctamente al principio, por lo que pueden ser difíciles de diagnosticar.

- **Fugas.** Las fugas pericatóter (a través del orificio de inserción del catéter) pueden no ser evidentes inmediatamente en el período post-inserción, a menos que se realice un intercambio completo (2L en pacientes adultos). Personas desnutridas y pacientes inmunodeprimidos, diabéticos y/o personas con paredes abdominales anteriores muy débiles son más propensos a desarrollar fugas de líquido. Las fugas del catéter pueden prevenirse con un fijado firme del catéter en la zona de inserción de la cavidad peritoneal y evitando el uso de volúmenes de infusión completos, en particular cuando la diálisis se realice sentado o de pie, hasta que la inserción del catéter esté totalmente cicatrizada. Muchos médicos recomiendan un período de descanso de varias semanas después de la inserción del catéter cuando sea posible para asegurar la curación óptima. Las fugas de fluidos subcutáneos también pueden migrar y causar edema de la pared abdominal o edema genital. Una fuga alrededor del manguito interno puede disecar la pared anterior del abdomen, causando una acumulación de líquido alrededor del sitio de la incisión del catéter que se asemeja a una hernia.
- **Obstrucción del catéter.** El tipo más común de obstrucción ocurre cuando se utiliza una única vía para la entrada y salida de líquido y es causada por la proximidad de la porción distal del catéter al epiplón o el intestino, permitiendo la infusión de la solución, pero la salida ocurre lentamente o no es posible. La migración del catéter también puede causar una mala salida del dializado. La migración se asocia con una mala orientación del túnel del catéter en los cuadrantes abdominales superiores (Diaz-Buxo et al., 1997; Hwang et al., 1998). Aunque la manipulación del catéter a menudo es suficiente para su recolocación, la recurrencia de la migración es común y requiere la sustitución de éste. Otra forma de obstrucción del catéter puede deberse a su envoltura por el omento (mesenterio con doble capa), lo que puede ocurrir en cualquier momento después de la inserción del catéter. El tratamiento con enemas y el cambio de posición pueden remediar este problema. Si la obstrucción es persistente puede requerir la recolocación del catéter o la sustitución en casos extremos (Crabtree y Fishman, 1996). La obstrucción total durante la inserción es por lo general debida a un retorcimiento del catéter. El problema puede ser resuelto con la manipulación utilizando una sonda flexible o, si es persistente, por reposicionamiento peritoneoscópico o quirúrgico.

- **Infecciones.** Las complicaciones infecciosas son el tipo de complicación más frecuente en la DP. La infección puede ocurrir en el catéter, bien infección del sitio de salida o del túnel, o en el peritoneo, ocasionando una peritonitis, generalmente bacteriana. La infección del sitio de salida por lo general se diagnostica clínicamente al observar eritema, sensibilidad, y secreción purulenta alrededor de la salida. Las infecciones del túnel se desarrollan a lo largo del catéter subcutáneo y pueden manifestarse con eritema y sensibilidad a lo largo del recorrido del catéter, pero también puede ser clínicamente indetectable. Las infecciones del catéter suelen responder bien al tratamiento con antibióticos, aunque en ocasiones es necesaria la retirada del catéter u otro tratamiento. La peritonitis se desarrolla con dolor abdominal y fiebre, pero no suele ser necesario interrumpir la DP (para revisión, ver Stuart et al., 2009; Akoh, 2012).
- **Hernias.** Las hernias pueden aparecer después de la implantación del catéter debido al aumento de la presión intraabdominal. Los factores que predisponen a la aparición de hernias incluyen la desnutrición, inmunosupresión, la multiparidad (partos previos) y la debilidad de la pared abdominal anterior (Van Dijk et al., 2005). Las hernias incisionales son más comunes cuando la incisión se realiza a través de la línea alba y menos frecuente con inserciones paramedianas a través del músculo recto.
- **Hidrotórax.** El hidrotórax se produce normalmente en una fase temprana en el curso de la terapia, ya que es con frecuencia debida a defectos congénitos de las fibras musculares del diafragma. Los defectos diafragmáticos son posiblemente más frecuentes, pero no se reconocen hasta que el líquido está presente en la cavidad peritoneal y la presión intraperitoneal aumenta. Afecta con mayor frecuencia a mujeres y predomina en el lado derecho. Las primeras manifestaciones de hidrotórax son la disnea o una ultrafiltración inadecuada.
- **Edema genital.** Las causas más comunes de edema genital son la extravasación de fluido en el espacio preperitoneal y un proceso vaginal patente. La complicación se presenta normalmente poco después de la inserción del catéter. El diagnóstico se confirma fácilmente y la corrección quirúrgica suele ser eficaz, permitiendo la continuación de la DP en la mayoría de los casos.

### 1.3.5.B) Complicaciones tardías

Cuando el paciente está incluido en programa de diálisis peritoneal crónica, con el paso del tiempo pueden aparecer una gran variedad de complicaciones, que pueden limitar al paciente para continuar con este tipo de diálisis. Por tanto, y en relación con la definición que hemos dado a las complicaciones precoces, consideraremos complicaciones tardías a aquellas que se manifiesten a partir de los 30 días desde la implantación del catéter.

Debido a que esta tesis se basa en un tratamiento agudo con DP, sin que el tratamiento se prolongue en el tiempo, solo revisaremos brevemente este tipo de complicaciones. Las complicaciones más frecuentes son:

- **Dolor durante la infusión.** El dolor que se presenta más tarde en el curso de la DP sugiere el desarrollo de irritación debido a causas químicas o físicas. El dolor localizado durante la infusión a menudo denota la irritación en la zona de la punta del catéter que descansa contra la pared pélvica o los órganos intraabdominales, o por el flujo creado por infusión rápida de solución. La compartimentación por la formación de adherencias alrededor del catéter restringe el flujo a un pequeño compartimiento, causando dolor y reduciendo el intercambio de sustancias y la ultrafiltración (Diaz-Buxo, 1997).
- **Hemoperitoneo.** El hemoperitoneo es una complicación tardía común en la DP crónica (3-4%), pero rara vez se relaciona con el catéter *per se*. Se observa un sangrado después de mover el catéter con el resultado de una hemorragia interna de la pared abdominal anterior y de pequeños vasos.
- **Perforación.** Las perforaciones en el intestino, la vejiga, el bazo, la vesícula biliar y la pared pélvica por necrosis debido a la presión se han observado ocasionalmente. Muchas de estas perforaciones son asintomáticas y sólo se reconocen cuando el fluido drena en la vejiga o la vagina, el dializado se decolora con un tinte verdoso, o el catéter hace una aparición a través del ano. La causa más probable de predisposición es una mala posición de la punta del catéter o un catéter demasiado largo.
- **Fugas.** Las fugas pericatóter tardías ocurren por las mismas razones que las fugas tempranas y de las infecciones del sitio de salida o túnel persistentes. Además, las fugas por el deterioro o daño accidental al catéter pueden ser una causa adicional en periodos de tiempo más prolongados.

- **Obstrucción.** Las causas, los mecanismos y el tratamiento de la obstrucción del catéter descrito para las complicaciones tempranas o tardías son muy similares.
- **Infección.** Además de todas las complicaciones infecciosas que hemos visto en las complicaciones tempranas, de forma tardía la peritonitis puede ocasionar problemas en otros órganos y la erosión del catéter.
- **Hernias y edema genital.** El tiempo medio para el desarrollo de hernias es de 1 año después del inicio de la DP, con cada vez mayor riesgo en los pacientes en DPCA. Por lo tanto, la mayoría de las hernias se producen como complicaciones tardías.

Además de estas complicaciones relacionadas principalmente con el catéter, pueden ocurrir otra serie de complicaciones metabólicas como hiperglucemia, hipertrigliceridemia, hiperleptinemia o hiperinsulinemia (para revisión ver en McCormick y Bargman, 2007).

<b>Complicaciones tempranas</b> <b>37,2%</b>	Infección del túnel	9,3%
	Peritonitis	4,7%
	Obstrucción o migración del catéter	11,6%
	Fuga de dializado	11,6%
	Perforaciones	0%
<b>Complicaciones tardías</b> <b>53,5%</b>	Infección del túnel	11,6%
	Peritonitis	13,9%
	Obstrucción o migración del catéter	16,3%
	Hernias	11,6%

**Tabla 1.7 Frecuencia de las principales complicaciones que pueden aparecer en la diálisis peritoneal. Basado en Al-Hwiesh (2014)**

*HIPÓTESIS Y*  
*OBJETIVOS*



## 2.- HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

### 2.1 JUSTIFICACIONES, ANTECEDENTES E HIPÓTESIS

Tanto el ictus isquémico como el ictus hemorrágico están asociados a un deterioro del estado energético del tejido cerebral como consecuencia de la restricción del flujo sanguíneo y del aporte de oxígeno y glucosa. Se ha demostrado que esta depleción energética conlleva una disminución de la capacidad de las células cerebrales para captar glutamato, que consecuentemente contribuye a su acumulación en el medio extracelular del parénquima cerebral. Este exceso de glutamato provoca una respuesta excitotóxica y la muerte de las neuronas.

En los pacientes que sufren un ictus hay un aumento de los niveles de glutamato plasmático en sangre y en líquido cefalorraquídeo (LCR) que se ha correlacionado con una mayor gravedad en el déficit neurológico, y que podría ser resultado de un aumento de muerte celular por la acción excitotóxica del glutamato.

El glutamato es el efector de la muerte neuronal en la fase inicial de la isquemia, así como un elemento de disrupción temprana de la barrera hematoencefálica. Este daño debido al glutamato se produciría en las primeras horas post-ictus en los modelos animales, pudiendo extenderse varias horas más cuando se trata de humanos. Por ello, cualquier intervención sobre los niveles de glutamato para prevenir el daño excitotóxico debe realizarse tan pronto como sea posible, para prevenir el efecto multiplicador de la cascada excitotóxica, de ahí la importancia de desarrollar métodos sencillos y rápidos capaces de disminuir la concentración del aminoácido en el parénquima cerebral.

Por tanto, teniendo en cuenta todos estos antecedentes, nos planteamos la siguiente hipótesis:

**“La disminución de la concentración de glutamato en sangre mediante una diálisis peritoneal debe acelerar la salida de glutamato del parénquima cerebral y por tanto reducir el daño celular asociado a concentraciones elevadas de este aminoácido tras un proceso isquémico”**

## 2.2 OBJETIVOS

1. Conseguir un modelo de diálisis peritoneal en roedor que disminuya la concentración de glutamato plasmático tras isquemia cerebral.
2. Comprobar los efectos de la disminución de los niveles plasmáticos de glutamato en el volumen del infarto.
3. Determinar el pronóstico funcional que el tratamiento con diálisis peritoneal pueda tener en los animales tras una isquemia cerebral focal.
4. Determinar la ventana temporal efectiva para la diálisis peritoneal como modelo de tratamiento neuroprotector tras isquemia focal en roedor.
5. Determinar el comportamiento de diferentes soluciones para diálisis en la eliminación de glutamato plasmático.
6. Estudiar la eficacia de la diálisis peritoneal para reducir el glutamato plasmático elevado en animales sanos.
7. Comprobar si la diálisis peritoneal en humanos es capaz de disminuir el glutámico plasmático.

*MATERIAL Y*  
*MÉTODOS*



### 3.- MATERIAL Y MÉTODOS

#### 3.1 Animales de experimentación.

Para los experimentos de esta tesis doctoral se usaron ratas Sprague Dawley (Harlan Laboratories Inc., IN) con un peso comprendido entre 250 y 300 gramos. Los animales se estabularon en condiciones controladas, con un ciclo de luz oscuridad 12/12h y con libre acceso a comida y agua.

Todos los protocolos experimentales se rigieron bajo las guías de experimentación animal del comité de la Universidad Complutense de Madrid (directivas de la UE 86/609/CEE y 2003/65/CE).

#### 3.2. Modelos experimentales. Procesos quirúrgicos.

Para realizar estos experimentos utilizamos el modelo descrito por Chen y Liu (Chen et al., 1986; Liu et al., 1989) y el modelo utilizado por De Cristobal (De Cristóbal et al., 2001) y Hurtado (Hurtado et al., 2003) en nuestro laboratorio. Se trata de dos modelos de isquemia experimental focal en rata por oclusión de la arteria cerebral media (ACM) que se diferencian en el modo de oclusión según sea por ligadura o por electrocoagulación, de forma que se producen infartos diferentes que nos ayudaron en el estudio.

##### 3.2.1 Anestesia y control de los animales

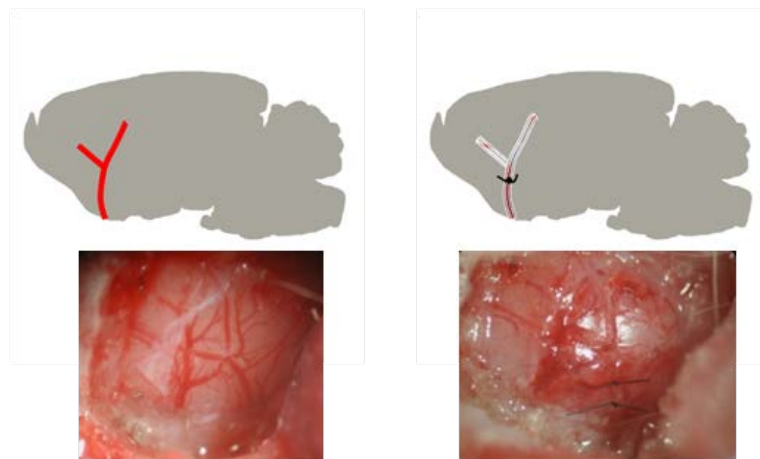
Los animales fueron anestesiados con una mezcla de aire y oxígeno 80/20 y una inducción inicial de isofluorano al 5%. Esta proporción de anestésico se bajaba al 2% en los momentos en los que los animales estaban siendo manipulados y se mantenía entre el 1-1,5% cuando los animales se encontraban en reposo. La temperatura de los animales fue controlada mediante una sonda rectal y un sistema control de temperatura (Temperature control unit HB101/2. Panlab, Harvard Apparatus), manteniéndose la temperatura a  $37,0 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ .

##### 3.2.2 Modelo de isquemia cerebral focal en rata por ligadura.

Una vez anestesiados, los animales se colocaron en posición decúbito supino y se le realizó una incisión por encima del esternón, en la línea media cervical, dejando a la vista los músculos del cuello. Con ayuda de unas pinzas curvas separamos los músculos

hasta exponer la carótida y la disecamos con cuidado, primero la carótida derecha y después la izquierda. La disección de los vasos nos sirvió como preparatorio para la posterior oclusión.

Para la oclusión de la arteria cerebral media (ACM) colocamos al animal sobre el lado izquierdo. Tras cortar y rasurar el pelo entre la oreja y el ojo, hicimos un corte en esta zona, hasta ver el músculo temporal. Realizamos un corte en la cresta sagital y separamos el musculo del hueso con dos cortes más, perpendiculares al primero. De esta forma dejamos a la vista el hueso temporal. Con ayuda de un microtorno (Drill Freedom H00, Stoelting, Wood Dale, IL, U.S.A.) con una fresa de 1.4 mm de diámetro realizamos una craneotomía en el hueso temporal de forma que al retirar el hueso exponíamos la ACM y retiramos las meninges con unas pinzas Dumont 5 de microcirugía (Dumont #5 Forceps - Dumoxel Biologie. Fine Science Tools). Para la oclusión de la ACM usamos un hilo de nylon 9/0 para uso oftalmológico (Lorca Marín S.A.), el cual pasamos por debajo de su tronco, justo antes de su bifurcación en las ramas frontal y parietal, e hicimos un nudo con la ayuda de dos pinzas Dumont 5 hasta comprobar que la circulación en ese vaso se había detenido (Fig. 3.1).



**Figura 3.1. Fotografía de la arteria cerebral media antes y después de la oclusión mediante ligadura.**

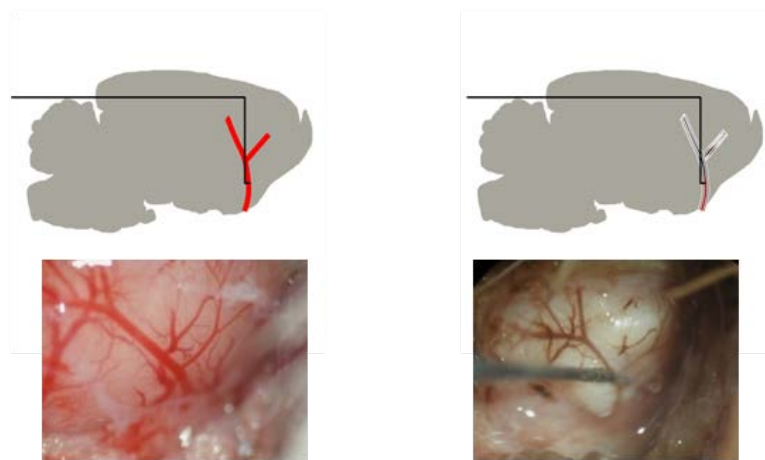
Para estandarizar el volumen de infarto, colocamos al animal nuevamente decúbito supino y cortamos el flujo en las dos arterias carótidas comunes con hilo de nylon 6/0 (Lorca Marín S.A.), mediante un nudo en la arteria carótida ipsilateral (izquierda) y mediante un lazo en la arteria carótida contralateral (derecha), el cual deshacíamos pasados 90 minutos desde su oclusión, para restaurar el flujo de este lado. La ACM y la arteria carótida ipsilateral, se mantenían ocluidos de forma permanente.

Como animales SHAM, se utilizaron animales en los que se aislaron ambas carótidas y se expuso la ACM pero sin oclusión de ninguno de los vasos.

### **3.2.3 Modelo de isquemia cerebral focal en rata por electrocoagulación.**

En este caso la cirugía consistía en la oclusión permanente de la arteria carótida común izquierda y la oclusión de la ACM izquierda por el método de electrocoagulación (Hurtado et al., 2003). Tras anestésiar a los animales se expuso la arteria carótida común izquierda, y tras la disección de la misma, se realizó su oclusión con un hilo de nylon 3/0. El proceso hasta exponer la ACM se hizo de forma similar a la descrita en la cirugía anterior.

Una vez expuesta la ACM, con ayuda de un microgancho (World Precision Instruments Inc.) y un micromanipulador (Narishinge, Japan) se elevaba levemente la arteria hasta ver que se bloqueaba el flujo de sangre. Hecho esto se humedecía la zona de la arteria con solución salina estéril al 0,9% y con un electrocoagulador (Geiger Model-100, Stoelting) se daban pulsos eléctricos en la zona hasta comprobar que el flujo de la arteria se interrumpía de forma permanente (Fig. 3.2).



**Figura 3.2. Fotografía de la arteria cerebral media antes y después de la oclusión mediante electrocoagulación.**

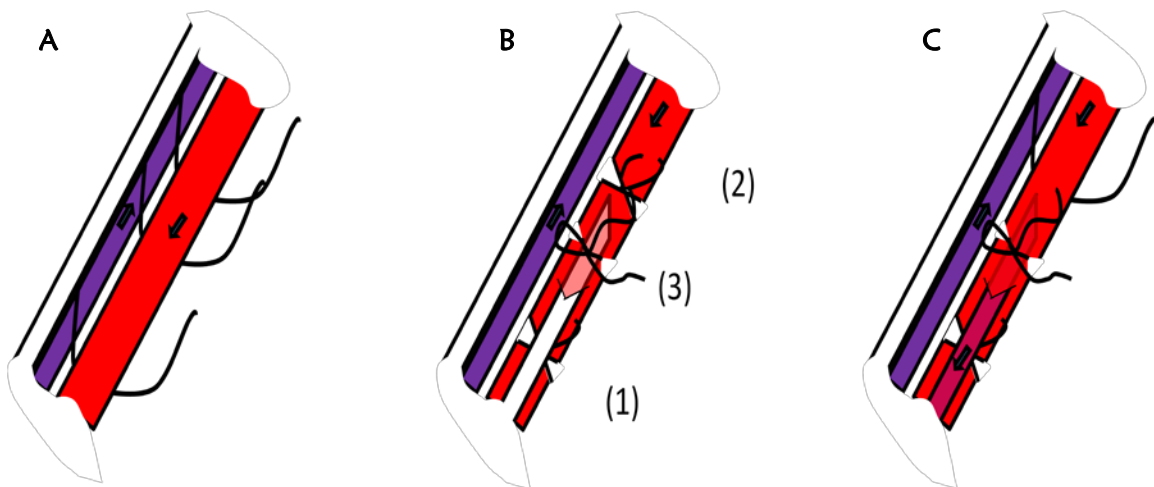
### **3.2.4. Extracción de muestras de plasma**

Las extracciones de sangre para la obtención de plasma se realizaron con el animal anestesiado en todos los grupos experimentales.

La sangre se obtuvo de la arteria femoral izquierda, mediante la inserción de un catéter de plástico de 25xg de diámetro unido a un tubo de silicona. Para colocar el catéter en la arteria femoral, tras rasurar el pelo del animal, se realizó un corte en la región inguinal en sentido transversal al pliegue en la cara interna del muslo izquierdo,

hasta visualizar los músculos. Utilizando unas pinzas se retiraron los músculos hasta ver el paquete vasculo-nervioso. La arteria femoral se disecó con cuidado de no dañar el nervio ni la vena femoral. Se pasaron por debajo de la arteria tres hilos de nylon 6/0 (Fig.3.3 A). Se cortó el flujo de sangre en la parte más distal al corazón de la arteria de forma permanente. Seguidamente se realizó un lazo con la sutura más cercana al corazón, permitiendo que este se pudiera deshacer y rehacer con facilidad. En la zona delimitada por los dos hilos se hizo un corte con unas tijeras oftalmológicas, donde se insertó un tubo de polietileno unido a un tubo de silicona, tratado con citrato sódico al 3.15% para evitar la coagulación y una jeringa con solución salina estéril al 0,9%. El tubo se fijó al vaso con ayuda de un lazo hecho con el hilo restante (Fig. 3.3 B).

La extracción de sangre se conseguía al deshacer el nudo más proximal al corazón y cambiar la jeringa con solución salina por una tratada con citrato sódico al 3,15%, con la que se recogía la muestra de sangre lentamente (Fig. 3.3 C). Se extrajeron 100  $\mu$ l de sangre en cada muestreo, que eran repuestos con solución salina estéril al 0,9%. Tras la extracción de sangre el lazo se volvía a hacer, cortando nuevamente el flujo.

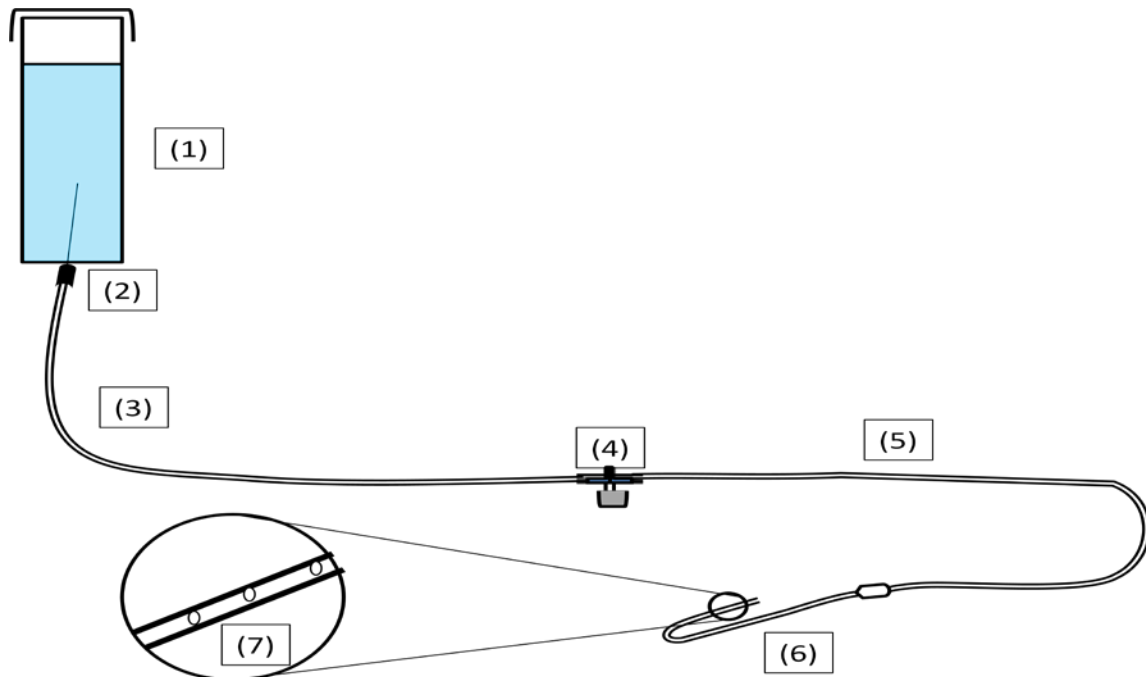


**Figura 3.3. Representación del proceso de canulación de la arteria femoral, de donde se tomaron las muestras de sangre necesarias para el análisis de plasma. A. Arteria femoral disecada con los tres hilos de nylon preparados. B. Cánula insertada en la arteria. Los números indican el orden en que se anuda: (1) corta el flujo sanguíneo de forma permanente; (2) corta el flujo antes del corte para introducir la cánula; (3): asegura la cánula para evitar que se salga. C. Flujo sanguíneo liberado para la obtención de muestra.**

La sangre se centrifugaba durante 5 minutos a 4°C a 16.640xg para separar el plasma del resto de componentes de la sangre, el cual era recogido y almacenado en congelador a -80°C para su posterior análisis.

### 3.2.5. Modelo de diálisis peritoneal

Usamos un catéter de silicona perforado y modificado (ID 0,25 mm x OD 0,47 mm, Access Technologies, USA) unido a un sistema que, mediante una aguja hipodérmica de 21xg se introducida en el contenedor del líquido. Este contenedor se colocó a una altura de 50 cm aproximadamente y se abrió la tapa para facilitar la salida del líquido de diálisis por gravedad hasta purgar el sistema por completo. El sistema constaba de una llave de tres vías para controlar el paso de líquido de diálisis (Fig. 3.4).

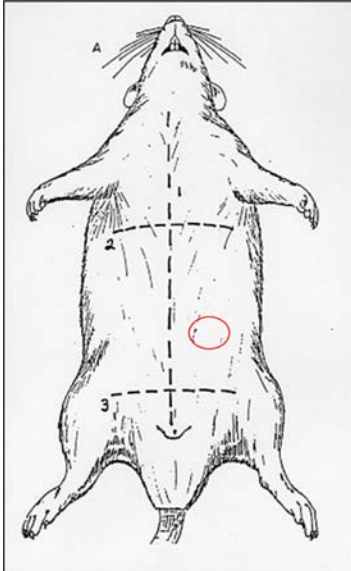


**Figura 3.4. Esquema del circuito de diálisis peritoneal.** (1) Contenedor del líquido de diálisis; (2) aguja; (3 y 5) tubo de goma que conecta el sistema; (4) llave que controla la apertura y drenado del sistema; (6) catéter de silicona perforado; (7) vista aumentada del extremo del catéter.

Una hora antes de iniciar el llenado del peritoneo se colocaba el catéter en la cavidad peritoneal. Para ello los animales se colocaron en posición decúbito supino. Se realizó un corte en la piel tomando como referencias la línea media del abdomen del animal y la pata trasera izquierda, y nos desplazamos ligeramente desde la línea alba en dirección a la extremidad (Fig. 3.5). Una vez expuesto el músculo abdominal, con ayuda de una aguja de 16 G (Surflo, Terumo, Bélgica) realizamos una punción con cuidado de no dañar ningún órgano. Para hacer el orificio un poco más grande y facilitar la entrada del catéter nos valimos de unas pinzas con punta roma.

Se introdujeron 10 ml de solución para diálisis al animal con un flujo aproximado de 1-2ml/min, de forma que el tiempo de llenado oscilaba entre 5 y 10 minutos. El llenado del peritoneo con la solución de diálisis era seguido de un periodo de reposo de 20 minutos para permitir el intercambio de glutamato entre la membrana peritoneal y

el líquido de diálisis. Pasado este tiempo, el sistema era desconectado de la llave de paso, quedando un extremo libre y el otro en el interior del animal, para proceder al drenaje o vaciado de la cavidad peritoneal. Para ayudar al drenaje, el extremo libre se colocaba a menor altura que el animal y se realizaba un leve masaje en el abdomen.



**Figura 3.5. Localización de la región abdominal en la que se inserta el catéter de silicona para la diálisis peritoneal.**

Introducimos el catéter de silicona en la cavidad peritoneal y para evitar fugas de líquido y la salida del catéter, éste se fijó con un hilo de nylon 6/0 (Lorca Marín S.A.).

Tras el vaciado del dializado del peritoneo, se procedía a un nuevo ciclo (llenado-reposo-vaciado) con medio nuevo.

### **Soluciones de diálisis utilizadas**

Hemos desarrollado un líquido de diálisis estéril, isotónico, tamponado, que contiene glucosa y que no contiene glutamato (Tabla 3.1) para el tratamiento de la isquemia cerebral, caracterizado por la sustitución del tampón bicarbonato por tampón fosfato. En lo que respecta al resto de su composición, se mantuvo sin modificaciones respecto a las soluciones comerciales estándar que se pueden encontrar.

Para comprobar el efecto de la eliminación de glutamato de la sangre utilizamos soluciones de diálisis con concentraciones crecientes de glutamato y manteniendo el resto de la composición (Tabla 3.1), con el objetivo de evitar la salida de glutamato desde la sangre al peritoneo y así comprobar que el efecto del tratamiento se debía a la disminución de glutamato plasmático.

Usamos también soluciones de diálisis preparadas con composiciones variadas (Tablas 3.1) de tampón, y de glucosa, y la sustitución total o parcial de glucosa por

maltodextrina (producto obtenido de la hidrólisis del almidón) para verificar que el efecto en el tratamiento era debido al cambio de tampón y no debido a otros compuestos.

	SOLUCIÓN FOSFATO GLU 0	SOLUCIÓN FOSFATO GLU 200	SOLUCIÓN FOSFATO GLU 400	SOLUCIÓN FOSFATO GLUCOSA 214	SOLUCIÓN BICARBONATO	SOLUCIÓN MALTODEXTRINA	SOLUCIÓN MALTODEXTRINA + Glucosa
NaCl	140	140	140	140	140	140	140
Ca <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> ·H <sub>2</sub> O	1,75	1,75	1,75	1,75	1,75	1,75	1,75
MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Lactato	3,5	3,5	3,5	3,5	15	3,5	3,5
Glucosa	8,3	8,3	8,3	214	8,3	-	4,15
Glutamato	-	200	400	-	-	-	-
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	10	10	10	10	-	10	10
NaHCO <sub>3</sub>	-	-	-	-	25	-	-
Maltodextrina	-	-	-	-	-	8,3	4,15
O	318,55	318,55	318,55	524,25	360,05	318,55	318,55
P/L o B/L	2,86	2,86	2,86	2,86	1,667	2,86	2,86
pH	6,5	6,5	6,5	6,5	6,5	6,5	6,5

**Tabla 3.1. Soluciones de diálisis empleadas.** Los valores se expresan en mM/L. O: Osmolaridad (mOsmoles/L.); P/L o B/L: Proporción fosfato/lactato o bicarbonato/lactato

### 3.3 Inyección de glutamato por vía intravenosa y toma de muestras

Para estudiar la utilidad de la diálisis peritoneal para disminuir el glutámico plasmático se introdujo glutamato (disuelto en solución salina 0,9%) en sangre por la vena femoral. Se realizó una cirugía en la vena femoral izquierda, de forma similar a la practicada en la arteria femoral para la extracción de muestras sanguíneas. La solución se introdujo mediante inyección continua con un flujo de 20 ul/min durante todo el proceso, terminando la inyección tras la última toma de muestra de plasma y dializado. Para controlar la velocidad de inyección, se utilizó una bomba de infusión (Harvard Apparatus PHD2000 Infusion).

En una primera serie de experimentos se utilizó una solución con una concentración 625 mM de glutamato con el fin de obtener una elevada concentración de glutamato en sangre. En una segunda serie de experimentos la solución contenía una concentración de glutamato diez veces menor (62,5 mM), de forma que obtuviésemos en sangre una concentración de 150-200  $\mu$ M, que es la concentración sanguínea que se alcanza tras un episodio isquémico en rata.

Para evaluar el efecto de la administración de glutamato en los niveles sanguíneos de esta aminoácido se canuló la arteria femoral derecha (ya descrito) y se obtuvieron muestras de sangre cada 30 minutos. La primera toma se realizó a los 15 minutos de iniciar la inyección de la solución de glutamato.

Para este experimento se realizó un único ciclo de diálisis peritoneal que comenzó tras la toma de la muestra basal de sangre y con un tiempo de reposo que duró hasta finalizar el experimento, con toma de muestras de dializado cada 15 minutos, todo ello sin renovar la solución empleada.

Para estudiar la influencia de la composición del líquido de diálisis en la reducción del glutamato plasmático utilizamos una solución de diálisis con fosfato (que utiliza fosfato como tampón) y la solución de diálisis con bicarbonato (que lleva bicarbonato como tampón). Esta última es la solución de diálisis que suele usarse en el tratamiento de la enfermedad renal crónica.

### 3.4 Grupos experimentales

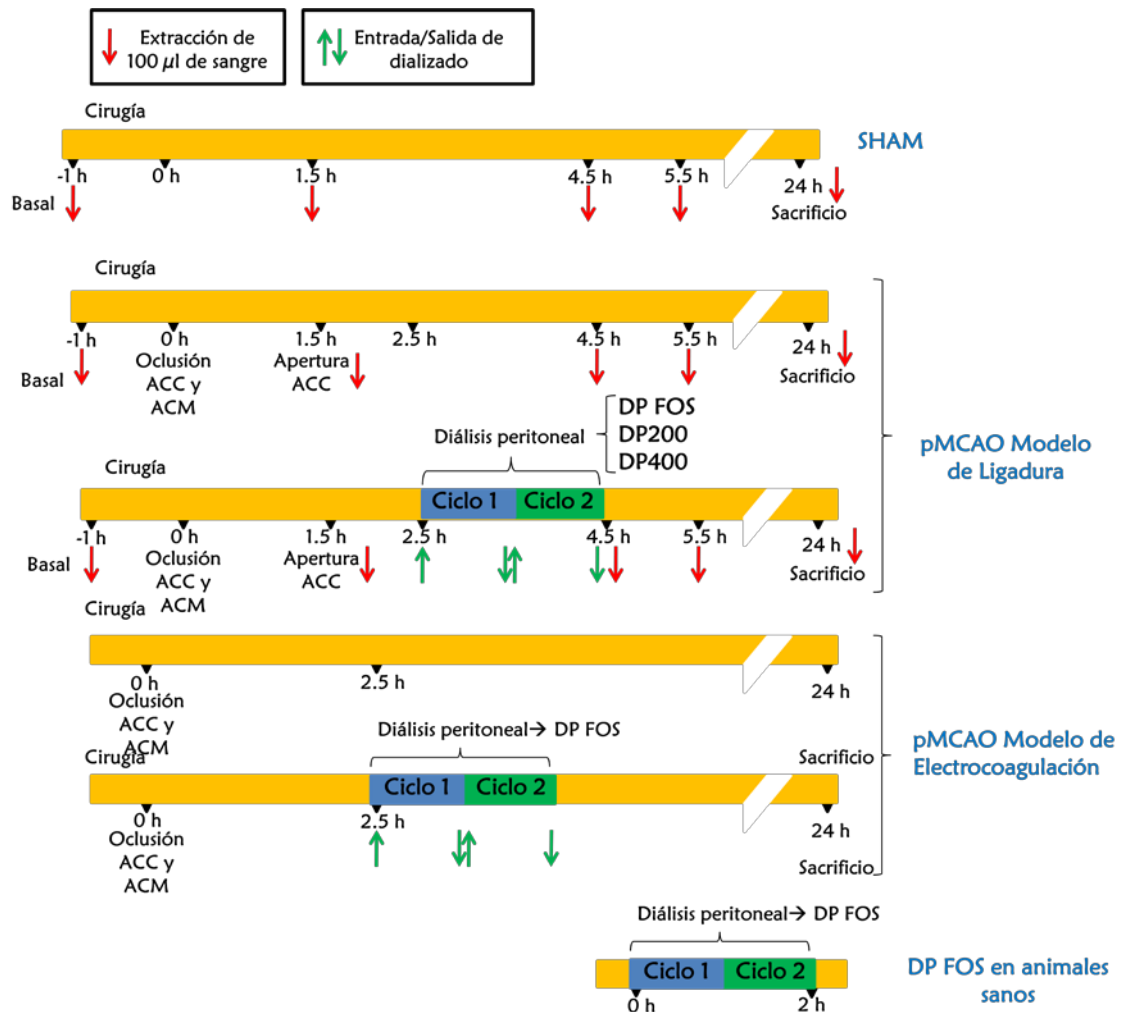
#### **3.4.1 Utilidad de la diálisis peritoneal en pMCAO**

Para valorar la utilidad de la diálisis peritoneal como tratamiento neuroprotector en la isquemia cerebral se usaron los siguientes grupos de animales:

1. Animales con cirugía, pero sin oclusión de arterias.  
**SHAM (n=9).**
2. Animales con isquemia cerebral con el modelo de ligadura.  
**pMCAO (ligadura) (n=27)\*.**
3. Animales con isquemia cerebral con el modelo de electrocoagulación.  
**pMCAO (electrocoagulación) (n=8).**
4. Animales con isquemia cerebral con el modelo de ligadura y tratados con DP con tampón fosfato.  
**pMCAO (ligadura) + DP FOS (n=29)\*.**
5. Animales con isquemia cerebral con el modelo de electrocoagulación y tratados con DP con tampón fosfato.  
**pMCAO (electrocoagulación) + DP FOS (n=7).**
6. Animales con isquemia cerebral con el modelo de ligadura y tratados con DP con tampón fosfato y una concentración 200  $\mu\text{M}$  de glutamato.  
**pMCAO DP200 (n=6).**
7. Animales con isquemia cerebral con el modelo de ligadura y tratados con DP con tampón fosfato y una concentración 400  $\mu\text{M}$  de glutamato.  
**pMCAO + DP400 (n=4).**

8. DP con fosfato en animales sanos. **DP FOS (n=3).**

\*Se hicieron grupos extra para determinar los test neurológicos (Cilindro) y los estudios de f-MRI a los 14 días.



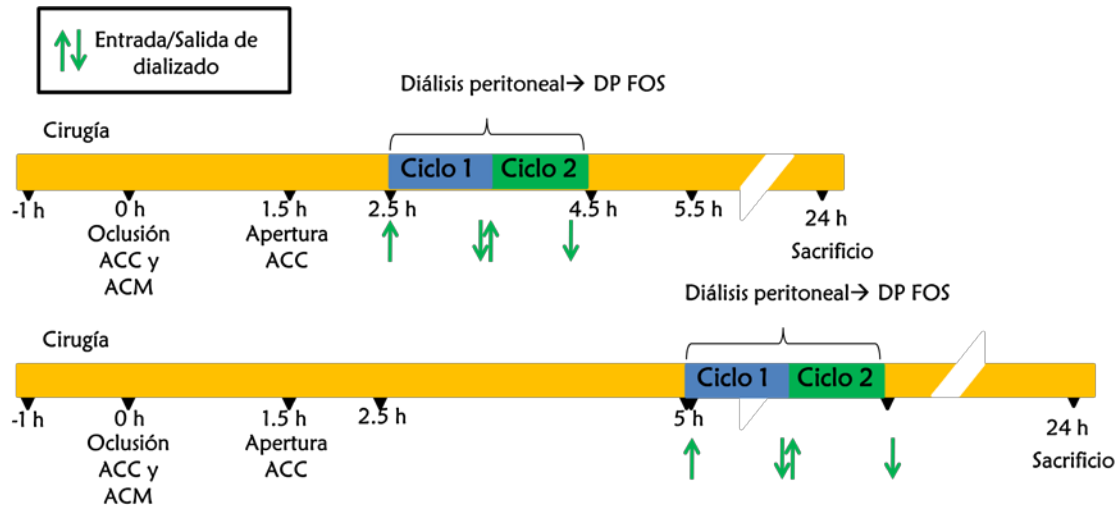
**3.4.2 Estudio de la ventana terapéutica**

Era necesario evaluar la ventana terapéutica del tratamiento por lo que retardamos la diálisis peritoneal tras la isquemia hasta 5 horas después de la oclusión de la ACM. Para evaluar la efectividad del tratamiento retrasado usamos los siguientes grupos de animales:

1. Animales con isquemia cerebral con el modelo de ligadura. **pMCAO (n=9).**
2. Animales con isquemia cerebral con el modelo de ligadura y tratados con DP a las 2.5 horas desde la oclusión de los vasos. **pMCAO + DP 2.5 horas (n=6).**

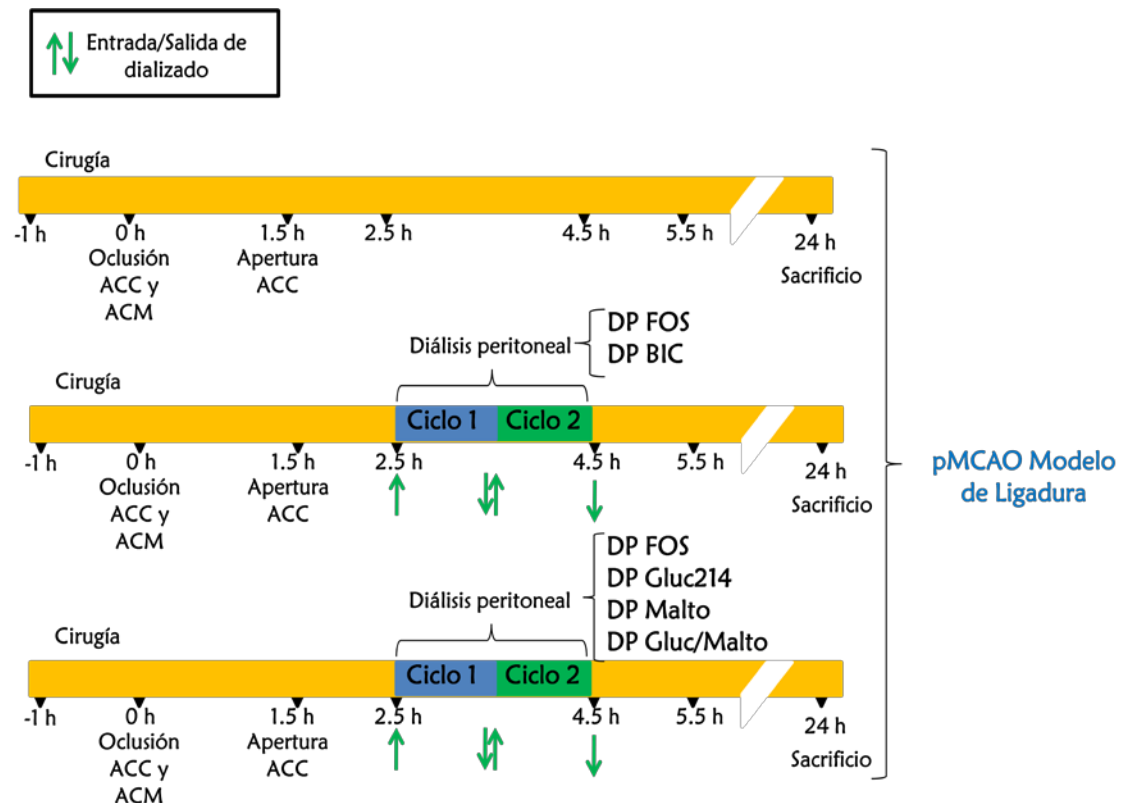
- Animales con isquemia cerebral con el modelo de ligadura y tratados con DP a las 5 horas desde la oclusión de los vasos.

**pMCAO + DP 5 horas (n=7).**



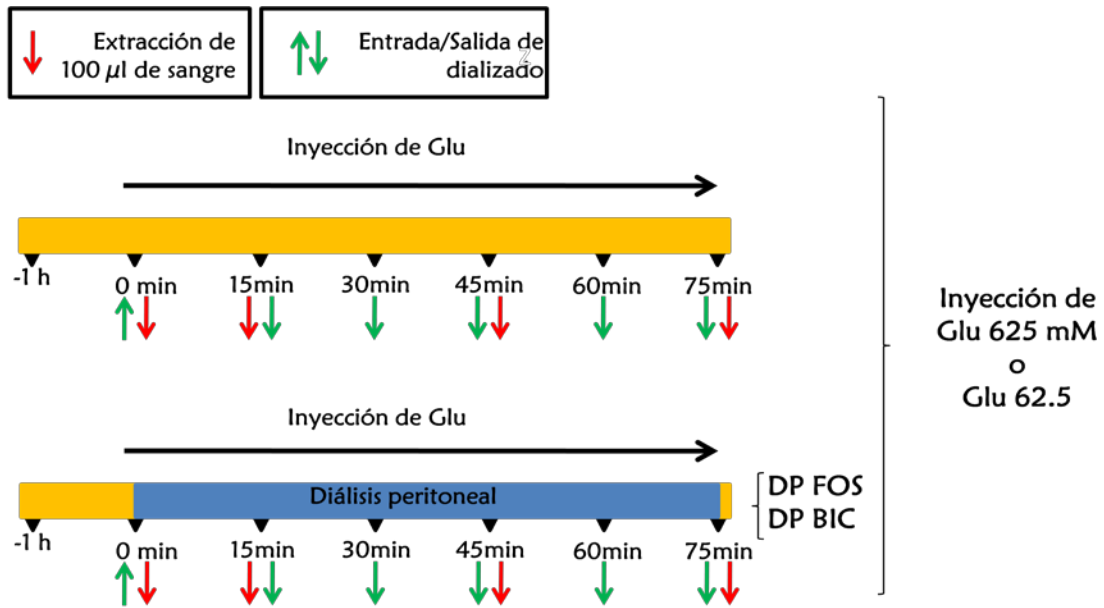
### **3.4.3 Estudio de diferentes soluciones de diálisis**

- Animales con isquemia cerebral con el modelo de ligadura.  
**pMCAO (n=9).**
- Animales con isquemia cerebral con el modelo de ligadura y tratados con DP con tampón fosfato.  
**pMCAO + DP FOS (n=6).**
- Animales con isquemia cerebral con el modelo de ligadura y tratados con DP con tampón bicarbonato.  
**pMCAO + DP BIC (n=4).**
- Animales con isquemia cerebral con el modelo de ligadura y tratados con DP con tampón fosfato y glucosa 214mM.  
**pMCAO + DP Gluc214 (n=3).**
- Animales con isquemia cerebral con el modelo de ligadura y tratados con DP con tampón fosfato y con maltodextrina en vez de glucosa.  
**pMCAO + DP Malto (n=3).**
- Animales con isquemia cerebral con el modelo de ligadura y tratados con DP con tampón fosfato y con una mezcla de glucosa y maltodextrina.  
**pMCAO + DP Gluc/Malto (n=3).**



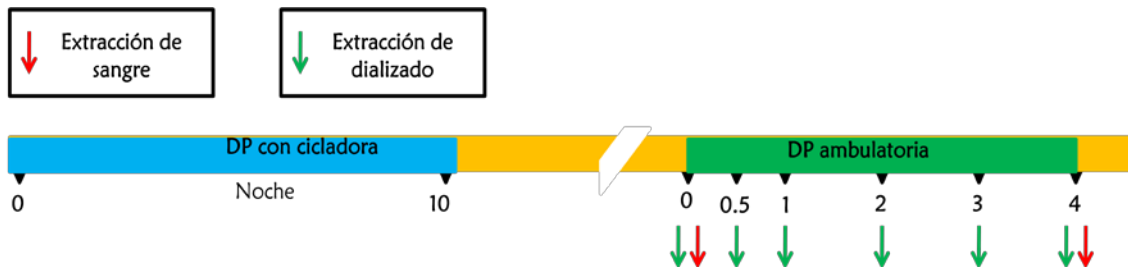
### 3.4.4 Estudio de la utilidad de la diálisis peritoneal en animales sanos con glutamato plasmático elevado

1. Animales SHAM a los que se les inyecta i.v. una solución 625 mM de glutamato SHAM + Glut 625mM (n=5).
2. Animales SHAM a los que se les inyecta i.v. una solución 625 mM de glutamato y son tratados con DP con tampón fosfato SHAM + Glut 625mM + DP FOS (n=5).
3. Animales SHAM a los que se les inyecta i.v. una solución 625 mM de glutamato y son tratados con DP con tampón bicarbonato SHAM + Glut 625mM + DP BIC (n=5).
4. Animales SHAM a los que se les inyecta i.v. una solución 62.5 mM de glutamato SHAM + Glut 62.5mM (n=5).
5. Animales SHAM a los que se les inyecta i.v. una solución 62.5 mM de glutamato y son tratados con DP con tampón fosfato SHAM + Glut 62.5mM + DP FOS (n=5).
6. Animales SHAM a los que se les inyecta i.v. una solución 62.5 mM de glutamato y son tratados con DP con tampón bicarbonato SHAM + Glut 62.5mM + DP BIC (n=5).



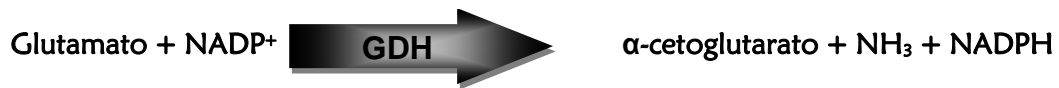
### 3.4.5 Estudio de pacientes con diálisis peritoneal

Para el estudio de los pacientes con diálisis peritoneal, utilizamos un único grupo de pacientes con enfermedad renal crónica que se estaban sometiendo a DP ambulatoria, en combinación con DP nocturna automatizada, con el fin de que todos los pacientes llegasen a la consulta de diálisis con niveles de glutamato similares (n=7).



### 3.5 Determinación de glutamato mediante método fluorométrico

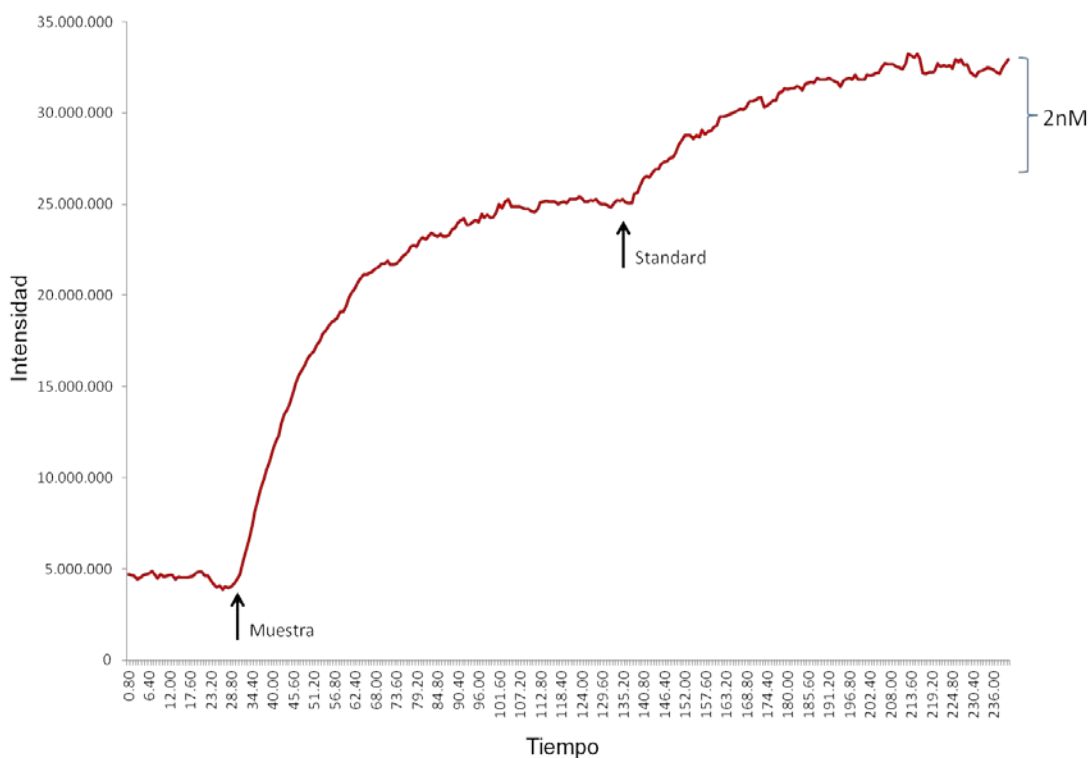
Se realizó según la técnica descrita por Nicholls y cols. (Nicholls et al., 1987). El glutamato liberado se determinó mediante la reacción catalizada por el enzima glutamato deshidrogenasa (GDH) en presencia de NADP<sup>+</sup> como cofactor y midiendo el incremento de la fluorescencia que se producía por la formación de NADPH (Fig3.6). Las variaciones de fluorescencia se registraron a unas longitudes de onda de excitación y emisión de 340 nm y 460 nm respectivamente, y las rendijas de excitación y emisión se fijaron en 15 y 20 nm respectivamente.



**Figura 3.6. Método fluorométrico.** La enzima glutamato deshidrogenasa en presencia de NADP<sup>+</sup> transforma el glutamato en α-cetoglutarato y NADPH.

El ensayo se inició añadiendo, a una cubeta de fluorímetro Perkin-Elmer LS-50, NADP<sup>+</sup> 1mM, CaCl<sub>2</sub> 1,33 mM, 1 ml de medio HBM (NaCl 140 mM, KCl 5mM, NaHCO<sub>3</sub> 5 mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.2 mM, MgCl<sub>2</sub> 1 mM, Glucosa 10 mM y Hepes 10 mM, pH=7.4) y 50 unidades de actividad de glutamato deshidrogenasa (GDH), en agitación continua y manteniendo la temperatura a 37°C en el interior del aparato. Pasados 2 minutos de la adición de la enzima, se empezó a medir la señal de fluorescencia y 20 segundos después se añadieron 10 μl de muestra. Se midió la muestra durante 100 segundos.

Dado que la reacción catalizada por la GDH es reversible, no existe linealidad entre el incremento en fluorescencia y la cantidad de glutamato ensayada. Por ello, al final de cada ensayo, se añadió un patrón de 2 nmoles de glutamato para cuantificar el glutamato liberado (Fig. 3.7).



**Figura 3.7. Lectura fluorimétrica.** Se puede observar la diferencia entre la muestra cargada y el standard de glutamato empleado, lo que se usó para determinar la cantidad de Glu que contenía la muestra por extrapolación.

### 3.6 Determinación del volumen de infarto y caracterización neurológica

#### 3.6.1. Determinación del volumen de infarto mediante sal de cloruro de 2,3,5-trifenil-tetrazolio (TTC)

24 horas tras la cirugía de la ACM los animales se sacrificaron mediante dislocación cervical. A continuación se extraía el cerebro, se colocaba en una matriz (Brain Matrix, WPI, Reino Unido) y se realizaban cortes coronales de 2 mm de grosor. Se tiñeron en una solución al 2% en buffer fosfato 0.1M de cloruro de 2,3,5-trifenil-tetrazolio (Panreac Química S.A.U., España). Cada corte se fotografió por ambas caras con una cámara fotográfica digital (Nikon Coolpix 990, Nikon Corporation, Tokyo, Japan). Tras ser fotografiados, se midió con el programa informático ImageJ (ImageJ 1.45s Wayne Rasband, National Institute of Health, Estados Unidos). Se hicieron mediciones del área infartada, el hemisferio ipsilateral sano y del hemisferio contralateral sano, de forma que fue posible calcular el porcentaje de hemisferio infartado y corregir mediante un índice de edema, pudiendo despreciar las posibles diferencias que hubiese debidas al tamaño de los cerebros de los animales.

$$\%HI = \left( 1 - \frac{\text{Vol.Ipsi.Sano}}{\text{Vol.Contra}} \right) * 100$$

#### 3.6.2. Determinación del volumen de infarto mediante resonancia magnética

Para los experimentos de resonancia magnética funcional realizados a 14 días se hizo una imagen de resonancia magnética a las 24 horas de la cirugía con el objetivo de valorar el volumen del infarto a este tiempo y poder confirmar el efecto del tratamiento (Fig. 3.8).

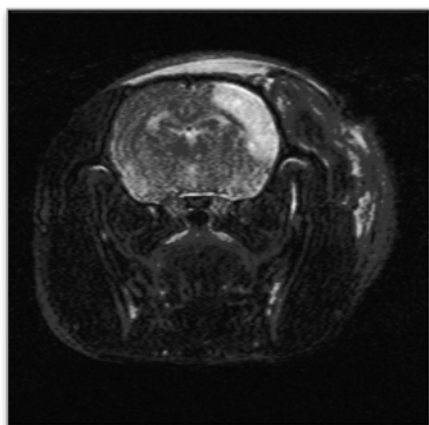


Figura 3.8. Imagen de resonancia magnética en T2 tomada 24 horas tras la isquemia.

Los animales eran anestesiados con isofluorano al 1.5-2% y se mantenía la temperatura a 37°C de forma similar a como se realizó para las cirugías. Además se usó un sensor de respiración compatible con resonancia magnética.

Todos los experimentos se llevaron a cabo en un dispositivo BIOSPEC BMT 47/40 (Bruker, Ettlingen, Alemania) de 4.7T con un sistema de gradientes de 11.2 cm, capaz de obtener un gradiente de intensidad de 200mT/m y 80  $\mu$ s de tiempo de subida.

Las imágenes tridimensionales T2WI se obtuvieron mediante RARE (de sus siglas en inglés *Rapid Acquisition with Relaxation Enhancement*), con un tiempo de repetición (TR) de 2000 segundos, un factor RARE de 16 y un intervalo inter-eco de 10ms, obteniendo como resultado un tiempo efectivo de eco de 80ms y un campo de visión de 3.5  $\times$  3.5  $\times$  1.75 cm<sup>3</sup>. La superficie de la matriz que se obtuvo era de 256  $\times$  256  $\times$  64.

El análisis de las imágenes en T2 se realizó usando el software ImageJ. Se midieron manualmente las regiones de hiperintensidad en las imágenes T2 (Fig. 3.8) en cada corte para evaluar el desarrollo espacial del edema en todo el cerebro. El volumen del edema cerebral se evaluó mediante el cálculo del número total de voxels que corresponde al sitio edematosa lo largo de todos los sectores de la imagen. El volumen total de edema cerebral se expresó mediante un porcentaje:

$$\%HI = \left(1 - \frac{\text{Vol. Ipsi. Sano}}{\text{Vol. Contra}}\right) * 100$$

### **3.6.3 Caracterización neurológica de la lesión tras la pMCAO**

Se determinó el estado neurológico de los animales 14 días post-isquemia con la prueba del cilindro y mediante el uso de imágenes de resonancia magnética funcional (f-MRI), con el fin de determinar el estado neurológico tras la ischemia y el efecto que el tratamiento con diálisis peritoneal tenía en este aspecto.

#### **3.6.3.A) Prueba del cilindro**

Para evaluar la asimetría motora, como indicativo de deterioro neurológico tras la ischemia, se utilizó la prueba del cilindro, que evalúa el uso de las extremidades delanteras (Schallert et al., 2000). En este test se evaluó el uso de las extremidades del animal durante su actividad exploratoria durante 5 minutos. Para realizar este test era necesario un cilindro transparente de 20 cm de diámetro  $\times$  30 cm de altura. La forma

cilíndrica permitía al animal la exploración de las paredes con las extremidades anteriores así como la caída. Estas dimensiones permitían la movilidad suficiente del animal para la prueba y evitaban que el animal se escapase del cilindro (Fig. 3.9).



**Figura 3.9. Fotografía de una rata realizando la prueba del cilindro. Se puede observar que el animal toca con las dos patas delanteras la pared durante su actividad exploratoria.**

Para facilitar la realización de esta prueba y para el mejor estudio de los datos, el experimento se grabó con una cámara de video desde la parte superior del cilindro. (Samsung HMX H200BP).

Para la determinación del comportamiento de las extremidades delanteras del animal se puntuaba por separado el número de veces en las que el animal tocaba la pared con una única extremidad, izquierda o derecha, así como el número de veces que el animal tocaba la pared con las dos extremidades al mismo tiempo.

El resultado se expresó como el número de veces que los animales tocaban con las dos extremidades delanteras, de forma simultánea, la pared del cilindro.

La evaluación de la prueba se realizó antes de la cirugía y a los 14 días post-ictus, de forma que se pudiera correlacionar el deterioro neurológico con la resonancia magnética funcional.

### **3.6.3.B) Resonancia Magnética funcional**

La resonancia magnética funcional es un método poco invasivo que se puede utilizar para realizar mapas de la función cerebral en enfermedades del SNC, como la enfermedad de Alzheimer, la esquizofrenia, o el ictus. Se basa en un método dependiente de los niveles de oxígeno en sangre (BOLD del inglés- Blood-Oxygen Level-Dependent-) que mide el ratio de hemoglobina oxidada o deoxidada que acompaña a la actividad cerebral (Wishart et al., 2002).

### Implantación del electrodo, microestimulación y recogida de datos

14 días tras la cirugía, los animales fueron anestesiados con uretano (1.4 g/Kg i.p.) y colocados en un aparato estereotáxico. La cirugía estándar y el procedimiento estereotáxico se realizaron colocando al animal un electrodo para estimular el cerebro, como previamente estaba descrito (Canals et al., 2008; Canals et al., 2009). Se aplicó lidocaína como anestésico local en la zona de implantación del electrodo.

Un electrodo bipolar de platino-iridio teflon (200  $\mu\text{m}$  de diámetro, 10-15 k $\Omega$ , A-M Systems, WA, Estados Unidos) fue colocado en el cuerpo caloso (desde bregma: 0 mm antero-posterior, 1 mm lateral, 2.3 mm ventral desde la superficie de la duramadre) para la activación de una zona amplia de la corteza cerebral (George y Watson, 2007). El electrodo se fijó al cráneo del animal mediante cemento dental. Una vez fijado, el animal se colocó en el escáner mediante un dispositivo estereotáxico compatible con MRI. La posición del electrodo se confirmó por medio de un escáner anatómico (Fig. 3.10).

En el escáner, el electrodo se conectó a una corriente de salida constante y generador de pulsos (STG2004, Multichannel Systems, Reutlingen, Alemania). La amplitud de corriente, duración del pulso, duración del impulso y la frecuencia de estimulación, eran controlados digitalmente. El protocolo de estimulación era un diseño de bloques consistente en 10 periodos de 4 segundos de estimulación seguidos de otro periodo de 26 segundos (10 minutos en total). Este protocolo era repetido 5 veces por animal. Los pulsos de estimulación tenían una duración de 0.1ms, una intensidad de 0.5mA y una frecuencia de 10Hz.



Figura 3.10. Imagen de resonancia magnética en T2 confirmando la localización del electrodo en el cuerpo caloso y el volumen de infarto.

### Imagen de RM

Para los experimentos de MRI, los animales anestesiados con uretano se fijaron en el lugar adecuado, permitiendo el correcto posicionamiento del animal con respecto al imán y evitando movimientos que produjeran artefactos en la imagen. La temperatura, la frecuencia cardiaca, la presión de  $\text{O}_2$  y la frecuencia respiratoria se monitorean durante la sesión.

Los experimentos se llevaron a cabo en un escáner horizontal de 7 Teslas, con 30 cm de diámetro de orificio (Biospec 70/30v, Bruker Medical, Ettlingen, Alemania). La resonancia magnética funcional se realizó en 15 cortes coronales usando una secuencia GE-EPI con los siguientes parámetros: FOV 25 x 25mm, grosor del corte 1mm, matriz 96 x 96, segmentos 1, FA 60°, TE 15ms y TR 2000ms.

Los datos funcionales se superpusieron sobre las imágenes anatómicas de alta resolución. Las imágenes anatómicas ponderadas en T-2 eran recogidas usando una RARE con los siguientes parámetros: FOV 25 x 25mm, 15 cortes, grosor de corte 1mm, matriz 192 x 192, TE<sub>eff</sub> 56ms, TR 2s y un factor RARE de 8.

Los datos se adquirieron con una consola Hewlett-Packard que funcionaba con software Paravision (Bruker BioSpin MRI GmbH, Alemania) ejecutado desde plataforma Linux.

Los datos de resonancia magnética funcional se analizaron usando un software propio, desarrollado en MATLAB que incluía los paquetes de mapas estadísticos paramétricos (SPM2, <http://www.fil.ion.ucl.ac.uk/spm>).

Los experimentos de resonancia magnética funcional se realizaron en el Instituto de Neurociencias de Alicante perteneciente a la Universidad Miguel Hernández-Consejo Superior de Investigaciones Científicas, en colaboración con el Dr. Santiago Canals y Jesús Pacheco.

### 3.7 Diálisis peritoneal en humanos.

Se analizaron 6 pacientes con enfermedad renal crónica en programa de diálisis, a los que previamente se les había insertado un catéter de silicona en la pared abdominal mediante la técnica de Seldinger, en la que se inserta una aguja a través de la que se introduciría el catéter en la cavidad peritoneal. Mediante esta técnica conseguimos un reducido tiempo de implantación del catéter, de 15-20 minutos.

Los pacientes se sometieron a un ciclo de diálisis nocturno de 10 horas previo a la sesión de diálisis ambulatoria. En el hospital se midieron los niveles de glutamato en líquido de diálisis a diferentes tiempos (0, 0,5, 1, 2, 3 y 4 horas) después de la infusión de 2 litros de líquido de diálisis Physioneal® (3.86%: Baxter, Madrid, España). Las muestras se obtuvieron mediante drenajes parciales de la cavidad peritoneal en cada momento.

Se obtuvieron dos muestras de sangre por paciente, antes y después de la diálisis peritoneal, que se mantenían a temperatura ambiente durante 30 minutos para favorecer la coagulación. Una vez coagulada se sometían las muestras a una centrifugación a 1500xg durante 10 minutos para separar el suero del resto de componentes de la sangre. La fracción superior o sobrenadante tras la centrifugación correspondía al suero sanguíneo, el cual era aspirado con cuidado y almacenado a -80°C.

Las muestras de sangre y dializado se tomaron en el Hospital Universitario La Princesa, en colaboración con la Unidad de Ictus del Servicio de Neurología del Hospital Universitario La Princesa (responsable Dr. J. Vivancos Mora) y del equipo multidisciplinar de la Unidad del Servicio de Nefrología del HUP (responsable Dr. J.A. Sánchez Tomero).

### 3.8 Análisis estadístico

Los resultados se han expresado mediante el cálculo de la media  $\pm$  el error estándar de la Media (EEM) de cada valor en los diferentes experimentos que se han llevado a cabo usando el software Prism 5 para Windows 5.01 (GraphPad Software, Inc.).

Como análisis estadísticos se emplearon el análisis de *t-Student* cuando se comparaban dos grupos experimentales y el análisis de varianza (ANOVA) seguido de un test de comparación de Turkey o Bomferroni, para comparar dos o más grupos.

Se analizó la relación entre el glutamato plasmático y el tamaño del infarto mediante el coeficiente de correlación de Pearson.

Se consideró el valor de  $p < 0.05$  estadísticamente significativo.



# *RESULTADOS*



## 4.- RESULTADOS

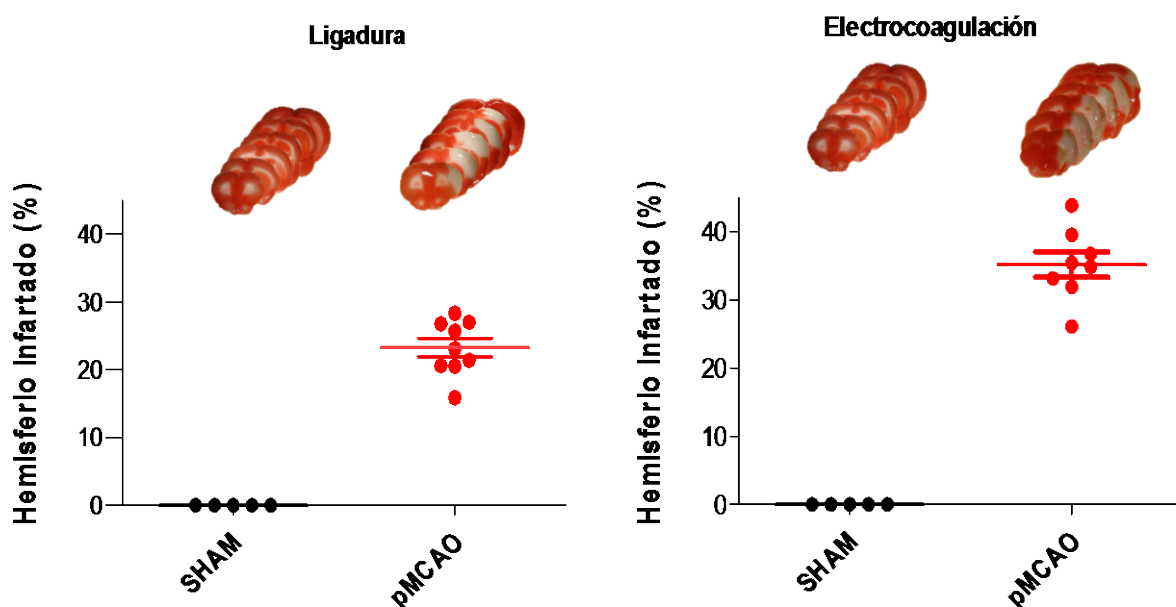
### 4.1 Estudio de la eficacia de la diálisis peritoneal en el ictus experimental

#### 4.1.1 Modelos de isquemia experimental

##### 4.1.1.A) Daño cerebral

Hemos trabajado con dos modelos de isquemia cerebral en la rata mediante oclusión de la ACM con ligadura o bien mediante electrocoagulación.

En el caso del modelo de ligadura obtuvimos un porcentaje de hemisferio infartado del  $23.3 \pm 1.3\%$  (n=9). La lesión en el caso del modelo de electrocoagulación fue mayor,  $35.18 \pm 5.25\%$  (n=8) (Fig. 4.1).



**Figura 4.1. Lesión isquémica.** Representación del porcentaje de hemisferio infartado. Modelo de ligadura (izquierda). Modelo de electrocoagulación (derecha). El porcentaje de hemisferio infartado se midió en ambos modelos a las 24 horas de la isquemia, mediante la tinción de los cortes de cerebro con TTC. Los datos representan medias  $\pm$  SEM.

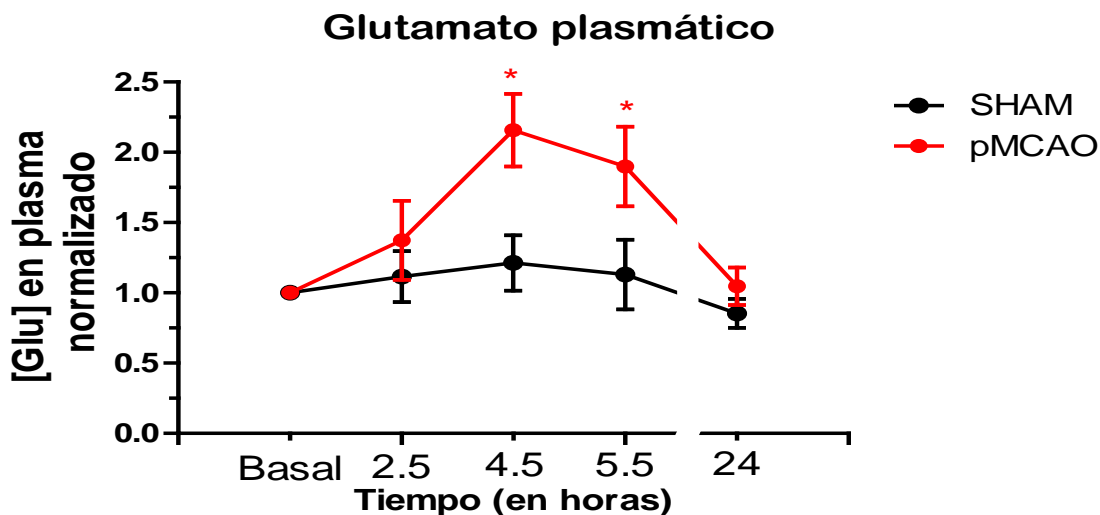
El modelo de electrocoagulación se usó solamente para comprobar que la diálisis peritoneal es efectiva en varios modelos de isquemia experimental. La toma de muestras sanguíneas, los test neurológicos, y la fMRI y el resto de estudios se llevaron a cabo con

el modelo de ligadura, ya que es menos agresivo para el animal y es el modelo mejor establecido en nuestro laboratorio.

#### 4.1.1.B) Niveles de glutamato

Se ha observado que tras el ictus hay un incremento de la concentración plasmática de glutamato, que es mayor y más prolongado en los pacientes con peor pronóstico (Castillo et al., 1996; Castillo et al., 1997), probablemente debido a la salida de glutamato desde el cerebro a la sangre (Hawkins et al., 2006a; Teichberg et al., 2009). Es por este motivo por lo que planteamos hacer un estudio del curso temporal para determinar el momento de mayor elevación de la concentración de glutamato en plasma, con el fin de aplicar el tratamiento de diálisis peritoneal con antelación a ese momento.

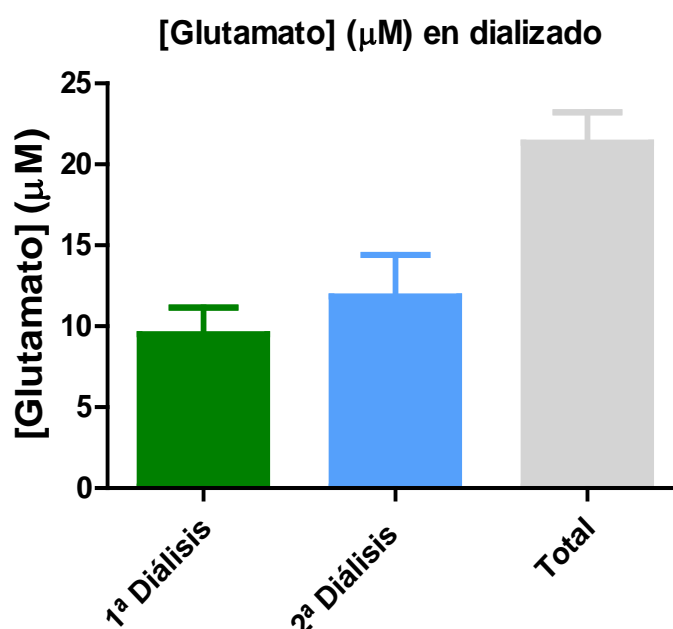
Se realizó un curso temporal para medir los niveles de glutamato en plasma de animales SHAM y animales isquémicos (pMCAO). Los resultados muestran un incremento de la concentración de glutamato plasmático en las ratas sometidas a pMCAO a las 4.5 y a las 5.5 horas tras la isquemia (Fig. 4.2) que duplicaba los niveles encontrados en los animales SHAM.



**Figura 4.2. Niveles de glutamato en plasma tras la isquemia.** Niveles de glutamato en plasma en animales Sham y pMCAO. Curva temporal que muestra los cambios en la concentración plasmática de glutamato tras la oclusión de la ACM. La muestra basal de plasma se tomó antes de iniciar la cirugía para la oclusión de la arteria cerebral media y las arterias carótidas, previa canulación de la arteria femoral obteniendo un valor basal de  $51,8 \pm 2,6 \mu\text{M}$ . Los datos representan medias normalizadas  $\pm$  SEM. (\* $p < 0.05$ ;  $\nu$ s. SHAM).

La determinación del glutamato plasmático se realizó mediante un ensayo enzimático que acopla el metabolismo de glutamato a la formación de NADPH según se describe en Material y Métodos.

Para comprobar la capacidad de la diálisis peritoneal para eliminar glutamato plasmático, realizamos la técnica en animales sanos. Se realizó la diálisis peritoneal con dos ciclos de llenado, reposo, vaciado, tal y como se realizará en los animales con isquemia, para evaluar la capacidad del peritoneo en estas condiciones. En los animales sanos, observamos que la diálisis peritoneal era capaz de retirar glutamato del animal, obteniendo concentraciones similares tras el primer y el segundo ciclo ( $9.5 \pm 1.7 \mu\text{M}$  y  $11.84 \pm 2.6 \mu\text{M}$ ,  $n=3$ ) (Fig. 4.3).



**Figura 4.3.** Niveles de glutamato en el dializado en animales sanos. La diálisis peritoneal se realizó con una solución de diálisis (glucosa, 8.3 mM, NaCl 140 mM,  $\text{CaCl}_2$  1.75 mM,  $\text{MgCl}_2$  0.5 mM, ácido láctico 3.5 mM,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  10 mM; pH 6.5) que no contenía glutamato y se valoró la cantidad del aminoácido en el líquido tras cada uno de los ciclos de DP y el total como la suma del glutamato en cada uno de estos ciclos.

#### **4.1.2 Efecto de la diálisis peritoneal**

##### **4.1.2.A) Daño cerebral**

Una vez establecidos los modelos de isquemia que íbamos a utilizar, aplicamos la DP a animales isquémicos con el modelo de ligadura. Se realizó la cirugía para producir isquemia cerebral y se aplicó el tratamiento de DP con dos ciclos de llenado, reposo y vaciado, tal y como se había realizado en animales sanos. Frente al  $23.3 \pm 1.3\%$  de

porcentaje de hemisferio infartado obtenido en los animales sin tratamiento, obtuvimos un  $12.1 \pm 2.2\%$  ( $n=6$ ,  $p < 0.01$ ), lo que suponía una reducción de la lesión del 48.1% (Fig. 4.4).

Para confirmar el efecto neuroprotector de la diálisis peritoneal, utilizamos también el modelo de electrocoagulación utilizado con anterioridad en nuestro laboratorio, aplicando la DP una vez transcurrido el mismo tiempo desde el inicio de la isquemia. En este modelo obtuvimos tras la DP un volumen de infarto de  $21.40 \pm 9.59\%$  ( $n=7$ ;  $p < 0.01$ ) lo que supone una reducción del 39.17%, similar a la obtenida con el modelo de ligadura (Fig. 4.4).

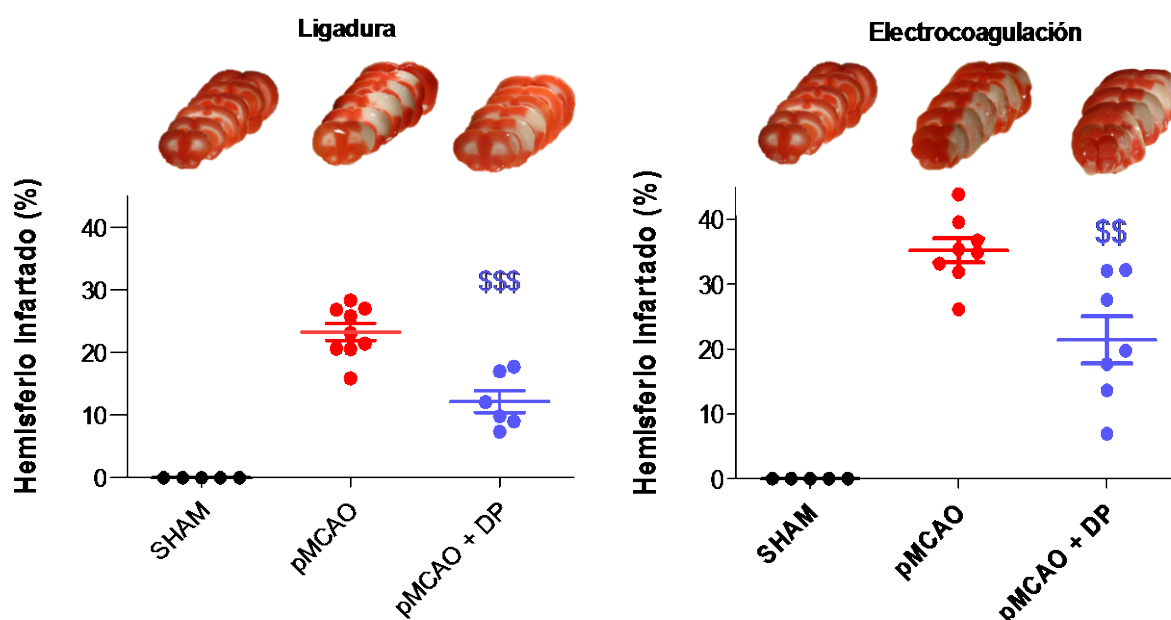
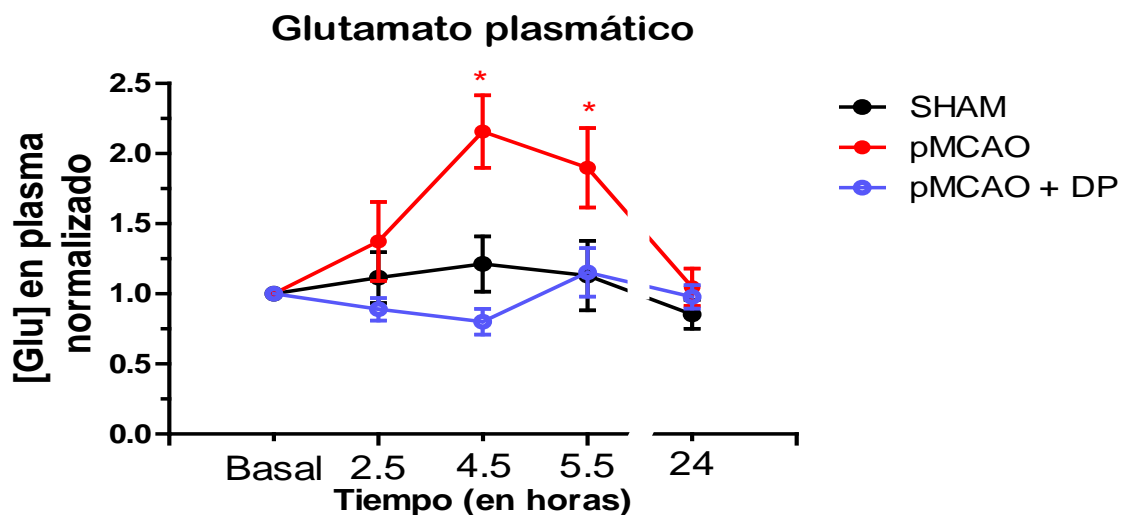


Figura 4.4. La diálisis peritoneal disminuye el volumen de infarto en los dos modelos de isquemia cerebral. El porcentaje de hemisferio infartado se midió a las 24 horas de la isquemia en ambos modelos, mediante la tinción de los cortes de cerebro con TTC. Los datos representan medias  $\pm$  SEM. ( $$$$ p < 0.001$  pMCAO + DP vs. pMCAO).

#### 4.1.2.B) Niveles de glutamato

Una vez confirmado en nuestro modelo de isquemia experimental que la DP reducía la lesión en el cerebro, comprobamos que el tratamiento también reducía los niveles de glutamato plasmático elevados tras la isquemia.

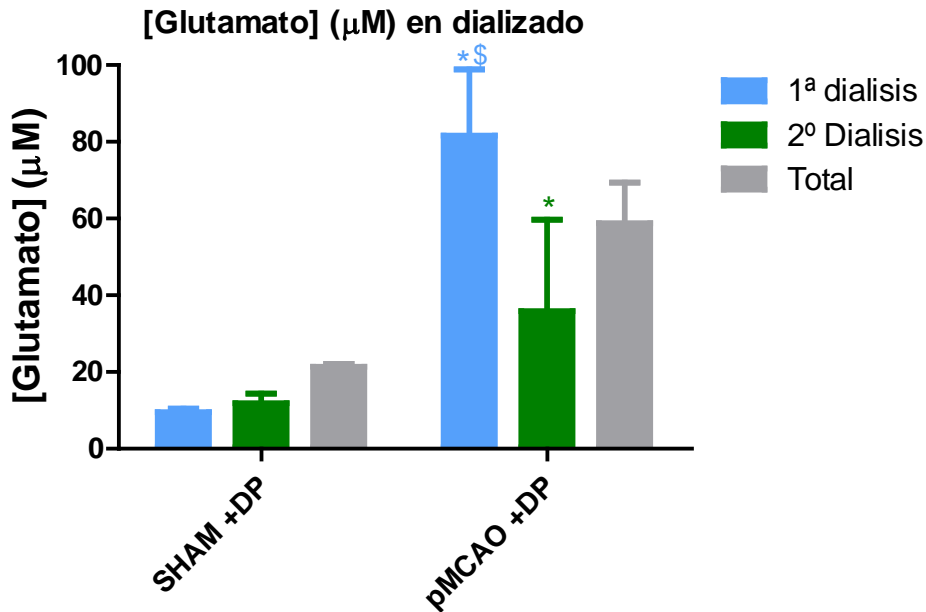
Se realizó el mismo curso temporal para medir los niveles de glutamato en plasma en los animales isquémicos tratados con diálisis peritoneal (pMCAO + DP) y comparamos los resultados con los animales SHAM y con los animales isquémicos (pMCAO) (Fig.4.5). Frente al incremento inducido por la isquemia en la concentración de glutamato plasmático (con valores máximos 4.5 y 5.5 horas después de la oclusión), los animales tratados con diálisis peritoneal no presentaron diferencias en los niveles plasmáticos de glutamato en comparación con los animales SHAM.



**Figura 4.5. La diálisis peritoneal disminuye los niveles de glutamato en plasma tras la isquemia.** Niveles de glutamato en plasma en animales SHAM, pMCAO y pMCAO + DP. Las muestras de plasma se tomaron de la arteria femoral derecha. Se consideró tiempo 0 la oclusión de la ACM. Los datos representan medias  $\pm$  SEM. (\* $p < 0.05$ ; vs. SHAM)

Así mismo, comprobamos también que los niveles de glutamato en el dializado de los animales isquémicos con DP también aumentaban. Los niveles de glutamato en el dializado de los animales isquémicos eran mayores que en los animales Sham, existiendo diferencias significativas en los niveles de glutamato analizados tanto después del primer ciclo de diálisis ( $81.65 \pm 17.22 \mu\text{M}$ ,  $n=9$ ,  $p < 0.05$ ) como después del segundo ciclo ( $35.9 \pm 23$ ,  $n=9$ ,  $p < 0.05$ ) (Fig. 4.6).

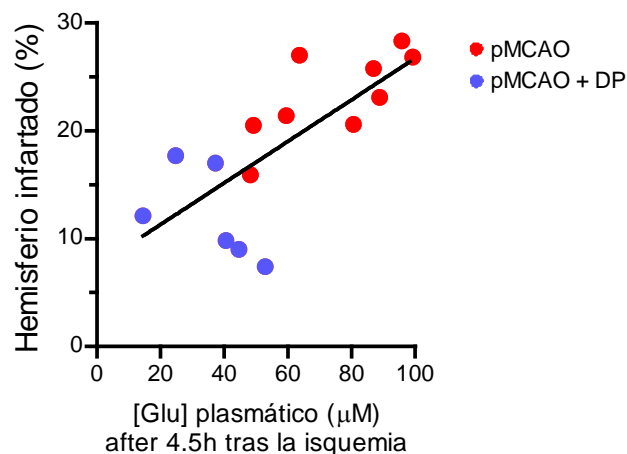
Al comparar la efectividad de ambos ciclos de DP en la retirada de glutamato observamos la cantidad de glutamato retirado era mayor en el primer que en el segundo ciclo, y que esta diferencia era significativa.



**Figura 4.6.** Aumento del glutamato en el dializado en los animales isquémicos tratados con DP. Niveles de glutamato en el dializado en animales sanos y animales isquémicos con DP. Las muestras fueron obtenidas tras cada ciclo de DP. Los datos representan medias  $\pm$  SEM. (\*p < 0.05; vs. SHAM; ^ p < 0.05; vs. 1ª Dialisis)

#### 4.1.2.C) Correlación daño cerebral- niveles de glutamato

Realizamos un análisis de correlación entre los niveles de glutamato plasmáticos y el tamaño del infarto mediante un coeficiente de correlación de Pearson que confirmaba la relación entre estos parámetros lo que sugiere, por tanto, que la reducción del glutamato plasmático es responsable del efecto neuroprotector (Fig. 4.7).



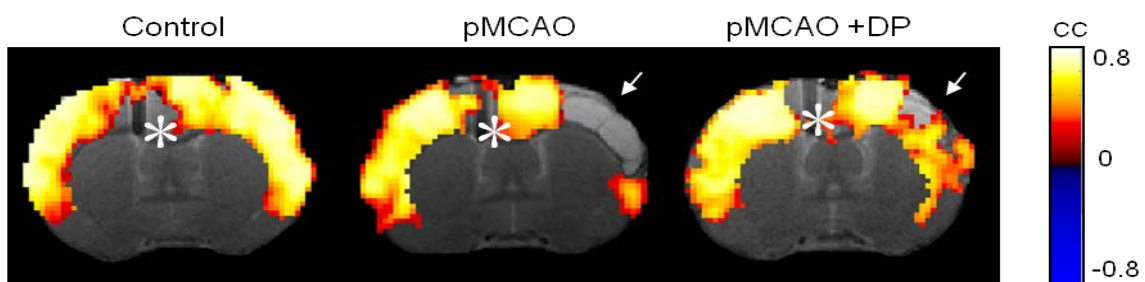
**Figura 4.7.** Correlación entre la lesión y el tratamiento con diálisis peritoneal. Coeficiente de correlación de Pearson entre el porcentaje de hemisferio infartado y los niveles de glutamato en plasma. ( $r^2 = 0.5312$ ,  $p=0.0021$ ).

#### 4.1.2.D) Valoración funcional: fMRI

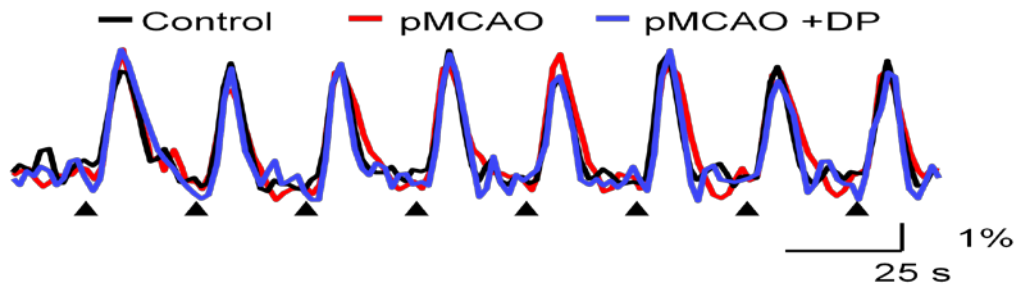
A pesar de los beneficios observados de la diálisis peritoneal, era necesario confirmar que el menor volumen de infarto tras la isquemia con la diálisis peritoneal se correlacionaba con una mayor proporción de tejido con actividad funcional. Para determinar la funcionalidad del tejido utilizamos la imagen de resonancia funcional, basada en la señal BOLD (Blood-Oxygenation-Level Dependent) (Logothetis, 2008). Los experimentos de f-MRI se realizaron 14 días después del episodio isquémico en animales sometidos a MCAO con y sin diálisis peritoneal.

La estimulación del cuerpo calloso produjo mapas de activación cerebral en toda la corteza del animal (Fig. 4.8). El curso temporal de activación de la señal BOLD durante la activación del cuerpo calloso mostraba una completa recuperación de la respuesta hemodinámica después de varios periodos de activación y la ausencia de artefactos de movimiento o actividad espontánea post-estímulo indicadora de convulsiones (Fig. 4.9). La activación funcional se extendía a ambos hemisferios cerebrales de forma simétrica, al menos en los animales controles. Esta simetría se perdía en los animales pMCAO debido a la lesión isquémica (Fig. 4.8).

Para cuantificar el tejido viable, definimos un índice de funcionalidad como el cociente entre el volumen de tejido cortical activo en el hemisferio infartado dividido entre el volumen de tejido cortical activo en el lado contralateral durante la estimulación. Los animales control se usaron como referencia. Así, el índice de funcionalidad mide la extensión de la lesión normalizada con el hemisferio infartado y disminuye la variabilidad experimental.



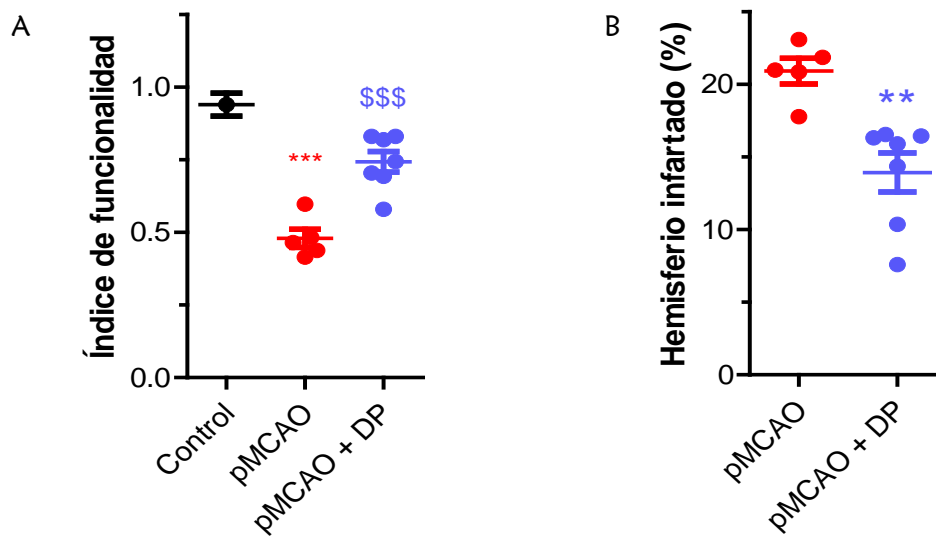
**Figura 4.8. Activación cortical mediante f-MRI.** Activación cortical representativa en un animal control, un animal isquémico y un animal isquémico con diálisis peritoneal, durante la estimulación del cuerpo calloso. El electrodo aparece como un artefacto y es marcado con un asterisco. La flecha indica el área infartada. La escala de color representa la correlación (valor  $r$ ) de la señal BOLD.



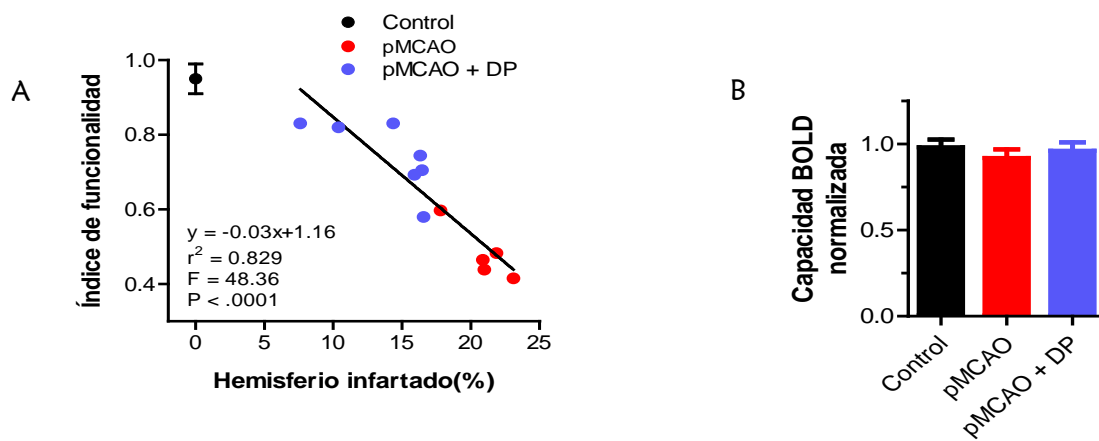
**Figura 4.9.** Promedio de la señal hemodinámica en respuesta a la estimulación del cuerpo caloso ( $p < 0.0001$ , no corregido). La llegada del impulso eléctrico (4 seg. a 10 Hz), es marcada por las puntas de flecha. Se muestran 8 periodos de estimulación.

Como se muestra en las figuras 4.8 y 4.10A, los animales pMCAO muestran una gran pérdida de viabilidad cortical. La diálisis peritoneal previene parcialmente este daño funcional rescatando tejido viable.

En los mismos animales medimos el volumen de infarto de forma similar a como lo habíamos medido 24 horas tras la cirugía con las imágenes T-2 con RMN y calculamos el porcentaje de hemisferio infartado, demostrando, no solo la reducción de la lesión isquémica mediante la diálisis (Fig. 4.10B), sino también, que existe una estrecha correlación entre esta reducción y el índice de funcionalidad (Fig. 4.11).



**Figura 4.10. A Índice de funcionalidad.** La función medida mediante BOLD se realizó a los 14 días de la oclusión de la ACM en animales control, isquémicos sin tratamiento (pMCAO) e isquémicos tratados con DP (pMCAO + DP) Los datos representan medias  $\pm$  SEM. (\*\*\*)  $p < 0.001$  vs. Control; \$\$\$  $p < 0.01$  vs. pMCAO) **B. La diálisis peritoneal reduce el volumen de infarto medido con imágenes T2.** El tamaño de la lesión isquémica se midió como el volumen de tejido con señal hiperintensa en T2 a los 14 días de la oclusión de la ACM en animales isquémicos sin tratamiento (pMCAO) e isquémicos tratados con DP (pMCAO + DP) Los datos representan medias  $\pm$  SEM. (\$\$  $p < 0.01$  vs. pMCAO)



**Figura 4.11 A. Coeficiente de correlación entre lesión y f-MRI.** Coeficiente de correlación de Pearson entre el porcentaje de hemisferio infartado y la medida de la función mediante BOLD a los 14 días de la lesión isquémica. A los animales dializados se les realizó la DP a las 2.5 horas de la oclusión de la ACM. ( $r^2 = 0.829$ ,  $p < 0.001$ ) **B. Análisis de la amplitud de la señal BOLD en el tejido activado normalizado.**

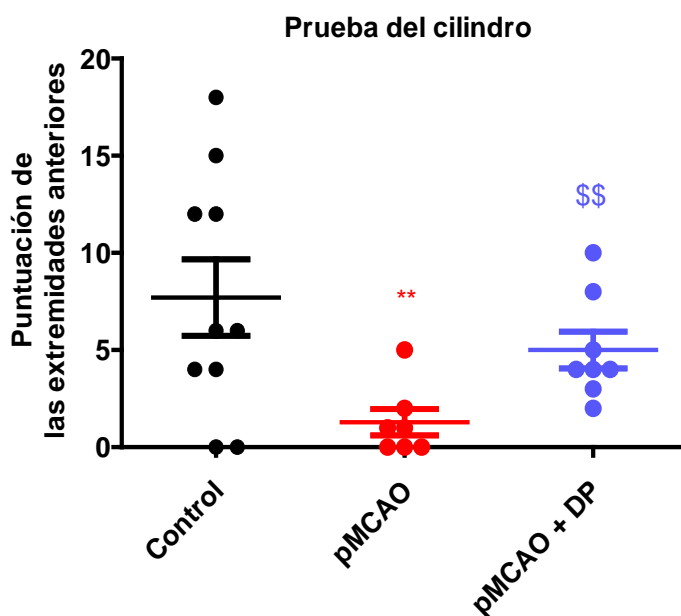
En conjunto, esto demuestra que la reducción en el volumen de infarto por la diálisis peritoneal mantiene la integridad neuronal y confirma la validez de las medidas anatómicas de la lesión en imágenes T2 como predictores de la funcionalidad. La figura 4.11B, muestra que no existían diferencias en la amplitud de la señal BOLD en los diferentes grupos de.

#### 4.1.2.E) Valoración funcional: prueba del cilindro

El empleo de test neurológicos permite demostrar que el tejido considerado viable por parámetros energéticos o metabólicos es funcional desde un punto de vista neurológico. Uno de los más empleados en el estudio de la isquemia cerebral es el estudio de la asimetría de las extremidades mediante la prueba del cilindro, que mide las veces que el animal encerrado en un cilindro estrecho y transparente apoya simultáneamente las dos extremidades superiores en las paredes de dicho cilindro. Este test evalúa deficiencias en casi todos los modelos de isquemia experimental, tanto a largo como a corto plazo (Schallert et al., 2000).

En relación con los resultados obtenidos en la resonancia magnética funcional, hemos demostrado mejoría en la función neurológica mediante el test del cilindro, evaluando el uso de las extremidades anteriores del animal en los diferente grupos a los 14 días de la lesión (mismo tiempo que la f-MRI). El uso de las extremidades delanteras disminuía drásticamente en los animales isquémicos ( $1.28 \pm 0.68$ ,  $n=7$ ) en comparación con animales sanos (controles) ( $7.7 \pm 1.97$ ,  $n=10$ ;  $p < 0.01$ ). Sin embargo en los animales sometidos a pMCAO con diálisis peritoneal, el porcentaje de uso de estas extremidades

era significativamente superior al de los animales sin tratamiento ( $5 \pm 0.95$ ,  $n=8$ ;  $p < 0.01$ ), lo que refleja la mejora neurológica (Fig. 4.12).



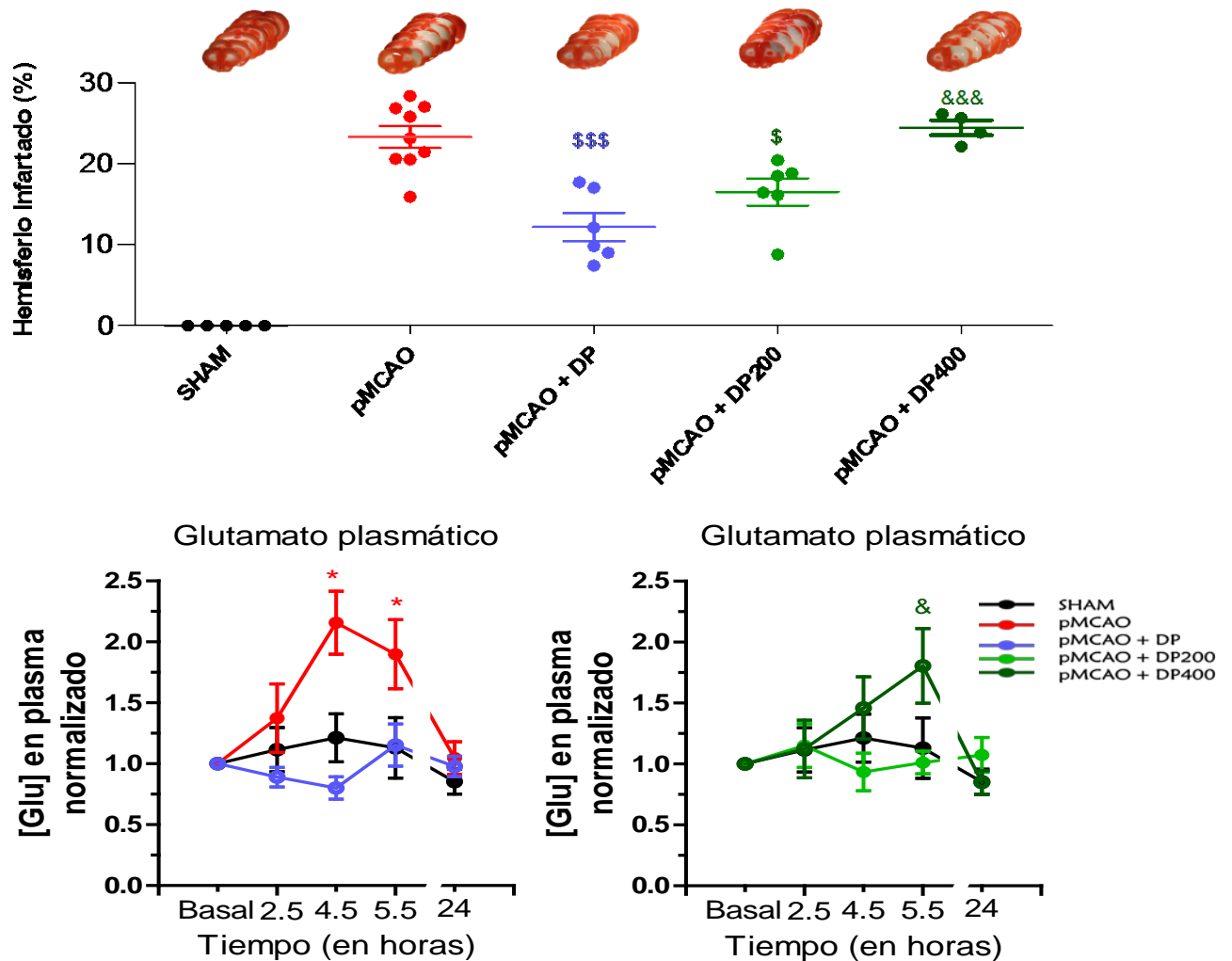
**Figura 4.12.** Recuperación funcional evaluada mediante la prueba del cilindro. Los animales fueron sometidos al test del cilindro a los 14 días de la oclusión de la ACM, previo a la realización de la f-MRI. Los datos representan medias  $\pm$  SEM. (\*\*  $p < 0.01$  vs. Control; \$\$  $p < 0.01$  vs. PMCAO)

#### **4.1.3 Estudio de la implicación del glutamato en el efecto protector de la diálisis peritoneal**

Una vez confirmado que el tratamiento con la diálisis peritoneal reducía el volumen de infarto y la concentración de glutamato en sangre, era necesario probar que el responsable de la mejoría proporcionada por la diálisis peritoneal era la reducción de glutamato plasmático por salida al peritoneo. Para ello realizamos experimentos en los que se añadió glutamato al líquido de diálisis que se introducía en la cavidad peritoneal con la finalidad de disminuir el gradiente que favorece la salida del aminoácido de sangre a la cavidad peritoneal.

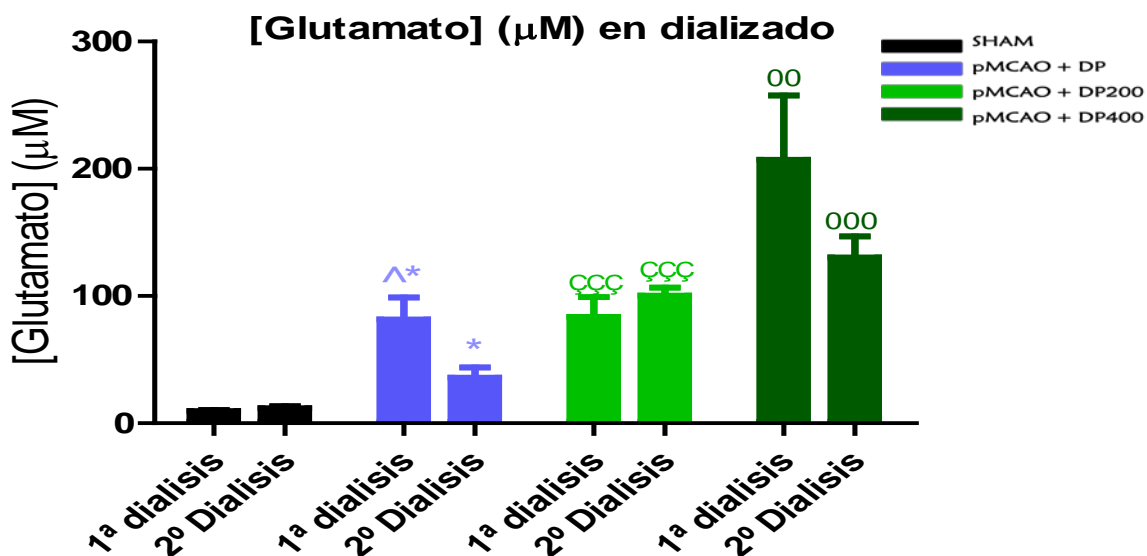
Los resultados muestran que en los animales isquémicos dializados con la solución con  $200 \mu\text{M}$  de glutamato, la isquemia no incrementó los niveles de glutamato plasmático a la vez que redujo el volumen de infarto ( $16.5 \pm 1.67\%$ ,  $n=6$ ;  $p < 0.05$ ) (Fig. 4.13), lo que sugiere que en estas condiciones la diálisis peritoneal todavía es efectiva. Sin embargo, cuando la diálisis se realiza con líquido que contiene  $400 \mu\text{M}$  de glutamato, encontramos que la isquemia aumentó la concentración de glutamato plasmático a las 5.5 horas ( $1.8 \pm 0.3$ ,  $n=4$ ), en un rango similar al encontrado en los

animales sin tratamiento ( $1,9 \pm 0,28$ ,  $n=6$ ), aunque con un perfil de subida de glutamato más lento. Además, la diálisis no redujo el volumen de la lesión ( $24.4 \pm 0.91\%$ ,  $n=4$ ) que no mostró diferencias significativas al compararlo con los animales sin tratamiento ( $23.3 \pm 1.3\%$ ,  $n=6$ ) (Fig. 4.13). Por tanto, la introducción de  $400 \mu\text{M}$  de glutamato en el líquido de diálisis reduce/anula el gradiente de glutamato que permite su salida de sangre al peritoneo y, por tanto, el efecto beneficioso de la diálisis.



**Figura 4.13.** La eliminación del glutamato de la sangre es responsable de la reducción de la lesión isquémica. Como control, añadimos glutamato al líquido de diálisis para evitar la reducción de glutamato. Se usaron dos soluciones con glutamato añadido, una con una concentración  $200 \mu\text{M}$  de glutamato (pMCAO + DP200) y otra con una concentración  $400 \mu\text{M}$  de glutamato (pMCAO + DP400). En ambos grupos experimentales se realizó el tratamiento con diálisis peritoneal a las 2.5 horas del comienzo del proceso isquémico. La muestra basal se tomó con anterioridad al comienzo de la cirugía. La toma de muestras sanguíneas consideraba el tiempo 0 el momento de la oclusión de la ACM. El porcentaje de hemisferio infartado se midió a las 24 horas de la isquemia, mediante la tinción de los cortes de cerebro con TTC. Los datos representan medias  $\pm$  SEM. (\*  $p < 0.05$  vs. SHAM; &  $p < 0.05$  vs. pMCAO + DP) (§§  $p < 0.01$  vs. pMCAO; §  $p < 0.05$  vs. pMCAO &&&  $p < 0.001$  vs. pMCAO + DP)

Al analizar la concentración de glutamato en el dializado de los animales isquémicos tratados con las soluciones enriquecidas, observamos que en el dializado de concentración 200  $\mu\text{M}$  se reducía significativamente ya que la concentración encontrada era menor que la introducida, tanto después del primer ciclo de diálisis (Fig. 4.14) ( $83.69 \pm 15.54 \mu\text{M}$ ,  $n=6$ ;  $p < 0.001$ ) como del segundo ( $100.5 \pm 6.25 \mu\text{M}$ ,  $n=6$ ;  $p < 0.001$ ). Una reducción similar observamos cuando analizamos el dializado de los animales isquémicos tratados con la solución con 400  $\mu\text{M}$  de glutamato. Así obtuvimos una concentración de  $207.2 \pm 50.50 \mu\text{M}$  tras el primer ciclo de diálisis peritoneal ( $n=4$ ;  $p < 0.001$ ) que disminuyó aún más ( $130.3 \pm 16.45 \mu\text{M}$ ) tras el segundo ciclo ( $n=4$ ;  $p < 0.01$ ).



**Figura 4.14. Comportamiento del glutamato en el líquido de diálisis.** Se midió la cantidad de glutamato que se obtenía después de la diálisis peritoneal en isquémicos. Se analizó el dializado después de cada ciclo de DP. Como control, añadimos glutamato al líquido de diálisis para evitar la reducción de glutamato. Se usaron dos soluciones con glutamato añadido, una solución con una concentración 200  $\mu\text{M}$  de glutamato (pMCAO + DP200) y otra con una concentración 400  $\mu\text{M}$  de glutamato (pMCAO + DP400), además de la solución sin glutamato. En todos los grupos experimentales se realizó el tratamiento con diálisis peritoneal a las 2.5 horas del comienzo del proceso isquémico. (\* $p < 0.05$  vs. SHAM; <sup>^</sup> $p < 0.05$  vs. 2<sup>a</sup> Diálisis; ÇÇÇ  $p < 0.001$  vs. 200  $\mu\text{M}$ ; 00  $p < 0.01$  vs. 400  $\mu\text{M}$ ; 000  $p < 0.001$  vs. 400  $\mu\text{M}$ )

Dado que cuando usábamos la solución de diálisis con una concentración de glutamato de 400  $\mu\text{M}$ , la concentración de glutamato restante en el dializado seguía siendo mayor que la concentración máxima obtenida tras la isquemia en plasma, podíamos inferir, que el glutamato plasmático no pasaría a la solución de diálisis por gradiente de concentración y por tanto el glutamato no se eliminaría de la sangre. Esto,

unido a la no reducción de la lesión isquémica, nos permitía colegir que la eliminación de glutamato es la responsable de la reducción del porcentaje de hemisferio infartado.

La necesidad de introducir en el dializado una concentración de glutamato mucho más elevada que la concentración plasmática máxima inducida por la isquemia, para eliminar el gradiente sangre-cavidad peritoneal, sugiere que parte del glutamato introducido era retirado o metabolizado en la cavidad peritoneal. Para determinar si esta captura/metabolismo de glutamato en la cavidad peritoneal era debida a factores derivados de la isquemia realizamos este mismo experimento en animales sanos. Cuando analizamos el dializado de la solución enriquecida con  $400 \mu\text{M}$  de glutamato en animales sanos a los que se les había aplicado DP, encontramos que la concentración de glutamato en la solución también se había reducido drásticamente tanto después del primer ciclo de DP ( $222.3 \pm 16 \mu\text{M}$ ,  $n=4$ ,  $p<0.001$ ) como del segundo ( $204.85 \pm 8 \mu\text{M}$ ,  $n=6$ ;  $p<0.01$ ) (Fig. 4.15). Estos datos sugieren que debe existir un metabolismo o transporte de glutamato en la cavidad peritoneal.

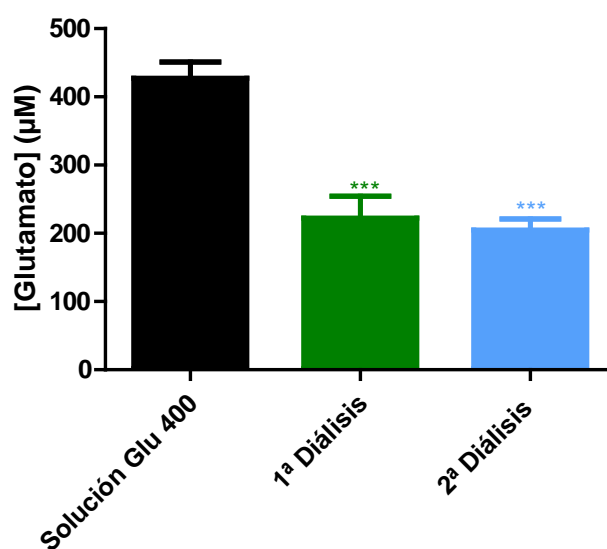


Figura 4.15. Concentración de glutamato en animales sanos tratados con DP con solución enriquecida con glutamato  $400\mu\text{M}$ . Se realizaron dos ciclos de DP recogiendo muestras de la solución antes de la DP y al finalizar cada ciclo.

## 4.2 Estudio de la ventana terapéutica de la diálisis peritoneal en el ictus experimental

Una vez que habíamos conseguido un tratamiento eficaz mediante DP para reducir el volumen de infarto en los animales isquémicos era necesario conocer durante cuánto tiempo podríamos aplicar este tratamiento de forma eficaz tras la oclusión de la

ACM. Con el fin de determinar la ventana temporal en la que la diálisis peritoneal es eficaz reduciendo el volumen de infarto producido por la MCAO, en una serie de experimentos aplicamos la diálisis peritoneal 5 horas después de la oclusión de la ACM.

Nuestros datos muestran que la diálisis peritoneal aplicada 5 horas después de la isquemia sigue siendo efectiva a la hora de reducir la lesión isquémica ( $15.0.3 \pm 1.22\%$ ,  $n=7$ ) en comparación con lo observado en los animales no tratados ( $23.27 \pm 1.35\%$ ,  $n=9$ ;  $p < 0.01$ ) (Fig. 4.16). No hemos encontrado diferencias significativas entre el porcentaje de hemisferio infartado en los animales dializados a las 2.5 horas después de la MCAO ( $12.17 \pm 1.75\%$ ,  $n=6$ ) y los animales dializados a las 5 horas. Por tanto, nuestros datos sugieren, que la ventana terapéutica podríamos ampliarla al menos hasta las 5 horas para el tratamiento neuroprotector con diálisis peritoneal en animales sometidos a isquemia cerebral experimental.

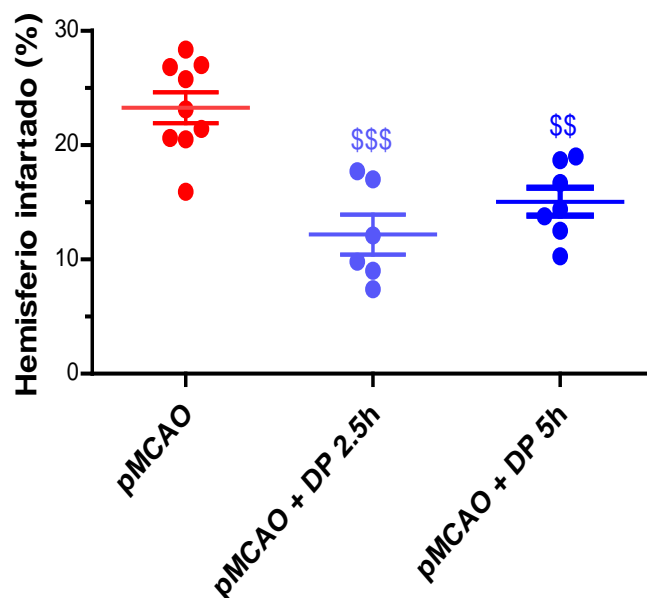
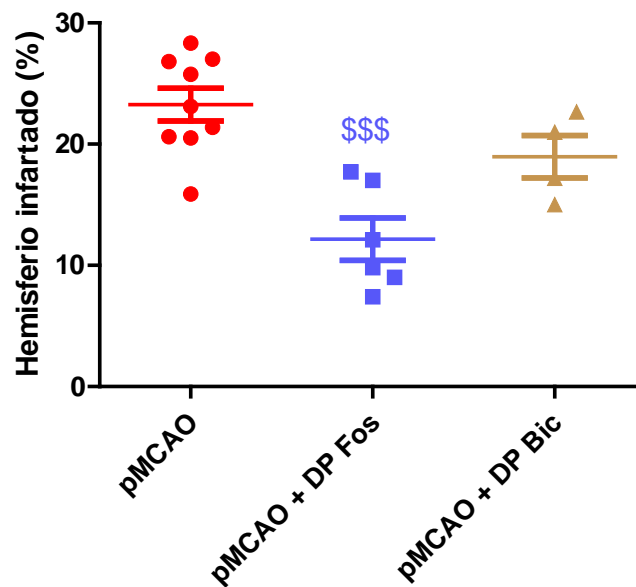


Figura 4.16. Efectividad del tratamiento con diálisis peritoneal hasta 5 horas después de la isquemia. Porcentaje de hemisferio infartado tanto en los animales tratados a 2.5 horas (pMCAO + DP 2.5h) como en los animales tratados a las 5 horas tras ictus (pMCAO + DP 5h). El porcentaje de hemisferio infartado se midió a las 24 horas de la isquemia, mediante la tinción de los cortes de cerebro con TTC. Los datos representan medias  $\pm$  SEM. ( $$$ p < 0.01$  vs. pMCAO)

### 4.3 Estudio de las diferentes soluciones de diálisis peritoneal en el ictus experimental

Todos los experimentos de diálisis peritoneal realizados hasta el momento usaban tampón fosfato. Sin embargo, en el ámbito hospitalario existen muchas soluciones con composiciones variadas según las necesidades de los pacientes. En la

actualidad el elemento tamponador mas utilizado es el bicarbonato, por lo que se hacía necesario comprobar si la elección del tampón era determinante para nuestros resultados. Para comprobar que el tampón utilizado era importante para el efecto neuroprotector de la diálisis peritoneal. La diálisis peritoneal se practicó 2.5 horas tras la oclusión de la ACM y realizando dos ciclos de diálisis completos (llenado-reposo-vaciado).tratando a los animales isquémicos con la solución de diálisis con fosfato o con la solución de diálisis con bicarbonato (glucosa, 8.3 mM, NaCl 140 mM, CaCl<sub>2</sub> 1.75 mM, MgCl<sub>2</sub> 0.5 mM, ácido láctico 15 mM, NaHCO<sub>3</sub> 25 mM; pH 6.5), Los resultados obtenidos mostraron que sólo la solución de diálisis que utilizaba fosfato como medio tamponador era capaz de reducir significativamente el volumen de la lesión, mientras que la solución que utilizaba tampón bicarbonato no tenía efecto significativo en la reducción del porcentaje de hemisferio infartado ( $18.96 \pm 1.75\%$ , n=4) (Fig. 4.17).

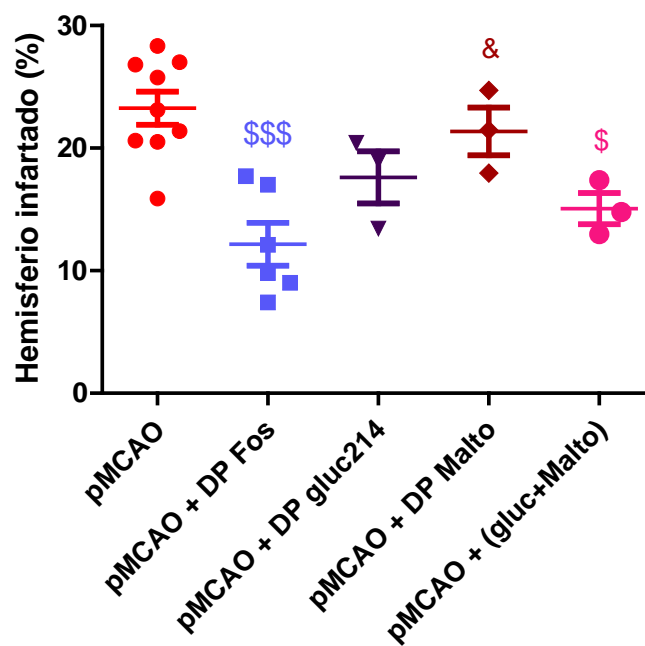


**Figura 4.17. Comparación del efecto protector de la solución con fosfato frente a la solución con bicarbonato.** A las 2.5 horas de la oclusión de la ACM, los animales fueron sometidos a diálisis peritoneal con solución fosfato (pMCAO + DP Fos) o con solución bicarbonato (pMCAO+ DP Bic) para comprobar el efecto neuroprotector de las diferentes composiciones. 24 horas tras la isquemia los animales fueron sacrificados y se evaluó el tamaño de la lesión mediante tinción de los cortes de cerebro con TTC. Los datos representan medias  $\pm$  SEM. (\$\$ p<0.01 vs. pMCAO)

Una vez que sabíamos que el tampón fosfato es necesario para el efecto neuroprotector de la diálisis peritoneal, queríamos conocer si la modificación de otros factores que afectan al transporte peritoneal, nos permitirían aumentar la eficacia de nuestro tratamiento. Para ello utilizamos varias soluciones con tampón fosfato, una solución con elevada osmolaridad, que se consiguió aumentando la concentración de glucosa hasta 214 mM, y dos soluciones en las que se sustituyó total o parcialmente la

glucosa por maltodextrina (molécula procedente de la hidrólisis del almidón del maíz), otro agente osmótico, a una concentración que alcanzaba una osmolaridad igual a la que obteníamos solo con glucosa. En todos los casos, la diálisis peritoneal se practicó 2.5 horas tras la oclusión de la ACM y realizando dos ciclos de diálisis completos (llenado-reposo-vaciado).

Cuando utilizamos la solución hiperosmótica (Gluc 214) o la solución con maltodextrina tampoco encontramos efecto neuroprotector ( $21.37 \pm 1.95\%$ ,  $n=3$ ;  $17.61 \pm 2.13\%$ ,  $n=3$ , respectivamente) (Fig. 4.18), aunque sí se observaba una diferencia significativa al utilizar la solución que solo contenía maltodextrina (sin glucosa) con respecto al grupo de diálisis peritoneal con fosfato (DP Fos), que sí contenía glucosa ( $21.37 \pm 1.95\%$ ,  $n=3$ ,  $p < 0.05$ ). Al utilizar la solución que contenía una mezcla de glucosa y maltodextrina, con la misma osmolaridad que la solución fosfato, volvíamos a encontrar neuroprotección que, aunque menor que en la solución solo con glucosa, presentaba diferencias significativas respecto al grupo pMCAO que no había sido tratado ( $15.06 \pm 1.28\%$ ,  $n=3$ ,  $p < 0.05$ ).



**Figura 4.18.** Comparación del efecto protector de la solución con fosfato frente a otras soluciones. A las 2.5 horas de la oclusión de la ACM, los animales fueron sometidos a diálisis peritoneal con diferentes soluciones (ver Material y Metodos) para comprobar el efecto neuroprotector de las diferentes composiciones. 24 horas tras la isquemia los animales fueron sacrificados y se evaluó el tamaño de la lesión mediante tinción de los cortes de cerebro con TTC. Los datos representan medias  $\pm$  SEM. (\$\$\$  $p < 0.001$  vs. pMCAO; &  $p < 0.05$  vs. pMCAO + DP Fos; \$  $p < 0.05$  vs. pMCAO)

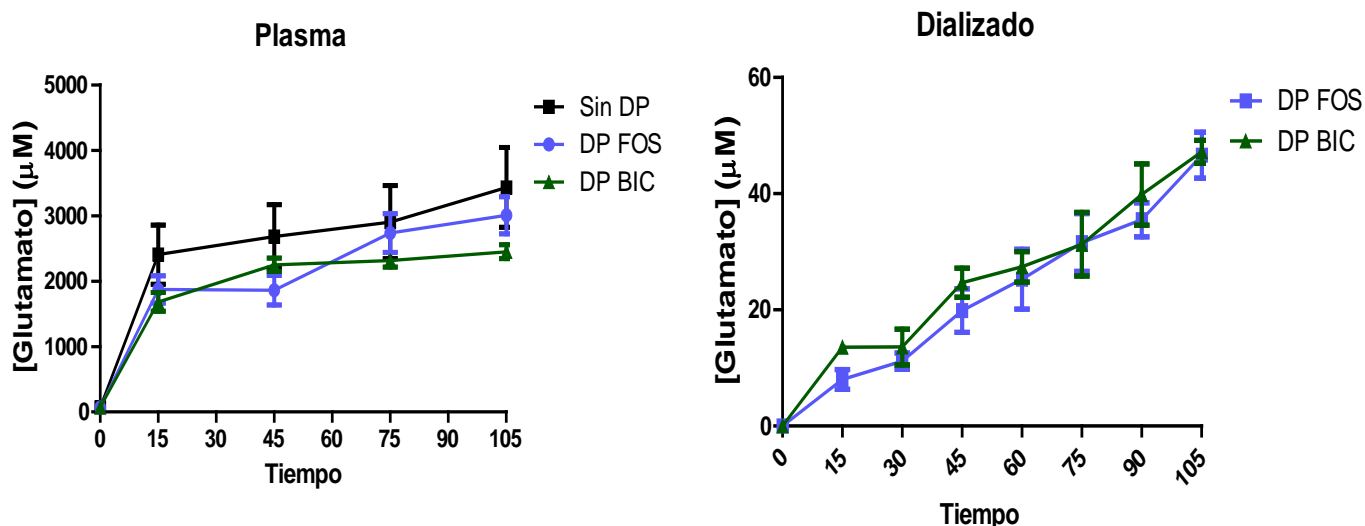
#### 4.4 Estudio del incremento de glutamato vía intravenosa en animales sanos

Con el fin de estudiar si los tampones fosfato/bicarbonato podían afectar de manera diferencial al transporte de glutamato entre la sangre y la cavidad peritoneal, elevamos el glutamato en sangre por infusión de glutamato en animales sanos y a continuación determinamos el glutamato plasmático y el glutamato que iba apareciendo en el líquido de diálisis en la cavidad peritoneal.

Para estos experimentos hemos infundido en sangre la solución de glutamato de manera continua para mantener los niveles plasmáticos del aminoácido elevados durante todo el proceso de diálisis y determinar la aparición de glutamato en el líquido de diálisis. Inicialmente trabajamos con la infusión de una solución de glutamato 625 mM, que producía incrementos sustanciales en la concentración plasmática de este aminoácido de hasta 3.4 mM ( $3432.6 \pm 610.76 \mu\text{M}$ ,  $n=5$ ) (Fig. 4.19). El curso temporal del aumento de glutamato en el líquido peritoneal se muestra en la Figura 4.19 y muestra que no hay diferencias entre los líquidos con tampón fosfato y los líquidos con tampón bicarbonato. La diálisis con la solución con tampón fosfato llegó a valores plasmáticos de  $3006.87 \pm 284.05 \mu\text{M}$  ( $n=5$ ), sin que se diferenciase de los niveles plasmáticos sin tratamiento. Lo mismo ocurría cuando aplicábamos la diálisis peritoneal con la solución con bicarbonato, con valores de  $2448.81 \pm 105.54 \mu\text{M}$  ( $n=5$ ). Al analizar la acumulación de glutamato en el líquido de diálisis encontramos valores similares en ambos tampones: de  $46.63 \pm 3.95 \mu\text{M}$  ( $n=5$ ) en el caso de la solución fosfato y de  $47.2 \pm 1.96 \mu\text{M}$  ( $n=5$ ) con la solución con bicarbonato (Fig.4.19).

Estos datos indican que se detecta en sangre mucho menos glutamato del que hemos infundido y sugieren que el tampón fosfato/bicarbonato no afecta al transporte del glutamato desde la sangre al peritoneo.

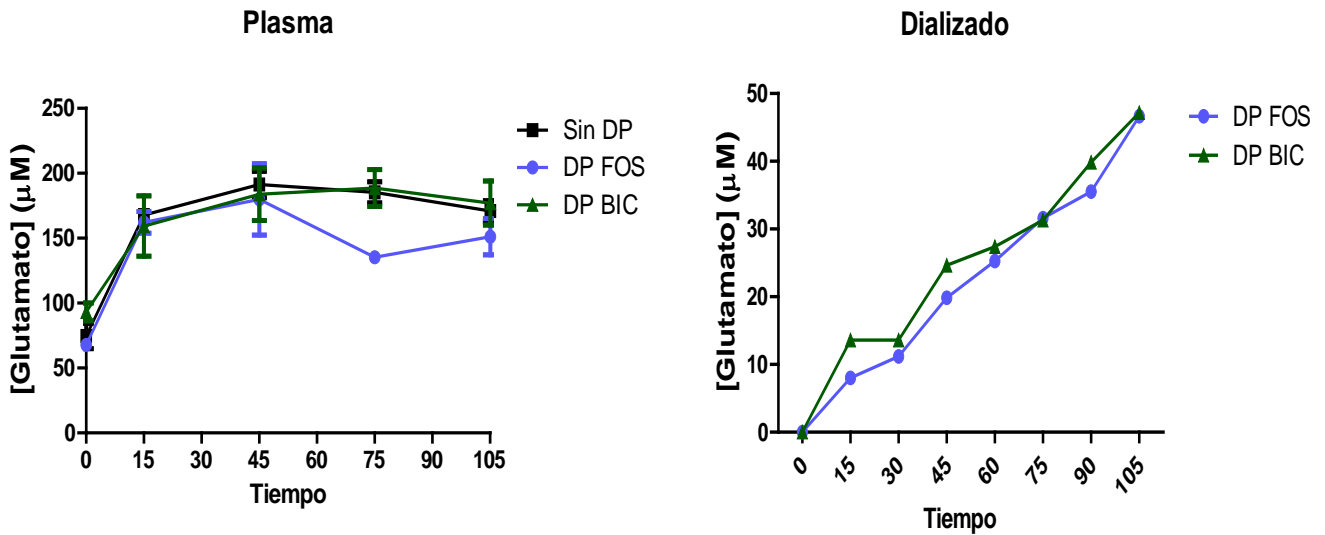
Los experimentos de perfusión continua de glutamato en sangre se realizaron también con una solución de glutamato más diluida (62.5 mM). Al aplicar la diálisis con la solución con fosfato la concentración plasmática de glutamato fue de  $151.12 \pm 13.97 \mu\text{M}$  ( $n=3$ ) y en el caso de la solución bicarbonato de  $177.04 \pm 16.97 \mu\text{M}$  ( $n=3$ ). El nivel de glutamato en el dializado en la solución fosfato era de  $46.63 \pm 3.95 \mu\text{M}$  ( $n=3$ ) y de  $47.20 \pm 1.96 \mu\text{M}$  ( $n=3$ ) cuando utilizamos la solución bicarbonato. Por tanto, no hay diferencias significativas entre el uso de la solución con tampón fosfato o bicarbonato ni en la concentración de glutamato en plasma ni en el dializado (Fig. 4.20).



**Figura 4.19. Tampón fosfato y tampón bicarbonato con glutamato plasmático sobrelevado.** En animales sanos (no isquémicos) y animales sanos sometidos a DP con las soluciones con fosfato y con bicarbonato se inyectó de forma continua una solución de glutamato 625 mM vía vena femoral, durante la duración del todo el experimento, para mantener elevada la concentración sanguínea de glutamato. 15 minutos después de comenzar la administración de glutamato intravenoso se midieron los niveles del aminoácido de plasma y en el dializado en animales sin tratamiento (Sin DP) y en los animales tratados con las dos soluciones de diálisis (DP FOS y DP BIC). La toma de muestras de plasma se realizó cada 30 minutos por la arteria femoral; el intervalo de tiempo entre muestras de dializado fue de 15 minutos. Los datos representan medias  $\pm$  SEM.

Por tanto, parece existir una saturación del transporte de glutamato desde sangre a peritoneo, porque elevaciones distintas de glutamato en plasma producen incrementos similares de glutamato en el líquido peritoneal.

Alternativamente, esto podría explicarse también por un metabolismo activo del glutamato en la cavidad peritoneal, como se ha observado (Fig. 4.14 y 4.15).



**Figura 4.20. Tampón fosfato y tampón bicarbonato con glutamato plasmático en niveles isquémicos.** En animales sanos (no isquémicos) y animales sanos sometidos a DP con las soluciones con fosfato y con bicarbonato se inyectó de forma continua una solución de glutamato 62.5 mM vía vena femoral, durante la duración del todo el experimento para mantener elevada la concentración sanguínea de glutamato. 15 minutos después de comenzar la administración de glutamato intravenoso se midieron los niveles plasmáticos y en el dializado del aminoácido en animales sin tratamiento (Sin DP) y en los animales tratados con las dos soluciones de diálisis (DP FOS y DP BIC). La toma de muestras de plasma se realizó cada 30 minutos a partir de la arteria femoral; el intervalo de tiempo entre muestras de dializado fue de 15 minutos. Los datos representan medias  $\pm$  SEM.

#### 4.5 Estudio de la diálisis peritoneal en pacientes

Para completar el estudio, en colaboración con el Hospital Universitario “La Princesa”, se midieron la concentración de glutamato en suero y en el dializado peritoneal de pacientes sometidos a diálisis peritoneal por insuficiencia renal.

Para demostrar que la diálisis peritoneal promueve también el aclaramiento del glutamato de la sangre en humanos analizamos la concentración de glutamato sérico en pacientes, antes y después de la diálisis. Una sesión clínica de diálisis peritoneal reduce los niveles de glutamato en suero de pacientes con enfermedad renal crónica grave (Fig. 4.21A). Las concentraciones de glutamato en suero que se obtuvieron fueron  $109.2 \pm 17.6 \mu\text{M}$  y  $63.6 \pm 10.7 \mu\text{M}$ , ( $n=7$ ;  $p<0.05$ ) antes y después de la sesión de diálisis, respectivamente. Como esperábamos, el glutamato se acumula rápidamente en el dializado ( $58.0 \pm 19.5 \mu\text{M}$ ,  $n=7$ , después de 4 h de diálisis; Fig.4.21B), lo que indica que tras una sesión de diálisis de 4 horas se alcanza el equilibrio entre el glutamato de la cavidad peritoneal y el glutamato sanguíneo.

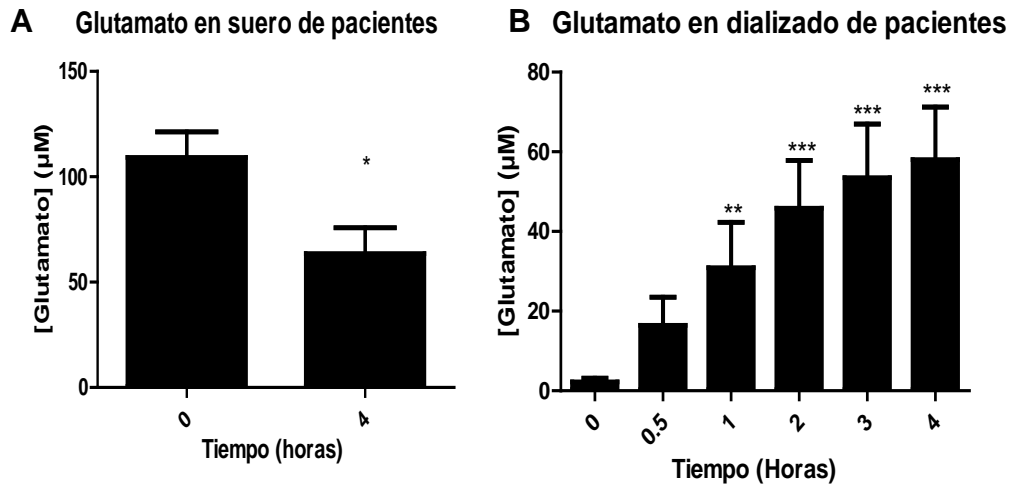


Figure 4.21. La diálisis peritoneal reduce los niveles de glutamato en suero en pacientes con enfermedad renal crónica grave. La figura A muestra la concentración de glutamato en pacientes antes y después de una sesión de 4 horas de diálisis peritoneal. B. Perfil de acumulación de glutamato en el dializado. Los datos representan medias  $\pm$  SEM. (\* $p < 0.05$  vs. 0; \*\* $P < 0.01$  vs. 0; \*\*\*  $P < 0.001$  vs. 0)

# *DISCUSIÓN*



## 5.- DISCUSIÓN

Los intentos para encontrar un tratamiento neuroprotector efectivo para la isquemia han fracasado hasta el momento. Los resultados mostrados en esta Tesis doctoral, indican que la diálisis peritoneal es efectiva no sólo para reducir el glutámico plasmático y el volumen de infarto en animales isquémicos, sino también para obtener una mejora funcional en estos animales, mejora que ha sido confirmada tanto con resonancia magnética funcional como con test neurológicos. Esta correlación confirma nuestra hipótesis de que la reducción del daño cerebral que proporciona la diálisis peritoneal se debe a la reducción de glutamato plasmático y a un incremento del gradiente de glutamato entre el cerebro y la sangre acelerándose así la salida de glutamato del espacio intersticial cerebral.

### ISQUEMIA CEREBRAL Y EXCITOTOXICIDAD POR GLUTAMATO

Tras la isquemia cerebral, el fallo energético ocasionado por la reducción del flujo sanguíneo cerebral, con la consiguiente reducción del aporte de oxígeno y glucosa al cerebro, produce la despolarización de la membrana plasmática y, como consecuencia, la apertura de algunos canales de  $\text{Ca}^{2+}$  voltaje-dependientes y el desbloqueo de algunos canales dependientes de receptor que participan en la despolarización de la membrana (para revisión, ver Pulsinelli, 1992). El aumento de la concentración intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  induce la liberación excitotóxica de glutamato al espacio extracelular, además de inhibir la producción de energía, activar numerosas enzimas e inhibir la síntesis de proteínas, produciendo daño celular (Kristian y Siesjo, 1998). El aumento de la concentración extracelular de glutamato se ve además incrementado por el fallo e incluso la reversión de los sistemas transportadores de este neurotransmisor como consecuencia de la alteración de los gradientes iónicos transmembrana (para revisión, ver Moro et al., 2005).

La elevación de glutamato en el espacio extracelular produce a su vez la estimulación continuada de los receptores de glutamato con la consiguiente entrada de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$  en las células, lo que desemboca en una mayor despolarización de la membrana y mayor liberación de glutamato así como la producción de edema y expresión de diversas enzimas que finalmente conducen a la muerte celular (Choi, 1988).

Sin embargo, los fenómenos celulares que se desencadenan tras la liberación de glutamato son complejos y además continuamente se describen nuevas rutas bioquímicas

de la cascada excitotóxica del glutamato de manera que el uso de agonistas/antagonistas/inhibidores/activadores de las distintas etapas de la cascada isquémica podrían ser, al menos inicialmente, beneficiosos para resolver el daño causado por la isquemia.

El hecho de que el **glutamato** sea el principal efector de la **excitotoxicidad** hace pensar que bloquear la cascada isquémica en algún punto puede conducir a la neuroprotección del tejido, al interrumpir los procesos que ocurren en etapas posteriores evitando así el efecto excitotóxico. En base a esta idea se han realizado estudios en animales y en humanos que han demostrado la relación existente entre los niveles elevados de glutamato extracelular y el déficit neurológico en el ictus (Castillo et al., 1996). Sin embargo, aunque muchos estudios experimentales en animales han demostrado los beneficios de actuar sobre el glutamato, bien usando antagonistas de los receptores, inhibiendo su liberación al espacio extracelular, retirando el glutamato liberado o con el uso de otros tratamientos en los que el glutamato está involucrado de forma directa o indirecta, hasta hoy ninguno ha tenido éxito en clínica (O'Collins et al., 2011) (ver introducción).

Son muchas las razones que podrían explicar el fracaso de los ensayos clínicos (De Keyser et al., 1999; Alonso de Lecinana et al., 2001; Wahlgren y Ahmed, 2004). Entre las que más se discuten se encuentra el hecho de que la investigación preclínica se basa en gran medida en el uso de animales jóvenes con infartos bien definidos y localizados a los que se les administran los fármacos en cortas ventanas terapéuticas. Es conocido que estas condiciones que no reflejan la situación clínica, ya que bien los fármacos se emplean en dosis elevadas, o que los animales no les causa daño, pero que podrían resultar dañinas en la aplicación clínica. Existen también diferencias anatómicas y fisiológicas que presentan los animales en comparación con los humanos. En relación con esto, se ha sometido a debate la inclusión en los diferentes ensayos clínicos de pacientes de edad avanzada con múltiples factores de riesgo cardiovascular y tamaño de infarto y localización distinta, a los que se les aplica el fármaco en una ventana terapéutica muy variable y en la mayoría de los casos tardía, superior a las 6 horas, y en dosis inferiores a las utilizadas en animales, para así evitar la aparición de efectos secundarios (Martinez-Vila y Irimia, 2005; Weinberger, 2006; Ginsberg, 2008).

Otra razón que podría explicar las diferencias entre los resultados experimentales con animales y los obtenidos en la clínica podría estar en la complejidad de la cascada isquémica, de forma que es difícil actuar en una única ruta metabólica sin

que esto afecte a otros procesos. Además, hay que tener en cuenta que el efecto neuroprotector debería ser localizado y ejercerse solo en la región de la penumbra isquémica; sin embargo, los tratamientos que afectan a algún punto de la cascada excitotóxica no son capaces de discriminar la región sobre la que queremos actuar, y pueden estar afectando a otras regiones del cerebro o incluso de otros tejidos, por lo que, si bien el efecto del tratamiento en el tejido de penumbra podría estar teniendo un efecto beneficioso *a priori*, el efecto del mismo sobre tejido sano podría desencadenar en efectos secundarios o contrarios al efecto deseado, con la consiguiente pérdida de eficacia o el abandono del ensayo por producir efectos indeseables. Pese a todo ello, se siguen depositando grandes esperanzas en la búsqueda de nuevas terapias neuroprotectoras.

En este sentido, es conocido que la diálisis peritoneal promueve la salida de un gran número de sustancias desde la sangre al líquido de diálisis a través de la membrana peritoneal (Gokal, 2002; Johansson y Brown, 2009). Por ello, el objetivo de esta Tesis doctoral ha sido utilizar la diálisis peritoneal para eliminar el exceso de glutamato del espacio intersticial cerebral tras la isquemia con el fin de bloquear la cascada excitotóxica que éste desencadena. Dado que la elevación de la concentración de glutamato extracelular es el desencadenante de la cascada isquémica que produce el daño celular, al eliminar el elemento desencadenante evitamos que se desarrollen los procesos que desembocan en daño celular. Ello podría proporcionar una clara ventaja frente a otras estrategias experimentales que intervendrían en puntos posteriores, más terminales, de la cascada isquémica, y que sólo podrían reducir el daño parcialmente al no modificar procesos anteriores de dicha cascada, ni otras rutas desencadenadas por la misma y que podrían participar en los mecanismos de daño.

El glutamato es el principal neurotransmisor en el cerebro y la compartimentación de este neurotransmisor es un fenómeno bien conocido. La concentración extracelular de glutamato en condiciones normales se mantiene en valores inferiores a  $1 \mu\text{M}$  ya que, de lo contrario, podría producirse la activación tónica de los receptores del tipo NMDA que son los que tienen mayor afinidad por el glutamato. La concentración intracelular de glutamato es mucho más elevada, oscilando entre 5-10 mM, aunque puede alcanzar concentraciones muy superiores, de hasta 50-100 mM en las vesículas presinápticas (Nicholls, 1993; Teichberg et al., 2009). El glutamato en el cerebro se encuentra tanto en las neuronas como en las células gliales, aunque la concentración neuronal es mayor debido a la síntesis de glutamina por la

glutamina sintetasa que se localiza exclusivamente en los astrocitos (Norenberg y Martinez-Hernandez, 1979).

Durante la transmisión sináptica, la elevación de glutamato en la hendidura sináptica se limita a unos milisegundos, ya que el aminoácido es recaptado por transportadores de glutamato localizados en las membranas de astrocitos y neuronas (Shigeri et al., 2004). Mediante esta recaptación se limita el tiempo que el glutamato permanece en la hendidura sináptica y por tanto el tiempo que los receptores están activados, permitiendo el funcionamiento correcto de la sinapsis y evitando los efectos tóxicos que pueden llegar a derivarse de la sobreexcitación.

La concentración de todos los aminoácidos en el líquido cefalorraquídeo, con excepción de glutamina, es aproximadamente un 10% o menor de las concentraciones plasmáticas, lo que indica que los aminoácidos salen del cerebro en contra de un gradiente de concentración. La presencia de transportadores de glutamato dependientes de  $\text{Na}^+$  en la membrana abluminal y de un transporte de glutamato facilitado en la membrana luminal proporciona un mecanismo para explicar por qué el glutamato sale del parénquima cerebral a sangre en contra de un gradiente de concentración. Los transportadores de glutamato  $\text{Na}^+$ -dependientes de la membrana abluminal incrementan la concentración intracelular de glutamato en las células endoteliales. Por tanto, la concentración intracelular de glutamato en la célula endotelial proviene principalmente de la recaptación de éste del espacio intersticial y de la transformación de glutamina por la glutaminasa. La ausencia de transporte facilitado en la membrana abluminal evita el paso de glutamato desde la célula endotelial al espacio intersticial. Cuando la concentración de glutamato intracelular de la célula endotelial supera la concentración en plasma, el aminoácido es transportado mediante un sistema  $\text{Na}^+$ -independiente de transporte facilitado desde el lado luminal a la sangre (Hawkins et al., 2006a; Teichberg et al., 2009). De esta manera, el glutamato sale del tejido intersticial cerebral a la sangre a favor de un gradiente de concentración. Esta salida de glutamato desde el cerebro a la sangre fue demostrada en 2003 por Gottlieb y cols., quienes observaron este transporte mediante una inyección de glutamato marcado en el cerebro. Este desplazamiento de glutamato además ocurría en un periodo de tiempo relativamente corto (menos de 40 minutos), por lo que ya se planteaba como una posible terapia neuroprotectora (Gottlieb et al., 2003).

Tras la isquemia, se produce también una reversión de los transportadores de glutamato presentes en las membranas de los astrocitos y de las neuronas que ocasiona

una salida masiva del aminoácido al espacio extracelular (Chen y Swanson, 2003), de forma que se acumula en este y puede producir, si no se elimina a tiempo, muerte celular. Los astrocitos no tienen capacidad para afrontar este incremento masivo de glutamato en la matriz extracelular, por lo que en estas condiciones cobra importancia el transporte de glutamato a través de la célula endotelial que remueven parte de este glutamato hacia el interior de la célula y posteriormente, debido al gradiente creado, el aminoácido pase a la sangre (Hawkins et al., 2006a; Teichberg et al., 2009).

Esta salida de glutamato a sangre es responsable del incremento de la concentración plasmática de glutamato tras un ictus, como se ha descrito tanto en humanos como en animales de experimentación. Además, los niveles encontrados en sangre son mayores y más prolongados en los pacientes con peor pronóstico (pacientes con infartos malignos). Por tanto, existe una relación directa entre los niveles sanguíneos de glutamato y la gravedad del episodio isquémico (Castillo et al., 1996; Castillo et al., 1997; Dávalos et al., 1997; Aliprandi et al., 2005).

El hecho de que la recaptación de glutamato se encuentre reducida en la isquemia cerebral (Chen y Swanson, 2003), unido a la salida masiva del aminoácido al espacio extracelular, hace que el glutamato difunda hacia la periferia. De esta manera, la difusión de glutamato desde el *core* hacia la penumbra es un mecanismo que extiende el daño cerebral al tejido sano. El glutamato despolariza las células de la penumbra, altera la homeostasis iónica, causa acidosis y aumenta la demanda de energía y la salida al espacio extracelular de más neurotransmisor. Por tanto, el glutamato es responsable directo del incremento del tamaño de la zona de infarto o, dicho de otro modo, de la evolución del tejido desde el estado comprometido de la penumbra hacia tejido muerto (Hossmann, 1996; Lu et al., 2005).

## DIÁLISIS PERITONEAL e ISQUEMIA CEREBRAL

Como hemos visto, la diálisis peritoneales un tratamiento aplicado a los enfermos renales crónicos que tiene como objetivo la depuración de la sangre de todas las sustancias que no pueden ser eliminadas por el riñón. En la diálisis peritoneal se eliminan las sustancias capaces de atravesar la membrana peritoneal y este trasiego está dirigido por la diferencia de concentración existente entre la sangre y la solución de diálisis. Este gradiente favorable conduce el paso de estas sustancias desde la sangre hacia la solución introducida en la cavidad peritoneal (Khanna et al., 2009a).

Teniendo en cuenta este hecho, la **diálisis peritoneal** podría ser útil como **neuroprotector** para eliminar glutamato de la sangre y, de esta forma, al disminuir la concentración de glutamato en sangre, aumentar la salida del aminoácido desde el cerebro, movimiento que estaría favorecido por el aumento del gradiente sangre-cerebro (Hawkins et al., 2006a; Teichberg et al., 2009). Por tanto, la diálisis peritoneal, aplicada tras los primeros síntomas de un ictus, sería un método eficaz para acelerar la salida del exceso de glutamato del espacio intersticial a la sangre y así prevenir el daño que aparece en las horas siguientes al ictus debido a la difusión de glutamato a tejido sano. La diálisis peritoneal podría ser eficaz para prevenir la evolución de la penumbra a tejido muerto y de esta manera reducir el tamaño de la lesión.

Rogachev y cols., propusieron a la diálisis peritoneal y a la hemodiálisis como posibles terapias neuroprotectoras al observar con ambas técnicas una reducción de los niveles de glutamato en sangre, aunque en estos estudios no correlacionaron este parámetro con la mejora en ninguna patología cerebral. A pesar de observar una reducción del aminoácido usando ambas técnicas dialíticas, recomendaban como futura técnica neuroprotectora la diálisis peritoneal, ya que en ésta no es necesario el uso de heparina y por tanto no se afectaría la estabilidad hemodinámica de pacientes críticos, que podría interferir e incluso agravar algunas enfermedades cerebrales, como el ictus isquémico y sobre todo el hemorrágico (Rogachev et al., 2012; Rogachev et al., 2013).

Como estrategia alternativa y apoyando también nuestros resultados se ha descrito la utilización de oxalacetato en el tratamiento de distintas lesiones cerebrales, comprobándose que el desplazamiento del equilibrio de la glutamato-oxalacetato transaminasa sanguínea con la adición del cetoácido lleva a la disminución de la concentración del glutamato plasmático. Este procedimiento proporciona neuroprotección en modelos animales de traumatismo craneal (Nagy et al., 2009) y de isquemia cerebral focal (Campos et al., 2011). Sin embargo, en este tratamiento se han observado varios efectos secundarios debidos a la administración de oxalacetato, como es un aumento de la transmisión excitatoria cortical que se explicaría, no tanto por la disminución de glutamato, sino por un empobrecimiento del componente gabaérgico de la transmisión sináptica (Nagy et al., 2010).

Por tanto, nuestros resultados demuestran que la diálisis peritoneal es eficaz para reducir significativamente el volumen de infarto en un modelo experimental de ictus. Con estos resultados, podemos concluir que el **mecanismo de acción** por el que la **diálisis peritoneal** ejerce su efecto neuroprotector es que promueve la salida de glutamato

cerebral y con ello reduce la excitotoxicidad debida a este aminoácido. Probablemente, el efecto neuroprotector de la eliminación de glutamato esté relacionado con la disminución de la concentración de glutamato extracelular en la zona de penumbra isquémica impidiendo que se inicie la cascada excitotóxica del aminoácido y por tanto los procesos bioquímicos asociados a dicha cascada isquémica y a la evolución de la penumbra (Choi y Rothman, 1990).

Para probar que la disminución de la concentración de glutamato plasmático producida por la diálisis es la base de la reducción del daño celular asociado a la isquemia cerebral, realizamos experimentos en los que se añadió glutamato al líquido de diálisis antes de introducirlo en la cavidad peritoneal. El razonamiento que seguimos fue que el incremento de la concentración de glutamato en el líquido de diálisis debe reducir/anular el gradiente de concentración sangre/líquido peritoneal y por tanto, atenuar/anular la llegada de glutamato desde la sangre a la cavidad peritoneal. Sin embargo, cuando se añadió glutamato 200  $\mu\text{M}$  a la solución de diálisis, una concentración que *a priori* podría parecer suficiente para evitar el gradiente de glutamato entre la sangre y el líquido de diálisis, no se obtuvo el resultado esperado ya que la diálisis parecía seguir funcionando. El episodio isquémico no incrementó la concentración plasmática de glutamato y la diálisis peritoneal redujo el volumen de tejido infartado. No obstante, al doblar la concentración de glutamato en la solución de diálisis, hasta 400  $\mu\text{M}$ , sí conseguimos anular el gradiente sangre-dializado lo que se tradujo en la ausencia total de efecto neuroprotector. Estos resultados demostraban que la neuroprotección era debida a la retirada de glutamato de la sangre. El análisis del dializado con 400  $\mu\text{M}$  de glutamato, tras el proceso de diálisis, mostró valores de concentración de glutamato mucho menores que la concentración inicial, lo que confirma la existencia de mecanismos para la captura y/o metabolismo de glutamato. Esto podría explicar porqué la solución peritoneal con 200 $\mu\text{M}$  de glutamato no anula el gradiente sangre/cavidad peritoneal a pesar de que el pico de glutamato en sangre tras la isquemia se sitúa, como mucho, en estos valores.

Además del transporte/metabolismo de glutamato en la cavidad peritoneal, el sistema sanguíneo y/o los órganos periféricos ejercen un control homeostático que atenúa la elevación de la concentración de glutamato producida por el episodio isquémico. Esto lo observamos en animales sanos (no sometidos a isquemia) a los que se les introdujo glutamato vía intravenosa. En este caso la concentración de glutamato encontrada en sangre fue siempre mucho menor que la que cabía esperar. Esta capacidad homeostática del sistema sanguíneo/órganos periféricos se manifiesta también

en el hecho de que hay un porcentaje de hemisferio infartado que no produce elevación alguna de glutamato en sangre. Ello sugiere que el animal posee capacidad para controlar, al menos dentro de unos límites, la elevación de glutamato que se produce inicialmente como resultado del evento isquémico.

Hemos considerado *a priori* que dos pueden ser los principales órganos responsables de la reducción de glutamato en el dializado, por presentar una elevada actividad metabólica sobre el glutamato y por presentar transportadores específicos para éste: el riñón y el hígado.

El hígado es el principal órgano involucrado en la homeostasis de aminoácidos y proteínas. Además de la gran actividad metabólica, en las células hepáticas se ha descrito la existencia de transportadores de glutamato del tipo EAAT-2 y EAAT-4 (Ballatori et al., 1986; Utsunomiya-Tate et al., 1997; Jean et al., 2001; Kim et al., 2003), lo que implica que este órgano tiene un papel importante en la captación de glutamato. Se ha demostrado que, en determinadas condiciones, las células hepáticas pueden incrementar la capacidad para retirar glutamato de la sangre (Low et al., 1992). Teniendo en cuenta la versatilidad que puede presentar el hígado para modular la permeabilidad de glutamato al interior de sus células, parece ser un buen candidato para ser responsable de la retirada de glutamato.

Más aún, el hígado juega un papel importante en el control de aminoácidos en el plasma (Schimassek y Gerok, 1965) y juega un papel central en el metabolismo del glutamato, originando metabolitos que se redistribuyen en el músculo esquelético y en el intestino. Esta capacidad del hígado para metabolizar y distribuir el glutamato a distintos tejidos, ha sido sugerida también como una posible diana para obtener una terapia neuroprotectora (Klin et al., 2010). De hecho, ya se ha tenido en cuenta la actividad metabólica del hígado como partícipe de terapia neuroprotectora, ya que este órgano es el responsable de la liberación a la sangre de la glutamato-oxalacetato transaminasa (GOT) y la glutamato-piruvato transaminasa (GPT) que, en presencia de co-sustratos, transforman el glutamato en 2-cetoglutarato (Gottlieb et al., 2003; Nagy et al., 2009; Campos et al., 2011; 2012; 2013; 2014; Pérez-Mato et al., 2014).

Como decíamos, otro órgano a considerar es el riñón. Teniendo en cuenta el exceso de líquido que se acumula en la cavidad peritoneal, es lógico pensar que el riñón presente mayor actividad filtradora, sobre todo teniendo en cuenta que nuestro estudio ha sido realizado en animales sanos. Se ha observado que en el riñón existen

transportadores de glutamato del tipo EAAT-3 (Shayakul et al., 1997), lo que podría contribuir a la reducción de los niveles de glutamato en el dializado.

Se ha demostrado que estos transportadores de glutamato están presentes en el borde ciliado y en las membranas basolaterales del túbulo proximal en el riñón para mantener una concentración intracelular elevada de glutamato (Sacktor et al., 1981). Estudios con inmunohistoquímica e hibridación *in situ* han demostrado que los transportadores EAAT-3 se expresan principalmente en la membrana apical del túbulo proximal, concretamente en las regiones S2 y S3, aunque también se ha detectado más débilmente en la región S1 (Shayakul et al., 1997).

Se ha sugerido, que la función renal remanente en pacientes que reciben tanto diálisis peritoneal como hemodiálisis juega un papel importante en la eliminación de solutos de pequeño tamaño (Stompor et al., 2003; Termorshuizen et al., 2004). Teniendo en cuenta la presencia de transportadores de glutamato en el riñón, es muy probable que este órgano participe en la reducción de glutamato en las soluciones enriquecidas con glutamato. Además, como comentamos anteriormente, hay que tener en cuenta que en nuestro trabajo hemos utilizado animales sanos, que conservan plenamente su función renal, por lo que el transporte de solutos debe ser más eficaz que en pacientes con enfermedad renal.

A nivel renal, la acidosis intracelular existente en las células del túbulo proximal acelera el flujo de glutamato a través de la glutamato deshidrogenasa (GDH) (Nissim, 1999), disminuyendo la concentración intracelular de glutamato y produciendo  $\alpha$ -KG, que a su vez puede entrar el ciclo de los ácidos tricarboxílicos. La GDH es la principal vía por la que el riñón metaboliza el glutamato, pero en nuestro estudio podría cobrar importancia el hecho de que las células del túbulo proximal también presentan la enzima glutamina sintetasa (GS), enzima que se encarga de la transformación de glutamato en glutamina. Esta actividad se considera fundamental en la eliminación de amonio del organismo (Janicki y Goldstein, 1969), pero también cumple un papel en la regulación del pH.

Aunque el hígado y el riñón parecen reunir las características para ser los principales órganos implicados en la retirada/transformación del glutamato del dializado, no podemos descartar que otros órganos que también posean transportadores específicos de glutamato y enzimas para su metabolismo puedan intervenir en estos procesos, como el músculo esquelético, el intestino y/o las células del sistema inmune (Rimaniol et al., 2001; Klin et al., 2010).

## VENTANA TERAPÉUTICA DE LA DIÁLISIS PERITONEAL EN EL ICTUS EXPERIMENTAL

Para elegir la **ventana terapéutica** más adecuada para aplicar la terapia dialítica a los animales isquémicos tuvimos en cuenta la curva de glutamato plasmático en los animales después de la isquemia. Dado que la concentración de glutamato plasmático aumentaba a partir de las 2.5 horas con valores máximos entre las 4.5 y las 5.5 horas de la oclusión de la ACM, tomamos la determinación de aplicar la diálisis peritoneal al comienzo de la elevación del aminoácido en la sangre, de forma que pudiésemos retirar lo más temprano posible el glutamato plasmático y así evitar el que el glutamato llegase a los niveles máximos.

En nuestro modelo de isquemia cerebral focal en ratas sometidas a diálisis peritoneal 2.5 horas después del inicio del evento isquémico, hemos encontrado que la diálisis peritoneal previene la elevación de glutamato plasmático inducida por el episodio isquémico. Además, observamos que la diálisis peritoneal reduce el porcentaje de hemisferio infartado en un 40% en comparación con los animales que no fueron tratados y que esta disminución del tamaño de la lesión isquémica se correlacionaba con la disminución de glutamato plasmático.

Para ampliar la ventana terapéutica de un posible tratamiento con diálisis peritoneal retrasamos la aplicación de la diálisis hasta 5 horas después del episodio isquémico ya que, según nuestro modelo, a este tiempo aún obteníamos muestras plasmáticas de glutamato lo suficientemente elevadas para generar un gradiente de concentración, que permitía seguir retirando el aminoácido de la sangre. Nuestros resultados demuestran que la diálisis peritoneal es efectiva como terapia neuroprotectora en animales hasta al menos 5 horas tras la oclusión de la ACM, lo que abre una puerta a ser un tratamiento que pueda ser usado en aquellos pacientes que no sean candidatos para la aplicación del tratamiento convencional con t-PA por haber superado el tiempo de la ventana terapéutica, e incluso podría ser utilizado como tratamiento combinado con este.

Por último, los **datos con pacientes** muestran que el aumento de los niveles de glutamato en plasma ocurre dentro de las 6 primeras horas desde el comienzo de los síntomas y llegan a detectarse niveles elevados incluso a los 15 días (Dávalos et al., 1997; Aliprandi et al., 2005), lo que nos permitiría tener una ventana de tratamiento mucho más amplia que la observada en animales y, por supuesto, mayor que la actualmente

aprobada para la terapia trombolítica (3-4,5 horas). No obstante pensamos que la diálisis peritoneal sería tanto más efectiva cuanto más temprano se aplicase para, de esta forma, poder salvar mayor cantidad de tejido en penumbra. Se ha relacionado en humanos los niveles de glutamato durante las primeras 24 horas tras la isquemia con el tamaño de la lesión y la mejora neurológica, siendo de peor pronóstico aquellos pacientes que presentan mayores niveles durante este periodo, por lo que es de suma importancia actuar sobre el glutamato para minimizar sus efectos excitotóxicos (Leibowitz et al., 2012).

## COMPOSICION DE LA SOLUCIÓN DE DIÁLISIS PERITONEAL

A pesar de que existen varias soluciones comerciales según las condiciones y necesidades del paciente, actualmente la gran mayoría de las soluciones utilizan el tampón bicarbonato o bicarbonato/lactato (Jörres et al., 1998; Feriani, 2000); sin embargo, los resultados de nuestro estudio se basan en el uso de una solución de diálisis que utiliza como elemento tamponador el fosfato. Además, nuestros resultados muestran cómo sólo se obtiene efecto neuroprotector cuando la solución de diálisis peritoneal contiene tampón fosfato, mientras que la solución con tampón bicarbonato no muestra diferencias con los animales no tratados, lo que sugiere que el anión fosfato juega un papel importante en el mecanismo subyacente al efecto neuroprotector producido por esta terapia.

En relación con este hecho, estudios comparativos en ratas sanas sometidas a diálisis peritoneal utilizando soluciones de diálisis con tampón bicarbonato o con PBS, muestran que las ratas dializadas con PBS tenían mayor respuesta inflamatoria en el peritoneo que los animales tratados con *Dianeal* (solución comercial de Baxter®, con bicarbonato), si bien, la capacidad de transporte de agua y solutos no variaba entre ambas soluciones (Wieczorowska-Tobis et al., 2001b; Wieczorowska-Tobis et al., 2001a). Una posibilidad es que esta mayor respuesta inflamatoria en las soluciones con fosfato pudiera causar una activación local de células como, por ejemplo, macrófagos peritoneales, que fueran capaces de participar en la eliminación del glutamato en el medio de forma adicional a su eliminación por la diálisis, si bien se requieren más estudios para comprobar esta hipótesis.

Por otra parte, se ha observado en el riñón de conejo que el fosfato inorgánico induce la formación de amonio lo que a su vez se ha relacionado con la eliminación de glutamato. La entrada de fosfato en la mitocondria de las células renales tendría un

papel doble, por un lado podría estimular la glutaminasa dependiente de fosfato que deamina la glutamina produciendo glutamato y amonio, pero por otro lado podría interactuar con los canales que transportan el malato al exterior de la mitocondria, aumentando la salida de este metabolito e incrementando de este modo el metabolismo del glutamato en el ciclo de Krebs (Yu et al., 1976). Por tanto, esta relación entre el fosfato y la eliminación de glutamato del riñón podría ser una posible explicación de porqué la solución con fosfato como medio tamponador tiene mayor efecto neuroprotector frente a la solución con tampón bicarbonato.

Hasta ahora hemos planteado que el efecto neuroprotector tenía que deberse principalmente a un efecto que se produjese a nivel peritoneal y tuviera como consecuencia la retirada de glutamato plasmático pero, a la vista de los resultados, cabe también la posibilidad de que el fosfato utilizado en la diálisis peritoneal tenga algún efecto en el transporte de glutamato desde el cerebro hasta la sangre en condiciones patológicas, cuando los niveles de glutamato en el espacio intersticial cerebral son elevados, y sea por este motivo por el que no encontramos diferencias en los niveles de glutamato plasmáticos cuando trabajamos con animales sanos.

A pesar de que el fosfato parece ser importante para salvar el tejido de la penumbra, no podemos excluir que el efecto del fosfato se deba en verdad a la ausencia de bicarbonato, es decir, que el bicarbonato o algún producto derivado de éste sea el responsable de que no se produzca el efecto neuroprotector de la diálisis.

Por último, no podemos descartar que otros factores –ya comentados previamente- contribuyan al efecto neuroprotector producido por la diálisis peritoneal. De especial interés es la capacidad que tiene la diálisis peritoneal para eliminar citocinas proinflamatorias (Dittrich et al., 2004), que podría a su vez promover la salida de citocinas del tejido cerebral y, por tanto, evitarla acción deletérea de éstas en la región infartada.

## MÉTODOS DE EVALUACIÓN DE LA EFICACIA NEUROPROTECTORA DE LA DIÁLISIS PERITONEAL

Los **síntomas neurológicos** después de un episodio cerebrovascular son una de las principales fuentes que informan a los neurólogos sobre el tipo de lesión cerebral, la región y las posibles secuelas del paciente (Goldstein y Samsa, 1997; Derex et al., 2002; Nedeltchev et al., 2005). Del mismo modo, después de una isquemia cerebral, los

animales sufren disfunciones neurológicas, que pueden ser medidas con el fin de evaluar la gravedad o el progreso de la lesión isquémica y, también, la eficacia y la fiabilidad de cualquier tratamiento. Se han diseñado un gran número de pruebas o escalas para medir este deterioro, pero no todas ellas son adecuadas para ser utilizadas en todos los modelos de isquemia ni en todos los estudios.

Además de las dificultades que ya hemos señalado para la traslación de un tratamiento a la clínica, un problema adicional de muchos estudios experimentales es la falta de evaluación funcional a largo plazo, parámetro que va a determinar la efectividad de cualquier tratamiento en ensayos clínicos. Por lo tanto, conocer el resultado funcional después de la isquemia focal se hace cada vez más necesario con el fin de poder trasladar a la clínica las estrategias terapéuticas ensayadas en modelos animales (Corbett y Nurse, 1998; Hunter et al., 2000). Otro de los problemas añadidos es que los animales suelen mostrar una recuperación espontánea después de un episodio isquémico del mismo modo que se ha observado en humanos después de un ictus. Este es el caso por ejemplo de la resolución del edema cerebral que afecta a la zona del infarto y sus alrededores (Lo, 1986), lo que hace que muchos test neurológicos pierdan sensibilidad a la hora de evaluar la funcionalidad a largo plazo. De ahí, la necesidad de diseñar métodos válidos para evaluar la capacidad funcional tras la isquemia.

En este sentido, la resonancia magnética funcional (fMRI) tiene sus principios en el uso de la hemoglobina como agente de contraste, debido a la diferencia magnética que poseen la oxihemoglobina y la desoxihemoglobina, de forma que lo que en realidad evalúa es la demanda metabólica de oxígeno por parte del tejido analizado. Esta demanda de oxígeno afectará por tanto a varios factores hemodinámicos, principalmente el flujo sanguíneo cerebral, el volumen de sangre y, por supuesto, el nivel de oxigenación de la sangre. La demanda de oxígeno por parte del cerebro en condiciones normales se corresponde principalmente con la actividad neuronal (Wishart et al., 2002).

Varios estudios han utilizado la fMRI junto con tests neurológicos para evaluar el progreso de la lesión isquémica. De entre los test utilizados, los más frecuentes son los tests que evalúan la función motora de los animales, dado que muchos de los modelos experimentales utilizados afectan principalmente a la corteza cerebral que controla esta función (Dijkhuizen et al., 2001; Weber et al., 2008; van Meer et al., 2010). En relación con esto, nuestro modelo de isquemia afecta a una región de la corteza motora, por lo que elegimos el test del cilindro que evalúa la asimetría en la funcionalidad de las

extremidades delanteras (Schallert et al., 2000). Este test, con sus variantes, ha sido muy empleado en diferentes modelos de isquemia cerebral (Markgraf et al., 1992; Bland et al., 2000; Schallert et al., 2000).

Con nuestros resultados –utilizando fMRI y test neurológicos- hemos confirmado que tras la aplicación de la diálisis peritoneal en animales isquémicos existe un menor deterioro de la función neurológica en estos animales a los 14 días tras la isquemia y esta menor pérdida de función neurológica se asocia con menor porcentaje de hemisferio infartado, es decir con mayor cantidad de tejido salvado, lo que demuestra que el tejido que hemos protegido, además mantiene su viabilidad funcional a más largo plazo.

## VENTAJAS Y LIMITACIONES DE LA DIÁLISIS PERITONEAL COMO ESTRATEGIA NEUROPROTECTORA

Nuestros resultados sugieren que la diálisis peritoneal podría ser un tratamiento sencillo y efectivo en pacientes de ictus. La diálisis peritoneal supera algunos de los inconvenientes asociados con los neuroprotectores farmacológicos que no han logrado producir efectos beneficiosos en ensayos clínicos. Primero, en lugar de estar dirigida a un único paso de la compleja cascada excitotóxica iniciada por el glutamato (Dirnagl et al., 1999; Moskowitz et al., 2010; Nagy et al., 2010), la diálisis peritoneal reduce la elevación del glutamato intersticial, evitando de este modo la excitotoxicidad alrededor del tejido dañado. En segundo lugar, los fármacos neuroprotectores generalmente no distinguen entre el tejido dañado y el sano. Sin embargo, la diálisis peritoneal elimina el glutamato intersticial principalmente de las áreas infartadas ya que son estas áreas las que contienen mayores gradientes de glutamato cerebro-sangre. En tercer lugar, la diálisis peritoneal sería aplicable tanto a ictus isquémicos como hemorrágicos, ya que la elevación del glutamato intersticial es una característica común de ambos (Qureshi et al., 2003). La rápida colocación del catéter (15-20 minutos), permitiría aplicar la diálisis peritoneal rápidamente una vez que se sospechase o se diagnosticase el ictus. Por último, otras enfermedades que cursan con aumento de glutamato cerebral, como son las convulsiones inducidas por glioma, la esquizofrenia, la enfermedad de Alzheimer entre otras (Medina-Ceja et al., 2007; Buckingham et al., 2011), también podrían beneficiarse de este enfoque.

Sin embargo, nuestro estudio presenta una serie de **limitaciones** que debemos seguir estudiando. A pesar de los beneficios que puede presentar la diálisis peritoneal, a la vista de los resultados, parece que solo sería efectiva ante lesiones isquémicas a partir

de cierta gravedad, que se manifestasen con elevaciones de glutamato en sangre que permitieran crear un gradiente sangre-dializado suficiente y de esta forma poder eliminar el glutamato cerebral.

Otro aspecto a tener en cuenta es que la capacidad de paso de glutamato de sangre a la cavidad peritoneal es limitada. Así en experimentos en los que hemos inyectado distintas cantidades de glutamato en sangre producen una acumulación de glutamato similar en el líquido peritoneal. Esto hace evidente la importancia de realizar varios ciclos de diálisis, renovando la solución en cada ciclo, o bien realizar la DP con ayuda de una cicladora.

Tampoco podemos olvidarnos de los muchos factores que hemos mencionado que pueden afectar para la traslación de un modelo experimental a la clínica, por lo que mientras no tengamos datos de un ensayo clínico hemos de ser cautos para afirmar que estos resultados puedan ser o no una solución efectiva para el tratamiento de pacientes.

Si bien sólo los ensayos clínicos, primero de seguridad y luego de eficacia, pueden mostrar el valor traslacional de la diálisis cerebral en el ictus, datos preliminares realizados en pacientes con insuficiencia renal indican que la diálisis peritoneal disminuye la concentración plasmática de glutamato después de una sesión de 4 horas de diálisis peritoneal y que la cantidad de glutamato acumulada en el dializado de estos pacientes es dependiente del tiempo, por lo que concluimos que la diálisis peritoneal es una técnica propicia para eliminar el glutamato de la sangre, tanto en modelos animales como en el humano. Nuestros resultados concuerdan con los resultados obtenidos por Rogachev y cols. (Rogachev et al., 2013), si bien nuestros datos van más allá al observar también que el aumento de glutamato en el dializado se corresponde con una reducción de glutamato plasmático.

Como fruto de los resultados presentados en esta tesis doctoral, en el Hospital Universitario La Princesa se está llevando a cabo un ensayo clínico de seguridad en fase IIa utilizando una solución de diálisis peritoneal con fosfato, con el objetivo de determinar si nuestros datos son extrapolables a pacientes con ictus.

En resumen, es evidente que el glutamato tiene un papel esencial en la respuesta isquémica y por tanto el control de sus niveles plasmáticos tiene un efecto beneficioso. La reducción de los niveles plasmáticos de glutamato por la aplicación de la diálisis

peritoneal produce una disminución del daño cerebral por una disminución de los niveles cerebrales de este neurotransmisor. Por tanto, la diálisis peritoneal aplicada a pacientes diagnosticados de ictus puede ser un tratamiento seguro y eficaz.

# *CONCLUSIONES*



## 6.- CONCLUSIONES

1. La diálisis peritoneal es una técnica eficaz para reducir los niveles de glutamato plasmático tanto a nivel experimental como clínico.
2. La eliminación de glutamato plasmático reduce tanto el tamaño de la lesión isquémica como los déficits neurológicos tras un ictus isquémico experimental.
3. Hemos demostrado la efectividad de la diálisis peritoneal como tratamiento neuroprotector, en dos modelos experimentales de isquemia cerebral focal.
4. El efecto neuroprotector de la reducción de glutamato mediante la diálisis peritoneal es efectivo, al menos, hasta las 5 horas tras una isquemia cerebral focal experimental en ratas.
5. La solución con tampón fosfato es la única solución que ha demostrado un efecto neuroprotector tras una isquemia cerebral experimental focal en rata.
6. Nuestros datos sugieren que el efecto neuroprotector de la diálisis peritoneal se produce, al menos en parte, por algún proceso dependiente de fosfato.



# *BIBLIOGRAFÍA*



## 7.- BIBLIOGRAFÍA

- (SEN) SEdN (2013) Informe de diálisis y trasplante 2012. In. Bilbao: Sociedad Española de Nefrología (SEN).
- Abu-Hijleh MF, Habbal OA, Moqattash ST (1995) The role of the diaphragm in lymphatic absorption from the peritoneal cavity. *J Anat* 186 ( Pt 3):453-467.
- Adams HP, Jr. et al. (2007) Guidelines for the early management of adults with ischemic stroke: a guideline from the American Heart Association/American Stroke Association Stroke Council, Clinical Cardiology Council, Cardiovascular Radiology and Intervention Council, and the Atherosclerotic Peripheral Vascular Disease and Quality of Care Outcomes in Research Interdisciplinary Working Groups: the American Academy of Neurology affirms the value of this guideline as an educational tool for neurologists. *Stroke* 38:1655-1711.
- Adibhatla R, Hatcher JF (2006) Phospholipase A2, reactive oxygen species, and lipid peroxidation in cerebral ischemia. *Free Radic Biol Med* 40:376-387.
- Agnoli A, Fieschi C, Bozzao L, Battistini N, Prencipe M (1968) Autoregulation of Cerebral Blood Flow. *Circulation* 38:800-812.
- Aihara Y, Mashima H, Onda H, Hisano S, Kasuya H, Hori T, Yamada S, Tomura H, Yamada Y, Inoue I, Kojima I, Takeda J (2000) Molecular cloning of a novel brain-type Na(+)-dependent inorganic phosphate cotransporter. *J Neurochem* 74:2622-2625.
- Akoh JA (2012) Peritoneal dialysis associated infections: An update on diagnosis and management. *World J Nephrol* 1:106-122.
- Al-Hwiesh AK (2014) Percutaneous versus laparoscopic placement of peritoneal dialysis catheters: simplicity and favorable outcome. *Saudi J Kidney Dis Transpl* 25:1194-1201.
- Al-Mubarak B, Soriano FX, Hardingham GE (2009) Synaptic NMDAR activity suppresses FOXO1 expression via a cis-acting FOXO binding site: FOXO1 is a FOXO target gene. *Channels (Austin)* 3:233-238.
- Aliprandi A, Longoni M, Stanzani L, Tremolizzo L, Vaccaro M, Begni B, Galimberti G, Garofolo R, Ferrarese C (2005) Increased plasma glutamate in stroke patients might be linked to altered platelet release and uptake. *J Cereb Blood Flow Metab* 25:513-519.
- Alonso de Lecinana M, Díez-Tejedor E, Carceller F, Roda JM (2001) Cerebral ischemia: from animal studies to clinical practice. Should the methods be reviewed? *Cerebrovasc Dis* 11 Suppl 1:20-30.
- Amarenco P, Labreuche J, Lavallée P, Touboul PJ (2004) Statins in stroke prevention and carotid atherosclerosis: systematic review and up-to-date meta-analysis. *Stroke* 35:2902-2909.
- Arboix A, Alvarez-Sabín J, Soler L (1998) [Stroke. Classification and diagnostic criteria. Ad hoc Editorial Committee of the Task Force on Cerebrovascular Diseases of SEN]. *Neurología* 13 Suppl 3:3-10.
- Arboix A, Díaz J, Pérez-Sempere A, Álvarez Sabin J (2006) Ictus: Tipos etiológicos y criterios diagnósticos. In: Guías oficiales de la Sociedad Española de Neurología. Guía para el diagnóstico y tratamiento del ictus., 1ª Edition (E. DT, ed), pp 1-23. España: Sociedad Española de Neurología.
- Arduan AO (2009) 8 - Sistemas y soluciones de diálisis peritoneal. In: Tratado de diálisis peritoneal (Montenegro J, Correa-Rotter R, Riella MC, eds), pp 149-164. Barcelona: Elsevier España.

- Arrieta J, Bajo MA, Caravaca F, Coronel F, García-Pérez H, González-Parra E, Granado A, Martín-Govantes J, Miguel A, Molina A, Montenegro J, Pérez-Bañasco V, Pérez-Fontán M, Remón-Rodríguez C, Rodríguez-Palomares JR, Ruiz C, Sánchez-Moreno A, Vega N, *Nefrología SEd* (2006) [Guidelines of the Spanish Society of Nephrology. Clinical practice guidelines for peritoneal dialysis]. *Nefrología* 26 Suppl 4:1-184.
- Arriza JL, Eliasof S, Kavanaugh MP, Amara SG (1997) Excitatory amino acid transporter 5, a retinal glutamate transporter coupled to a chloride conductance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:4155-4160.
- Astrup J, Symon L, Branston NM, Lassen NA (1977) Cortical evoked potential and extracellular K<sup>+</sup> and H<sup>+</sup> at critical levels of brain ischemia. *Stroke* 8:51-57.
- Attwell D (2000) Brain uptake of glutamate: food for thought. *J Nutr* 130:1023S-1025S.
- Attwell D, Gibb A (2005) Neuroenergetics and the kinetic design of excitatory synapses. *Nat Rev Neurosci* 6:841-849.
- Bai L, Xu H, Collins JF, Ghishan FK (2001) Molecular and functional analysis of a novel neuronal vesicular glutamate transporter. *J Biol Chem* 276:36764-36769.
- Bajo MA, del Peso G, Sanchez-Villanueva R, Castro MJ, Aroeira L, Selgas R (2008) [New peritoneal dialysis solutions and their combinations]. *Nefrología* 28 Suppl 6:59-66.
- Bak LK, Schousboe A, Sonnewald U, Waagepetersen HS (2006) Glucose is necessary to maintain neurotransmitter homeostasis during synaptic activity in cultured glutamatergic neurons. *J Cereb Blood Flow Metab* 26:1285-1297.
- Ballatori N, Moseley RH, Boyer JL (1986) Sodium gradient-dependent L-glutamate transport is localized to the canalicular domain of liver plasma membranes. Studies in rat liver sinusoidal and canalicular membrane vesicles. *J Biol Chem* 261:6216-6221.
- Beart PM, O'Shea RD (2007) Transporters for L-glutamate: an update on their molecular pharmacology and pathological involvement. *Br J Pharmacol* 150:5-17.
- Belayev L, Busto R, Zhao W, Clemens JA, Ginsberg MD (1997) Effect of delayed albumin hemodilution on infarction volume and brain edema after transient middle cerebral artery occlusion in rats. *J Neurosurg* 87:595-601.
- Belayev L, Zhao W, Pattany PM, Weaver RG, Huh PW, Lin B, Busto R, Ginsberg MD (1998) Diffusion-weighted magnetic resonance imaging confirms marked neuroprotective efficacy of albumin therapy in focal cerebral ischemia. *Stroke* 29:2587-2599.
- Bellocchio EE, Reimer RJ, Fremeau RT, Jr., Edwards RH (2000) Uptake of glutamate into synaptic vesicles by an inorganic phosphate transporter. *Science* 289:957-960.
- Bergles DE, Jahr CE (1997) Synaptic activation of glutamate transporters in hippocampal astrocytes. *Neuron* 19:1297-1308.
- Bergles DE, Diamond JS, Jahr CE (1999) Clearance of glutamate inside the synapse and beyond. *Curr Opin Neurobiol* 9:293-298.
- Bird MK, Lawrence AJ (2009) The promiscuous mGlu5 receptor--a range of partners for therapeutic possibilities? *Trends Pharmacol Sci* 30:617-623.
- Bland ST, Schallert T, Strong R, Aronowski J, Grotta JC, Feeney DM (2000) Early exclusive use of the affected forelimb after moderate transient focal ischemia in rats : functional and anatomic outcome. *Stroke* 31:1144-1152.
- Buckingham SC, Campbell SL, Haas BR, Montana V, Robel S, Ogunrinu T, Sontheimer H (2011) Glutamate release by primary brain tumors induces epileptic activity. *Nat Med* 17:1269-1274.
- Campos F, Sobrino T, Ramos-Cabrer P, Castillo J (2012) Oxaloacetate: a novel neuroprotective for acute ischemic stroke. *Int J Biochem Cell Biol* 44:262-265.

- Campos F, Sobrino T, Blanco M, Lopez-Arias E, Baluja A, Alvarez J, Castillo J (2014) Glutamate neurotoxicity is involved in the neurological damage in patients undergoing extracorporeal circulation. *Int J Cardiol* 172:481-483.
- Campos F, Sobrino T, Pérez-Mato M, Rodríguez-Osorio X, Leira R, Blanco M, Mirelman D, Castillo J (2013) Glutamate oxaloacetate transaminase: a new key in the dysregulation of glutamate in migraine patients. *Cephalalgia* 33:1148-1154.
- Campos F, Sobrino T, Ramos-Cabrer P, Argibay B, Agulla J, Pérez-Mato M, Rodríguez-González R, Brea D, Castillo J (2011) Neuroprotection by glutamate oxaloacetate transaminase in ischemic stroke: an experimental study. *J Cereb Blood Flow Metab* 31:1378-1386.
- Canals S, Beyerlein M, Murayama Y, Logothetis NK (2008) Electric stimulation fMRI of the perforant pathway to the rat hippocampus. *Magn Reson Imaging* 26:978-986.
- Canals S, Beyerlein M, Merkle H, Logothetis NK (2009) Functional MRI evidence for LTP-induced neural network reorganization. *Curr Biol* 19:398-403.
- Castellanos M, Sobrino T, Pedraza S, Moldes O, Pumar JM, Silva Y, Serena J, García-Gil M, Castillo J, Dávalos A (2008) High plasma glutamate concentrations are associated with infarct growth in acute ischemic stroke. *Neurology* 71:1862-1868.
- Castillo J, Leira R (2001) Predictors of deteriorating cerebral infarct: role of inflammatory mechanisms. Would its early treatment be useful? *Cerebrovasc Dis* 11 Suppl 1:40-48.
- Castillo J, Dávalos A, Noya M (1997) Progression of ischaemic stroke and excitotoxic aminoacids. *Lancet* 349:79-83.
- Castillo J, Dávalos A, Naveiro J, Noya M (1996) Neuroexcitatory amino acids and their relation to infarct size and neurological deficit in ischemic stroke. *Stroke* 27:1060-1065.
- Catalan MP, Santamaría B, Reyero A, Ortiz A, Egido J, Ortiz A (2005) 3,4-di-deoxyglucosone-3-ene promotes leukocyte apoptosis. *Kidney Int* 68:1303-1311.
- Coco S, Verderio C, Trotti D, Rothstein JD, Volterra A, Matteoli M (1997) Non-synaptic localization of the glutamate transporter EAAC1 in cultured hippocampal neurons. *Eur J Neurosci* 9:1902-1910.
- Corbett D, Nurse S (1998) The problem of assessing effective neuroprotection in experimental cerebral ischemia. *Prog Neurobiol* 54:531-548.
- Crabtree JH, Fishman A (1996) Laparoscopic epiploxy of the greater omentum and epiploic appendices in the salvaging of dysfunctional peritoneal dialysis catheters. *Surg Laparosc Endosc* 6:176-180.
- Curtis DR, Phillis JW, Watkins JC (1959) Chemical excitation of spinal neurones. *Nature* 183:611-612.
- Chen J, Zhang ZG, Li Y, Wang Y, Wang L, Jiang H, Zhang C, Lu M, Katakowski M, Feldkamp CS, Chopp M (2003) Statins induce angiogenesis, neurogenesis, and synaptogenesis after stroke. *Ann Neurol* 53:743-751.
- Chen ST, Hsu CY, Hogan EL, Maricq H, Balentine JD (1986) A model of focal ischemic stroke in the rat: reproducible extensive cortical infarction. *Stroke* 17:738-743.
- Chen W, Aoki C, Mahadomrongkul V, Gruber CE, Wang GJ, Blitzblau R, Irwin N, Rosenberg PA (2002) Expression of a variant form of the glutamate transporter GLT1 in neuronal cultures and in neurons and astrocytes in the rat brain. *J Neurosci* 22:2142-2152.
- Chen Y, Swanson RA (2003) Astrocytes and brain injury. *J Cereb Blood Flow Metab* 23:137-149.
- Choi DW (1988) Calcium-mediated neurotoxicity: relationship to specific channel types and role in ischemic damage. *Trends Neurosci* 11:465-469.
- Choi DW, Rothman SM (1990) The role of glutamate neurotoxicity in hypoxic-ischemic neuronal death. *Annu Rev Neurosci* 13:171-182.

- Daikhin Y, Yudkoff M (2000) Compartmentation of brain glutamate metabolism in neurons and glia. *J Nutr* 130:1026S-1031S.
- Danbolt NC (2001) Glutamate uptake. *Prog Neurobiol* 65:1-105.
- Davalos A, Castillo J, Alvarez-Sabin J, Secades JJ, Mercadal J, Lopez S, Cobo E, Warach S, Sherman D, Clark WM, Lozano R (2002) Oral citicoline in acute ischemic stroke: an individual patient data pooling analysis of clinical trials. *Stroke* 33:2850-2857.
- Dávalos A, Castillo J, Serena J, Noya M (1997) Duration of glutamate release after acute ischemic stroke. *Stroke* 28:708-710.
- Dávalos A, Castillo J, Marrugat J, Fernandez-Real JM, Armengou A, Cacabelos P, Rama R (2000) Body iron stores and early neurologic deterioration in acute cerebral infarction. *Neurology* 54:1568-1574.
- Dávalos A, Alvarez-Sabín J, Castillo J, Díez-Tejedor E, Ferro J, Martínez-Vila E, Serena J, Segura T, Cruz VT, Masjuan J, Cobo E, Secades JJ, investigators ICToast (2012) Citicoline in the treatment of acute ischaemic stroke: an international, randomised, multicentre, placebo-controlled study (ICTUS trial). *Lancet* 380:349-357.
- Davies SJ (2000) Peritoneal solute transport--we know it is important, but what is it? *Nephrol Dial Transplant* 15:1120-1123.
- Davis SM, Albers GW, Diener HC, Lees KR, Norris J (1997) Termination of Acute Stroke Studies Involving Selfotel Treatment. ASSIST Steering Committed. *Lancet* 349:32.
- Dawson VL, Dawson TM (1996) Free radicals and neuronal cell death. *Cell Death Differ* 3:71-78.
- De Cristóbal J, Moro MA, Dávalos A, Castillo J, Leza JC, Camarero J, Colado MI, Lorenzo P, Lizasoain I (2001) Neuroprotective effect of aspirin by inhibition of glutamate release after permanent focal cerebral ischaemia in rats. *J Neurochem* 79:456-459.
- De Deyn PP, Reuck JD, Deberdt W, Vlietinck R, Orgogozo JM (1997) Treatment of acute ischemic stroke with piracetam. Members of the Piracetam in Acute Stroke Study (PASS) Group. *Stroke* 28:2347-2352.
- De Keyser J, Sulter G, Luiten PG (1999) Clinical trials with neuroprotective drugs in acute ischaemic stroke: are we doing the right thing? *Trends Neurosci* 22:535-540.
- DeBello WM, O'Connor V, Dresbach T, Whiteheart SW, Wang SS, Schweizer FE, Betz H, Rothman JE, Augustine GJ (1995) SNAP-mediated protein-protein interactions essential for neurotransmitter release. *Nature* 373:626-630.
- Dereix L, Nighoghossian N, Hermier M, Adeleine P, Froment JC, Trouillas P (2002) Early detection of cerebral arterial occlusion on magnetic resonance angiography: predictive value of the baseline NIHSS score and impact on neurological outcome. *Cerebrovasc Dis* 13:225-229.
- Devuyst O, Rippe B (2013) Water transport across the peritoneal membrane. *Kidney Int*.
- Devuyst O, Rippe B (2014) Water transport across the peritoneal membrane. *Kidney Int* 85:750-758.
- Di Carlo A (2009) Human and economic burden of stroke. *Age Ageing* 38:4-5.
- Diaz-Buxo JA (1997) Peritoneal dialysis catheter malfunction due to compartmentalization. *Perit Dial Int* 17:209-210.
- Diaz-Buxo JA (2006) Complications of peritoneal dialysis catheters: early and late. *Int J Artif Organs* 29:50-58.
- Diaz-Buxo JA, Turner MW, Nelms M (1997) Fluoroscopic manipulation of Tenckhoff catheters: outcome analysis. *Clin Nephrol* 47:384-388.
- Díaz-Guzmán J, Egido-Herrero JA, Gabriel-Sánchez R, Barberà G, Fuentes B, Fernández-Pérez C, Abilleira S, Neurología PIdGdEdEcIdEd (2008) [Incidence of strokes in Spain. Methodological foundations of the Iberictus study]. *Rev Neurol* 47:617-623.

- Diener HC (1998) Multinational randomised controlled trial of lubeluzole in acute ischaemic stroke. European and Australian Lubeluzole Ischaemic Stroke Study Group. *Cerebrovasc Dis* 8:172-181.
- Diener HC, Hacke W, Hennerici M, Rådberg J, Hantson L, De Keyser J (1996) Lubeluzole in acute ischemic stroke. A double-blind, placebo-controlled phase II trial. Lubeluzole International Study Group. *Stroke* 27:76-81.
- Diener HC, Lees KR, Lyden P, Grotta J, Davalos A, Davis SM, Shuaib A, Ashwood T, Wasiewski W, Alderfer V, Hårdemark HG, Rodichok L, Investigators Slal (2008) NXY-059 for the treatment of acute stroke: pooled analysis of the SAINT I and II Trials. *Stroke* 39:1751-1758.
- Díez-Tejedor E, del Brutto O, Alvarez Sabín J, Muñoz M, Abiusi G, Cerebrovasculares SIdE (2001) [Classification of the cerebrovascular diseases. Iberoamerican Cerebrovascular diseases Society]. *Rev Neurol* 33:455-464.
- Dijkhuizen RM, Ren J, Mandeville JB, Wu O, Ozdag FM, Moskowitz MA, Rosen BR, Finklestein SP (2001) Functional magnetic resonance imaging of reorganization in rat brain after stroke. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:12766-12771.
- Dirnagl U, Iadecola C, Moskowitz MA (1999) Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. *Trends Neurosci* 22:391-397.
- Dittrich S, Aktuerk D, Seitz S, Mehwald P, Schulte-Monting J, Schlensak C, Kececioglu D (2004) Effects of ultrafiltration and peritoneal dialysis on proinflammatory cytokines during cardiopulmonary bypass surgery in newborns and infants. *Eur J Cardiothorac Surg* 25:935-940.
- Domercq M, Matute C (2004) Neuroprotection by tetracyclines. *Trends Pharmacol Sci* 25:609-612.
- Dringen R, Pfeiffer B, Hamprecht B (1999) Synthesis of the antioxidant glutathione in neurons: supply by astrocytes of CysGly as precursor for neuronal glutathione. *J Neurosci* 19:562-569.
- Ejaz AA, McShane AP, Gandhi VC, Leehey DJ, Ing TS (1995) Hypomagnesemia in continuous ambulatory peritoneal dialysis patients dialyzed with a low-magnesium peritoneal dialysis solution. *Perit Dial Int* 15:61-64.
- El Mestikawy S, Wallén-Mackenzie A, Fortin GM, Descarries L, Trudeau LE (2011) From glutamate co-release to vesicular synergy: vesicular glutamate transporters. *Nat Rev Neurosci* 12:204-216.
- Enlimomab Acute Stroke Trial I (2001) Use of anti-ICAM-1 therapy in ischemic stroke: results of the Enlimomab Acute Stroke Trial. *Neurology* 57:1428-1434.
- Erixon M, Linden T, Kjellstrand P, Carlsson O, Ernebrant M, Forsback G, Wieslander A, Jonsson JA (2004) PD fluids contain high concentrations of cytotoxic GDPs directly after sterilization. *Perit Dial Int* 24:392-398.
- Erixon M, Wieslander A, Linden T, Carlsson O, Forsback G, Svensson E, Jonsson JA, Kjellstrand P (2005) Take care in how you store your PD fluids: actual temperature determines the balance between reactive and non-reactive GDPs. *Perit Dial Int* 25:583-590.
- Erixon M, Wieslander A, Linden T, Carlsson O, Forsback G, Svensson E, Jonsson JA, Kjellstrand P (2006) How to avoid glucose degradation products in peritoneal dialysis fluids. *Perit Dial Int* 26:490-497.
- Feriani M (2000) Use of different buffers in peritoneal dialysis. *Semin Dial* 13:256-260.
- Flessner M (2006) Water-only pores and peritoneal dialysis. *Kidney Int* 69:1494-1495.
- Flessner MF (2005) The transport barrier in intraperitoneal therapy. *Am J Physiol Renal Physiol* 288:F433-442.
- Flessner MF (2008) Endothelial glycocalyx and the peritoneal barrier. *Perit Dial Int* 28:6-12.
- Flessner MF, Dedrick RL, Schultz JS (1984) A distributed model of peritoneal-plasma transport: theoretical considerations. *Am J Physiol* 246:R597-607.

- Flessner MF, Dedrick RL, Schultz JS (1985a) A distributed model of peritoneal-plasma transport: analysis of experimental data in the rat. *Am J Physiol* 248:F413-424.
- Flessner MF, Fenstermacher JD, Dedrick RL, Blasberg RG (1985b) A distributed model of peritoneal-plasma transport: tissue concentration gradients. *Am J Physiol* 248:F425-435.
- Folbergrová J, Minamisawa H, Ekholm A, Siesjö BK (1990) Phosphorylase alpha and labile metabolites during anoxia: correlation to membrane fluxes of K<sup>+</sup> and Ca<sup>2+</sup>. *J Neurochem* 55:1690-1696.
- Franke CL, Palm R, Dalby M, Schoonderwaldt HC, Hantson L, Eriksson B, Lang-Jenssen L, Smakman J (1996) Flunarizine in stroke treatment (FIST): a double-blind, placebo-controlled trial in Scandinavia and the Netherlands. *Acta Neurol Scand* 93:56-60.
- Fremeau RT, Jr., Troyer MD, Pahner I, Nygaard GO, Tran CH, Reimer RJ, Bellocchio EE, Fortin D, Storm-Mathisen J, Edwards RH (2001) The expression of vesicular glutamate transporters defines two classes of excitatory synapse. *Neuron* 31:247-260.
- Fremeau RT, Jr., Burman J, Qureshi T, Tran CH, Proctor J, Johnson J, Zhang H, Sulzer D, Copenhagen DR, Storm-Mathisen J, Reimer RJ, Chaudhry FA, Edwards RH (2002) The identification of vesicular glutamate transporter 3 suggests novel modes of signaling by glutamate. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:14488-14493.
- Fumagalli S, Perego C, Pischiutta F, Zanier ER, De Simoni MG (2015) The ischemic environment drives microglia and macrophage function. *Front Neurol* 6:81.
- Furuta A, Martin LJ, Lin CL, Dykes-Hoberg M, Rothstein JD (1997) Cellular and synaptic localization of the neuronal glutamate transporters excitatory amino acid transporter 3 and 4. *Neuroscience* 81:1031-1042.
- Gegelashvili G, Schousboe A (1997) High affinity glutamate transporters: regulation of expression and activity. *Mol Pharmacol* 52:6-15.
- George P, Watson C (2007) *The rat brain in stereotaxic coordinates* / George Paxinos, Charles Watson., 6th ed. Edition. Amsterdam Elsevier.
- Ginsberg MD (1995a) Review : Neuroprotection in Brain Ischemia: An Update (Part I). *The Neuroscientist* 1:95-103.
- Ginsberg MD (1995b) Review : Neuroprotection in Brain Ischemia: An Update (Part II). *The Neuroscientist* 1:164-175.
- Ginsberg MD (2008) Neuroprotection for ischemic stroke: past, present and future. *Neuropharmacology* 55:363-389.
- Ginsberg MD, Palesch YY, Hill MD, Martin RH, Moy CS, Barsan WG, Waldman BD, Tamariz D, Ryckborst KJ, Alias, Neurological Emergencies Treatment Trials I (2013) High-dose albumin treatment for acute ischaemic stroke (ALIAS) Part 2: a randomised, double-blind, phase 3, placebo-controlled trial. *Lancet Neurol* 12:1049-1058.
- Gokal R (2002) Peritoneal dialysis in the 21st century: an analysis of current problems and future developments. *J Am Soc Nephrol* 13 Suppl 1:S104-116.
- Goldstein GW, Betz AL (1986) The blood-brain barrier. *Sci Am* 255:74-83.
- Goldstein LB, Samsa GP (1997) Reliability of the National Institutes of Health Stroke Scale. Extension to non-neurologists in the context of a clinical trial. *Stroke* 28:307-310.
- Gotloib L (2009a) Functional structure of the peritoneum as a dialysis membrane. In: Nolph and Gokal's *Textbook of Peritoneal Dialysis*, 3rd edition Edition (Khanna R, Krediet RT, eds), pp 73-136. The Netherlands: Springer.
- Gotloib L (2009b) De la histología a la función: El peritoneo como membrana dializante y biológicamente activa. In: *Tratado de diálisis peritoneal (Montenegro J-R, Ricardo, Riella MC, eds)*, pp 29-49. Barcelona, Spain: Elsevier.

- Gottlieb M, Wang Y, Teichberg VI (2003) Blood-mediated scavenging of cerebrospinal fluid glutamate. *J Neurochem* 87:119-126.
- Gras C, Herzog E, Bellenchi GC, Bernard V, Ravassard P, Pohl M, Gasnier B, Giros B, El Mestikawy S (2002) A third vesicular glutamate transporter expressed by cholinergic and serotonergic neurons. *J Neurosci* 22:5442-5451.
- Green DR, Reed JC (1998) Mitochondria and apoptosis. *Science* 281:1309-1312.
- Gressens P, Spedding M, Gigler G, Kertesz S, Villa P, Medja F, Williamson T, Kapus G, Levay G, Szenasi G, Barkoczy J, Harsing LG (2005) The effects of AMPA receptor antagonists in models of stroke and neurodegeneration. *Eur J Pharmacol* 519:58-67.
- Grotta J (1997) Lubeluzole treatment of acute ischemic stroke. The US and Canadian Lubeluzole Ischemic Stroke Study Group. *Stroke* 28:2338-2346.
- Hacke W, Kaste M, Bluhmki E, Brozman M, Dávalos A, Guidetti D, Larrue V, Lees KR, Medeghri Z, Machnig T, Schneider D, von Kummer R, Wahlgren N, Toni D, Investigators E (2008) Thrombolysis with alteplase 3 to 4.5 hours after acute ischemic stroke. *N Engl J Med* 359:1317-1329.
- Hardingham GE (2006a) Pro-survival signalling from the NMDA receptor. *Biochem Soc Trans* 34:936-938.
- Hardingham GE (2006b) 2B synaptic or extrasynaptic determines signalling from the NMDA receptor. *J Physiol* 572:614-615.
- Hardingham GE, Bading H (2002) Coupling of extrasynaptic NMDA receptors to a CREB shut-off pathway is developmentally regulated. *Biochim Biophys Acta* 1600:148-153.
- Hardingham GE, Bading H (2010) Synaptic versus extrasynaptic NMDA receptor signalling: implications for neurodegenerative disorders. *Nat Rev Neurosci* 11:682-696.
- Hardingham GE, Fukunaga Y, Bading H (2002) Extrasynaptic NMDARs oppose synaptic NMDARs by triggering CREB shut-off and cell death pathways. *Nat Neurosci* 5:405-414.
- Hassel B, Dingledine R (2006) Glutamate. In: *Basic neurochemistry : molecular, cellular, and medical aspects* 7th ed. Edition (Siegel GJ, Albers RW, Brady ST, Price DL, eds), pp 267-271. Amsterdam ; Boston ; London: Elsevier.
- Haugeto O, Ullensvang K, Levy LM, Chaudhry FA, Honoré T, Nielsen M, Lehre KP, Danbolt NC (1996) Brain glutamate transporter proteins form homomultimers. *J Biol Chem* 271:27715-27722.
- Hawkins RA, O'Kane RL, Simpson IA, Viña JR (2006a) Structure of the blood-brain barrier and its role in the transport of amino acids. *J Nutr* 136:2185-2265.
- Hawkins RA, O'Kane RL, Simpson IA, Vina JR (2006b) Structure of the blood-brain barrier and its role in the transport of amino acids. *J Nutr* 136:2185-2265.
- Hertz L, Kala G (2007) Energy metabolism in brain cells: effects of elevated ammonia concentrations. *Metab Brain Dis* 22:199-218.
- Herzog E, Bellenchi GC, Gras C, Bernard V, Ravassard P, Bedet C, Gasnier B, Giros B, El Mestikawy S (2001) The existence of a second vesicular glutamate transporter specifies subpopulations of glutamatergic neurons. *J Neurosci* 21:RC181.
- Hillered L, Smith ML, Siesjö BK (1985) Lactic acidosis and recovery of mitochondrial function following forebrain ischemia in the rat. *J Cereb Blood Flow Metab* 5:259-266.
- Himmele R, Jensen L, Fenn D, Ho CH, Sawin DA, Diaz-Buxo JA (2012) A new neutral-pH low-GDP peritoneal dialysis fluid. *Perit Dial Int* 32:444-452.

- Hisano S, Haga H, Li Z, Tatsumi S, Miyamoto KI, Takeda E, Fukui Y (1997) Immunohistochemical and RT-PCR detection of Na<sup>+</sup>-dependent inorganic phosphate cotransporter (NaPi-2) in rat brain. *Brain Res* 772:149-155.
- Hollmann M, Heinemann S (1994) Cloned glutamate receptors. *Annu Rev Neurosci* 17:31-108.
- Hollmann M, Hartley M, Heinemann S (1991) Ca<sup>2+</sup> permeability of KA-AMPA-gated glutamate receptor channels depends on subunit composition. *Science* 252:851-853.
- Hollmann M, Maron C, Heinemann S (1994a) N-glycosylation site tagging suggests a three transmembrane domain topology for the glutamate receptor GluR1. *Neuron* 13:1331-1343.
- Hollmann M, Boulter J, Maron C, Heinemann S (1994b) Molecular biology of glutamate receptors. Potentiation of N-methyl-D-aspartate receptor splice variants by zinc. *Ren Physiol Biochem* 17:182-183.
- Horn J, de Haan RJ, Vermeulen M, Limburg M (2001) Very Early Nimodipine Use in Stroke (VENUS): a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Stroke* 32:461-465.
- Hossmann KA (1996) Periinfarct depolarizations. *Cerebrovasc Brain Metab Rev* 8:195-208.
- Huh PW, Belayev L, Zhao W, Busto R, Saul I, Ginsberg MD (1998) The effect of high-dose albumin therapy on local cerebral perfusion after transient focal cerebral ischemia in rats. *Brain Res* 804:105-113.
- Hunter AJ, Hatcher J, Virley D, Nelson P, Irving E, Hadingham SJ, Parsons AA (2000) Functional assessments in mice and rats after focal stroke. *Neuropharmacology* 39:806-816.
- Hurn PD, Koehler RC, Blizzard KK, Traystman RJ (1995) Deferoxamine reduces early metabolic failure associated with severe cerebral ischemic acidosis in dogs. *Stroke* 26:688-694; discussion 694-685.
- Hurtado O, Cardenas A, Pradillo JM, Morales JR, Ortego F, Sobrino T, Castillo J, Moro MA, Lizasoain I (2007) A chronic treatment with CDP-choline improves functional recovery and increases neuronal plasticity after experimental stroke. *Neurobiol Dis* 26:105-111.
- Hurtado O, Pradillo JM, Fernandez-Lopez D, Morales JR, Sobrino T, Castillo J, Alborch E, Moro MA, Lizasoain I (2008) Delayed post-ischemic administration of CDP-choline increases EAAT2 association to lipid rafts and affords neuroprotection in experimental stroke. *Neurobiol Dis* 29:123-131.
- Hurtado O, De Cristóbal J, Sánchez V, Lizasoain I, Cárdenas A, Pereira MP, Colado MI, Leza JC, Lorenzo P, Moro MA (2003) Inhibition of glutamate release by delaying ATP fall accounts for neuroprotective effects of antioxidants in experimental stroke. *FASEB J* 17:2082-2084.
- Hurtado O, Hernandez-Jimenez M, Zarruk JG, Cuartero MI, Ballesteros I, Camarero G, Moraga A, Pradillo JM, Moro MA, Lizasoain I (2013) Citicoline (CDP-choline) increases Sirtuin1 expression concomitant to neuroprotection in experimental stroke. *J Neurochem* 126:819-826.
- Hurtado O, Moro MA, Cardenas A, Sanchez V, Fernandez-Tome P, Leza JC, Lorenzo P, Secades JJ, Lozano R, Davalos A, Castillo J, Lizasoain I (2005) Neuroprotection afforded by prior citicoline administration in experimental brain ischemia: effects on glutamate transport. *Neurobiol Dis* 18:336-345.
- Hutchison AJ, Merchant M, Boulton HF, Hinchcliffe R, Gokal R (1993) Calcium and magnesium mass transfer in peritoneal dialysis patients using 1.25 mmol/L calcium, 0.25 mmol/L magnesium dialysis fluid. *Perit Dial Int* 13:219-223.

- Hwang SJ, Chang JM, Chen HC, Tsai MK, Tsai JC, Hsu CH, Hsiao PW, Tsai CY, Guh JY, Lai YH (1998) Smaller insertion angle of Tenckhoff catheter increases the chance of catheter migration in CAPD patients. *Perit Dial Int* 18:433-435.
- Ichinose T, Yu S, Wang XQ, Yu SP (2003) Ca<sup>2+</sup>-independent, but voltage- and activity-dependent regulation of the NMDA receptor outward K<sup>+</sup> current in mouse cortical neurons. *J Physiol* 551:403-417.
- Janicki RH, Goldstein L (1969) Glutamine synthetase and renal ammonia metabolism. *Am J Physiol* 216:1107-1110.
- Jean C, Rome S, Mathe V, Huneau JF, Aattouri N, Fromentin G, Achagiotis CL, Tome D (2001) Metabolic evidence for adaptation to a high protein diet in rats. *J Nutr* 131:91-98.
- Jensen BS (2002) BMS-204352: a potassium channel opener developed for the treatment of stroke. *CNS Drug Rev* 8:353-360.
- Johansson L, Brown EA (2009) Peritoneal dialysis. *Semin Dial* 22:27-29.
- Jörres A, Bender TO, Finn A, Witowski J, Fröhlich S, Gahl GM, Frei U, Keck H, Passlick-Deetjen J (1998) Biocompatibility and buffers: effect of bicarbonate-buffered peritoneal dialysis fluids on peritoneal cell function. *Kidney Int* 54:2184-2193.
- Justo P, Sanz AB, Egido J, Ortiz A (2005) 3,4-Dideoxyglucosone-3-ene induces apoptosis in renal tubular epithelial cells. *Diabetes* 54:2424-2429.
- Kanai Y, Hediger MA (2003) The glutamate and neutral amino acid transporter family: physiological and pharmacological implications. *Eur J Pharmacol* 479:237-247.
- Kanai Y, Nussberger S, Romero MF, Boron WF, Hebert SC, Hediger MA (1995) Electrogenic properties of the epithelial and neuronal high affinity glutamate transporter. *J Biol Chem* 270:16561-16568.
- Kaneko T, Fujiyama F, Hioki H (2002) Immunohistochemical localization of candidates for vesicular glutamate transporters in the rat brain. *J Comp Neurol* 444:39-62.
- Khanna R, Krediet R, Gotloib L (2009a) Functional Structure of the Peritoneum as a Dialyzing Membrane. In: Nolph and Gokal's Textbook of Peritoneal Dialysis, pp 73-135: Springer US.
- Khanna R, Krediet R, Feriani M, Krediet RT (2009b) New Peritoneal Dialysis Solutions and Solutions on the Horizon. In: Nolph and Gokal's Textbook of Peritoneal Dialysis, pp 283-301: Springer US.
- Kim DS, Kwak SE, Kim JE, Jung JY, Won MH, Choi SY, Kwon OS, Kang TC (2006) Transient ischaemia affects plasma membrane glutamate transporter, not vesicular glutamate transporter, expressions in the gerbil hippocampus. *Anat Histol Embryol* 35:265-270.
- Kim SY, Chao W, Choi SY, Volsky DJ (2003) Cloning and characterization of the 3'-untranslated region of the human excitatory amino acid transporter 2 transcript. *J Neurochem* 86:1458-1467.
- Klin Y, Zlotnik A, Boyko M, Ohayon S, Shapira Y, Teichberg VI (2010) Distribution of radiolabeled l-glutamate and d-aspartate from blood into peripheral tissues in naive rats: significance for brain neuroprotection. *Biochem Biophys Res Commun* 399:694-698.
- Kreutzberg GW (1996) Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *Trends Neurosci* 19:312-318.
- Kristian T, Siesjo BK (1998) Calcium in ischemic cell death. *Stroke* 29:705-718.
- le Poole CY, van Ittersum FJ, Valentijn RM, Teerlink T, Lindholm B, Ter Wee PM, Schalkwijk CG (2012) "NEPP" peritoneal dialysis regimen has beneficial effects on plasma CEL and 3-DG, but not pentosidine, CML, and MGO. *Perit Dial Int* 32:45-54.
- Lee JM, Zipfel GJ, Choi DW (1999) The changing landscape of ischaemic brain injury mechanisms. *Nature* 399:A7-14.

- Lee WJ, Hawkins RA, Viña JR, Peterson DR (1998) Glutamine transport by the blood-brain barrier: a possible mechanism for nitrogen removal. *Am J Physiol* 274:C1101-1107.
- Lees KR, Asplund K, Carolei A, Davis SM, Diener HC, Kaste M, Orgogozo JM, Whitehead J (2000) Glycine antagonist (gavestinel) in neuroprotection (GAIN International) in patients with acute stroke: a randomised controlled trial. GAIN International Investigators. *Lancet* 355:1949-1954.
- Lehre KP, Levy LM, Ottersen OP, Storm-Mathisen J, Danbolt NC (1995) Differential expression of two glial glutamate transporters in the rat brain: quantitative and immunocytochemical observations. *J Neurosci* 15:1835-1853.
- Leibowitz A, Boyko M, Shapira Y, Zlotnik A (2012) Blood glutamate scavenging: insight into neuroprotection. *Int J Mol Sci* 13:10041-10066.
- Leveille F, Papadia S, Fricker M, Bell KF, Soriano FX, Martel MA, Puddifoot C, Habel M, Wyllie DJ, Ikonomidou C, Tolkovsky AM, Hardingham GE (2010) Suppression of the intrinsic apoptosis pathway by synaptic activity. *J Neurosci* 30:2623-2635.
- Levy LM, Warr O, Attwell D (1998) Stoichiometry of the glial glutamate transporter GLT-1 expressed inducibly in a Chinese hamster ovary cell line selected for low endogenous Na<sup>+</sup>-dependent glutamate uptake. *J Neurosci* 18:9620-9628.
- Lewerenz J, Klein M, Methner A (2006) Cooperative action of glutamate transporters and cystine/glutamate antiporter system X<sub>c</sub><sup>-</sup> protects from oxidative glutamate toxicity. *J Neurochem* 98:916-925.
- Leygoldt JK (2002) Solute transport across the peritoneal membrane. *J Am Soc Nephrol* 13 Suppl 1:S84-91.
- Li JL, Xiong KH, Dong YL, Fujiyama F, Kaneko T, Mizuno N (2003) Vesicular glutamate transporters, VGluT1 and VGluT2, in the trigeminal ganglion neurons of the rat, with special reference to coexpression. *J Comp Neurol* 463:212-220.
- Lipscomb DC, Gorman LG, Traystman RJ, Hurn PD (1998) Low molecular weight iron in cerebral ischemic acidosis in vivo. *Stroke* 29:487-492; discussion 493.
- Liu TH, Beckman JS, Freeman BA, Hogan EL, Hsu CY (1989) Polyethylene glycol-conjugated superoxide dismutase and catalase reduce ischemic brain injury. *Am J Physiol* 256:H589-593.
- Lo EH (2008) A new penumbra: transitioning from injury into repair after stroke. *Nat Med* 14:497-500.
- Lo RC (1986) Recovery and rehabilitation after stroke. *Can Fam Physician* 32:1851-1853.
- Logothetis NK (2008) What we can do and what we cannot do with fMRI. *Nature* 453:869-878.
- Low SY, Taylor PM, Hundal HS, Pogson CI, Rennie MJ (1992) Transport of L-glutamine and L-glutamate across sinusoidal membranes of rat liver. Effects of starvation, diabetes and corticosteroid treatment. *Biochem J* 284 ( Pt 2):333-340.
- Lu XC, Williams AJ, Wagstaff JD, Tortella FC, Hartings JA (2005) Effects of delayed intrathecal infusion of an NMDA receptor antagonist on ischemic injury and peri-infarct depolarizations. *Brain Res* 1056:200-208.
- Macias Heras M (2005) Concepto de diálisis peritoneal, fisiología y anatomía. In: *Manual Práctico de Diálisis Peritoneal* (F C, J M, R S, O C, M T, eds). Badalona: Atrium Comunicación Estrategica S.L. %! Concepto de diálisis peritoneal, fisiología y anatomía.
- Machado LS, Sazonova IY, Kozak A, Wiley DC, El-Remessy AB, Ergul A, Hess DC, Waller JL, Fagan SC (2009) Minocycline and tissue-type plasminogen activator for stroke: assessment of interaction potential. *Stroke* 40:3028-3033.
- Magistretti PJ, Pellerin L, Martin JL, Bloom FE, Kupfer DJ (1995) Brain energy metabolism : an integrated cellular perspective. In, pp 657-670: Raven Press.
- Margetts PJ, Churchill DN (2002) Acquired ultrafiltration dysfunction in peritoneal dialysis patients. *J Am Soc Nephrol* 13:2787-2794.

- Mark LP, Prost RW, Ulmer JL, Smith MM, Daniels DL, Strottmann JM, Brown WD, Hachein-Bey L (2001) Pictorial review of glutamate excitotoxicity: fundamental concepts for neuroimaging. *AJNR Am J Neuroradiol* 22:1813-1824.
- Markgraf CG, Green EJ, Hurwitz BE, Morikawa E, Dietrich WD, McCabe PM, Ginsberg MD, Schneiderman N (1992) Sensorimotor and cognitive consequences of middle cerebral artery occlusion in rats. *Brain Res* 575:238-246.
- Marosi M, Fuzik J, Nagy D, Rakos G, Kis Z, Vecsei L, Toldi J, Ruban-Matuzani A, Teichberg VI, Farkas T (2009) Oxaloacetate restores the long-term potentiation impaired in rat hippocampus CA1 region by 2-vessel occlusion. *Eur J Pharmacol* 604:51-57.
- Martel MA, Wyllie DJ, Hardingham GE (2009) In developing hippocampal neurons, NR2B-containing N-methyl-D-aspartate receptors (NMDARs) can mediate signaling to neuronal survival and synaptic potentiation, as well as neuronal death. *Neuroscience* 158:334-343.
- Martin-Moutot N, Charvin N, Leveque C, Sato K, Nishiki T, Kozaki S, Takahashi M, Seagar M (1996) Interaction of SNARE complexes with P/Q-type calcium channels in rat cerebellar synaptosomes. *J Biol Chem* 271:6567-6570.
- Martinez-Vila E, Irimia P (2005) Challenges of neuroprotection and neurorestoration in ischemic stroke treatment. *Cerebrovasc Dis* 20 Suppl 2:148-158.
- Matthews G (1996) Neurotransmitter release. *Annu Rev Neurosci* 19:219-233.
- McCormick BB, Bargman JM (2007) Noninfectious complications of peritoneal dialysis: implications for patient and technique survival. *J Am Soc Nephrol* 18:3023-3025.
- McKenna MC (2007) The glutamate-glutamine cycle is not stoichiometric: fates of glutamate in brain. *J Neurosci Res* 85:3347-3358.
- Medina-Ceja L, Guerrero-Cazares H, Canales-Aguirre A, Morales-Villagran A, Feria-Velasco A (2007) [Structural and functional characteristics of glutamate transporters: how they are related to epilepsy and oxidative stress]. *Rev Neurol* 45:341-352.
- Medrano Alberto MJ, Boix Martínez R, Cerrato Crespán E, Ramírez Santa-Pau M (2006) [Incidence and prevalence of ischaemic heart disease and cerebrovascular disease in Spain: a systematic review of the literature]. *Rev Esp Salud Publica* 80:5-15.
- Miller RJ (1998) Presynaptic receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 38:201-227.
- Minami T, Matsumura S, Okuda-Ashitaka E, Shimamoto K, Sakimura K, Mishina M, Mori H, Ito S (2001) Characterization of the glutamatergic system for induction and maintenance of allodynia. *Brain Res* 895:178-185.
- Mohr JP, Orgogozo JM, Harrison MJG, Hennerici M, Wahlgren NG, Gelmers JH, Martinez-Vila E, Dycka J, Tettenborn D (1994) Meta-Analysis of Oral Nimodipine Trials in Acute Ischemic Stroke. *Cerebrovasc Dis* 4:197-203.
- Monaghan DT, Bridges RJ, Cotman CW (1989) The excitatory amino acid receptors: their classes, pharmacology, and distinct properties in the function of the central nervous system. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 29:365-402.
- Monaghan DT, Olverman HJ, Nguyen L, Watkins JC, Cotman CW (1988) Two classes of N-methyl-D-aspartate recognition sites: differential distribution and differential regulation by glycine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85:9836-9840.
- Moriondo A, Grimaldi A, Sciacca L, Guidali ML, Marcozzi C, Negrini D (2007) Regional recruitment of rat diaphragmatic lymphatics in response to increased pleural or peritoneal fluid load. *J Physiol* 579:835-847.
- Moro MA, Almeida A, Bolanos JP, Lizasoain I (2005) Mitochondrial respiratory chain and free radical generation in stroke. *Free Radic Biol Med* 39:1291-1304.
- Moskowitz MA, Lo EH, Iadecola C (2010) The science of stroke: mechanisms in search of treatments. *Neuron* 67:181-198.

- Muir KW, Lees KR, Ford I, Davis S, Investigators IMESIS (2004) Magnesium for acute stroke (Intravenous Magnesium Efficacy in Stroke trial): randomised controlled trial. *Lancet* 363:439-445.
- Mukherjee D, Patil CG (2011) Epidemiology and the global burden of stroke. *World Neurosurg* 76:585-90.
- Murthy VN, De Camilli P (2003) Cell biology of the presynaptic terminal. *Annu Rev Neurosci* 26:701-728.
- Nagao S, Kwak S, Kanazawa I (1997) EAAT4, a glutamate transporter with properties of a chloride channel, is predominantly localized in Purkinje cell dendrites, and forms parasagittal compartments in rat cerebellum. *Neuroscience* 78:929-933.
- Nagy D, Marosi M, Kis Z, Farkas T, Rakos G, Vecsei L, Teichberg VI, Toldi J (2009) Oxaloacetate decreases the infarct size and attenuates the reduction in evoked responses after photothrombotic focal ischemia in the rat cortex. *Cell Mol Neurobiol* 29:827-835.
- Nagy D, Knapp L, Marosi M, Farkas T, Kis Z, Vecsei L, Teichberg VI, Toldi J (2010) Effects of blood glutamate scavenging on cortical evoked potentials. *Cell Mol Neurobiol* 30:1101-1106.
- Nakamichi N, Takarada T, Yoneda Y (2009) Neurogenesis mediated by gamma-aminobutyric acid and glutamate signaling. *J Pharmacol Sci* 110:133-149.
- Nakayama T, Kawakami H, Tanaka K, Nakamura S (1996) Expression of three glutamate transporter subtype mRNAs in human brain regions and peripheral tissues. *Brain Res Mol Brain Res* 36:189-192.
- Navarro JF, Mora C, Macia M, Garcia J (1999) Serum magnesium concentration is an independent predictor of parathyroid hormone levels in peritoneal dialysis patients. *Perit Dial Int* 19:455-461.
- Nedeltchev K, der Maur TA, Georgiadis D, Arnold M, Caso V, Mattle HP, Schroth G, Remonda L, Sturzenegger M, Fischer U, Baumgartner RW (2005) Ischaemic stroke in young adults: predictors of outcome and recurrence. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 76:191-195.
- Neumar RW, DeGracia DJ, Konkoly LL, Khoury JI, White BC, Krause GS (1998) Calpain mediates eukaryotic initiation factor 4G degradation during global brain ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 18:876-881.
- Ní Chróinín D et al. (2013) Statin therapy and outcome after ischemic stroke: systematic review and meta-analysis of observational studies and randomized trials. *Stroke* 44:448-456.
- Nicoll RA, Malenka RC, Kauer JA (1990) Functional comparison of neurotransmitter receptor subtypes in mammalian central nervous system. *Physiol Rev* 70:513-565.
- Nicholls D, Attwell D (1990) The release and uptake of excitatory amino acids. *Trends Pharmacol Sci* 11:462-468.
- Nicholls DG (1993) The glutamatergic nerve terminal. *Eur J Biochem* 212:613-631.
- Nicholls DG, Sihra TS, Sanchez-Prieto J (1987) Calcium-dependent and -independent release of glutamate from synaptosomes monitored by continuous fluorometry. *J Neurochem* 49:50-57.
- Nishikawa Y, Takahashi T, Ogawa K (1994) Redistribution of glutamate and GABA in the cerebral neocortex and hippocampus of the Mongolian gerbil after transient ischemia. An immunocytochemical study. *Mol Chem Neuropathol* 22:25-41.
- Nissim I (1999) Newer aspects of glutamine/glutamate metabolism: the role of acute pH changes. *Am J Physiol* 277:F493-497.
- Norenberg MD, Martinez-Hernandez A (1979) Fine structural localization of glutamine synthetase in astrocytes of rat brain. *Brain Res* 161:303-310.

- Nussberger S, Foret F, Hebert SC, Karger BL, Hediger MA (1996) Nonradioactive monitoring of organic and inorganic solute transport into single *Xenopus* oocytes by capillary zone electrophoresis. *Biophys J* 70:998-1005.
- O'Collins VE, Macleod MR, Donnan GA, Horky LL, van der Worp BH, Howells DW (2006) 1,026 experimental treatments in acute stroke. *Ann Neurol* 59:467-477.
- O'Collins VE, Macleod MR, Cox SF, Van Raay L, Aleksoska E, Donnan GA, Howells DW (2011) Preclinical drug evaluation for combination therapy in acute stroke using systematic review, meta-analysis, and subsequent experimental testing. *J Cereb Blood Flow Metab* 31:962-975.
- O'Kane RL, Mart́nez-Ĺpez I, DeJoseph MR, Viña JR, Hawkins RA (1999) Na(+)-dependent glutamate transporters (EAAT1, EAAT2, and EAAT3) of the blood-brain barrier. A mechanism for glutamate removal. *J Biol Chem* 274:31891-31895.
- Olney JW (1986) Inciting excitotoxic cytotoxicity among central neurons. *Adv Exp Med Biol* 203:631-645.
- Papadia S, Stevenson P, Hardingham NR, Bading H, Hardingham GE (2005) Nuclear Ca<sup>2+</sup> and the cAMP response element-binding protein family mediate a late phase of activity-dependent neuroprotection. *J Neurosci* 25:4279-4287.
- Papadia S, Soriano FX, Leveille F, Martel MA, Dakin KA, Hansen HH, Kaindl A, Sifringer M, Fowler J, Stefovská V, McKenzie G, Craigon M, Corriveau R, Ghazal P, Horsburgh K, Yankner BA, Wyllie DJ, Ikonomidou C, Hardingham GE (2008) Synaptic NMDA receptor activity boosts intrinsic antioxidant defenses. *Nat Neurosci* 11:476-487.
- Pascual-Garvi JM, Gonzalez Llanos F, Prieto Arribas R, Cerdan S, Roda JM (2004) [Blood brain barrier: development of a structure which supports the functional heterogeneity of the central nervous system]. *Rev Neurol* 38:565-581.
- Pérez-Mato M, Ramos-Cabrer P, Sobrino T, Blanco M, Ruban A, Mirelman D, Menendez P, Castillo J, Campos F (2014) Human recombinant glutamate oxaloacetate transaminase 1 (GOT1) supplemented with oxaloacetate induces a protective effect after cerebral ischemia. *Cell Death Dis* 5:e992.
- Pines G, Danbolt NC, Bjørås M, Zhang Y, Bendahan A, Eide L, Koepsell H, Storm-Mathisen J, Seeberg E, Kanner BI (1992) Cloning and expression of a rat brain L-glutamate transporter. *Nature* 360:464-467.
- Pittenger C, Bloch MH, Williams K (2011) Glutamate abnormalities in obsessive compulsive disorder: neurobiology, pathophysiology, and treatment. *Pharmacol Ther* 132:314-332.
- Planas AM (1997) [Cell membrane alterations and protein synthesis in experimental models of cerebral ischemia: pharmacological implications in the treatment of ischemic disease]. *Neurologia* 12:405-417.
- Prins ML (2008) Cerebral metabolic adaptation and ketone metabolism after brain injury. *J Cereb Blood Flow Metab* 28:1-16.
- Pulsinelli W (1992) Pathophysiology of acute ischaemic stroke. *Lancet* 339:533-536.
- Qureshi AI, Ali Z, Suri MF, Shuaib A, Baker G, Todd K, Guterman LR, Hopkins LN (2003) Extracellular glutamate and other amino acids in experimental intracerebral hemorrhage: an in vivo microdialysis study. *Crit Care Med* 31:1482-1489.
- Rao VL, Bowen KK, Dempsey RJ (2001a) Transient focal cerebral ischemia down-regulates glutamate transporters GLT-1 and EAAC1 expression in rat brain. *Neurochem Res* 26:497-502.
- Rao VL, Dogan A, Todd KG, Bowen KK, Kim BT, Rothstein JD, Dempsey RJ (2001b) Antisense knockdown of the glial glutamate transporter GLT-1, but not the neuronal glutamate transporter EAAC1, exacerbates transient focal cerebral ischemia-induced neuronal damage in rat brain. *J Neurosci* 21:1876-1883.

- Reggiani A, Pietra C, Arban R, Marzola P, Guerrini U, Ziviani L, Boicelli A, Sbarbati A, Osculati F (2001) The neuroprotective activity of the glycine receptor antagonist GVI50526: an in vivo study by magnetic resonance imaging. *Eur J Pharmacol* 419:147-153.
- Ricci S, Celani MG, Cantisani TA, Righetti E (2012) Piracetam for acute ischaemic stroke. *Cochrane Database Syst Rev* 9:CD000419.
- Rimaniol AC, Mialocq P, Clayette P, Dormont D, Gras G (2001) Role of glutamate transporters in the regulation of glutathione levels in human macrophages. *Am J Physiol Cell Physiol* 281:C1964-1970.
- Rippe B (1993) A three-pore model of peritoneal transport. *Perit Dial Int* 13 Suppl 2:S35-38.
- Rippe B, Venturoli D, Simonsen O, de Arteaga J (2004) Fluid and electrolyte transport across the peritoneal membrane during CAPD according to the three-pore model. *Perit Dial Int* 24:10-27.
- Rizo J, Sudhof TC (2012) The membrane fusion enigma: SNAREs, Sec1/Munc18 proteins, and their accomplices--guilty as charged? *Annu Rev Cell Dev Biol* 28:279-308.
- Rogachev B, Tsesis S, Gruenbaum BF, Gruenbaum SE, Boyko M, Klein M, Shapira Y, Vorobiev M, Zlotnik A (2013) The effects of peritoneal dialysis on blood glutamate levels: implementation for neuroprotection. *J Neurosurg Anesthesiol* 25:262-266.
- Rogachev B, Ohayon S, Saad A, Vorobiovsky V, Gruenbaum BF, Leibowitz A, Boyko M, Shapira Y, Shnaider A, Zlotnik M, Azab AN, Zlotnik A (2012) The effects of hemodialysis on blood glutamate levels in chronic renal failure: implementation for neuroprotection. *J Crit Care* 27:743.e741-747.
- Rothman SM, Olney JW (1986) Glutamate and the pathophysiology of hypoxic-ischemic brain damage. *Ann Neurol* 19:105-111.
- Rothstein JD, Martin L, Levey AI, Dykes-Hoberg M, Jin L, Wu D, Nash N, Kuncl RW (1994) Localization of neuronal and glial glutamate transporters. *Neuron* 13:713-725.
- Sacco RL, DeRosa JT, Haley EC, Levin B, Ordroneau P, Phillips SJ, Rundek T, Snipes RG, Thompson JL, Investigators GAINA (2001) Glycine antagonist in neuroprotection for patients with acute stroke: GAIN Americas: a randomized controlled trial. *JAMA* 285:1719-1728.
- Sacco RL, Benjamin EJ, Broderick JP, Dyken M, Easton JD, Feinberg WM, Goldstein LB, Gorelick PB, Howard G, Kittner SJ, Manolio TA, Whisnant JP, Wolf PA (1997) American Heart Association Prevention Conference. IV. Prevention and Rehabilitation of Stroke. Risk factors. *Stroke* 28:1507-1517.
- Sacktor B, Rosenbloom IL, Liang CT, Cheng L (1981) Sodium gradient- and sodium plus potassium gradient-dependent L-glutamate uptake in renal basolateral membrane vesicles. *J Membr Biol* 60:63-71.
- Sanchez C, Lopez-Barea F, Sanchez-Cabezudo J, Bajo A, Mate A, Martinez E, Selgas R, Multicentre Study Group C (2004) Low vs standard calcium dialysate in peritoneal dialysis: differences in treatment, biochemistry and bone histomorphometry. A randomized multicentre study. *Nephrol Dial Transplant* 19:1587-1593.
- Santamaria B, Ucerro AC, Reyero A, Selgas R, Ruiz-Ortega M, Catalan M, Egido J, Ortiz A (2008) 3,4-Dideoxyglucosone-3-ene as a mediator of peritoneal demesothelization. *Nephrol Dial Transplant* 23:3307-3315.
- Santos MS, Li H, Voglmaier SM (2009) Synaptic vesicle protein trafficking at the glutamate synapse. *Neuroscience* 158:189-203.
- Sattler R, Tymianski M (2000) Molecular mechanisms of calcium-dependent excitotoxicity. *J Mol Med (Berl)* 78:3-13.

- Schafer MK, Varoqui H, Defamie N, Weihe E, Erickson JD (2002) Molecular cloning and functional identification of mouse vesicular glutamate transporter 3 and its expression in subsets of novel excitatory neurons. *J Biol Chem* 277:50734-50748.
- Schallert T, Fleming SM, Leasure JL, Tillerson JL, Bland ST (2000) CNS plasticity and assessment of forelimb sensorimotor outcome in unilateral rat models of stroke, cortical ablation, parkinsonism and spinal cord injury. *Neuropharmacology* 39:777-787.
- Schimassek H, Gerok W (1965) Control of the levels of free amino acids in plasma by the liver. *Biochem Z* 343:407-415.
- Schmitt A, Asan E, Püschel B, Jöns T, Kugler P (1996) Expression of the glutamate transporter GLT1 in neural cells of the rat central nervous system: non-radioactive in situ hybridization and comparative immunocytochemistry. *Neuroscience* 71:989-1004.
- Schmitt CP, Haraldsson B, Doetschmann R, Zimmering M, Greiner C, Boswald M, Klaus G, Passlick-Deetjen J, Schaefer F (2002) Effects of pH-neutral, bicarbonate-buffered dialysis fluid on peritoneal transport kinetics in children. *Kidney Int* 61:1527-1536.
- Seal RP, Amara SG (1999) Excitatory amino acid transporters: a family in flux. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 39:431-456.
- Shayakul C, Kanai Y, Lee WS, Brown D, Rothstein JD, Hediger MA (1997) Localization of the high-affinity glutamate transporter EAAC1 in rat kidney. *Am J Physiol* 273:F1023-1029.
- Shigeri Y, Seal RP, Shimamoto K (2004) Molecular pharmacology of glutamate transporters, EAATs and VGLUTs. *Brain Res Brain Res Rev* 45:250-265.
- Srivastava PMV, Bhasin A, Bhatia R, Garg A, Gaikwad S, Prasad K, Singh MB, Tripathi M (2012) Efficacy of minocycline in acute ischemic stroke: a single-blinded, placebo-controlled trial. *Neurol India* 60:23-28.
- Stanley EF (1997) The calcium channel and the organization of the presynaptic transmitter release face. *Trends Neurosci* 20:404-409.
- Stompor T, Sulowicz W, Anyszek T, Kusnierz B, Fedak D, Naskalski JW (2003) Dialysis adequacy, residual renal function and serum concentrations of selected low molecular weight proteins in patients undergoing continuous ambulatory peritoneal dialysis. *Med Sci Monit* 9:CR500-504.
- Storck T, Schulte S, Hofmann K, Stoffel W (1992) Structure, expression, and functional analysis of a Na(+)-dependent glutamate/aspartate transporter from rat brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:10955-10959.
- Strong K, Mathers C, Bonita R (2007) Preventing stroke: saving lives around the world. *Lancet Neurol* 6:182-187.
- Stuart S, Booth TC, Cash CJ, Hameeduddin A, Goode JA, Harvey C, Malhotra A (2009) Complications of continuous ambulatory peritoneal dialysis. *Radiographics* 29:441-460.
- Sudhof TC (2004) The synaptic vesicle cycle. *Annu Rev Neurosci* 27:509-547.
- Sudhof TC, Rothman JE (2009) Membrane fusion: grappling with SNARE and SM proteins. *Science* 323:474-477.
- Susin SA, Lorenzo HK, Zamzami N, Marzo I, Brenner C, Larochette N, Prévost MC, Alzari PM, Kroemer G (1999) Mitochondrial release of caspase-2 and -9 during the apoptotic process. *J Exp Med* 189:381-394.
- Takahashi M, Ni JW, Kawasaki-Yatsugi S, Toya T, Yatsugi SI, Shimizu-Sasamata M, Koshiya K, Shishikura JI, Sakamoto S, Yamaguchi T (1998) YM872, a novel selective alpha-amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionic acid receptor antagonist, reduces brain damage after permanent focal cerebral ischemia in cats. *J Pharmacol Exp Ther* 284:467-473.

- Takamori S, Rhee JS, Rosenmund C, Jahn R (2001) Identification of differentiation-associated brain-specific phosphate transporter as a second vesicular glutamate transporter (VGLUT2). *J Neurosci* 21:RC182.
- Tattersall JE, Dick C, Doyle S, Greenwood RN, Farrington K (1995) Alkalosis and hypomagnesaemia: unwanted effects of a low-calcium CAPD solution. *Nephrol Dial Transplant* 10:258-262.
- Teichberg VI, Cohen-Kashi-Malina K, Cooper I, Zlotnik A (2009) Homeostasis of glutamate in brain fluids: an accelerated brain-to-blood efflux of excess glutamate is produced by blood glutamate scavenging and offers protection from neuropathologies. *Neuroscience* 158:301-308.
- Teixidó Planas J, Montenegro J, Correa-Rotter R, Riella MC (2009) 4 - Fisiología peritoneal: Modelos teóricos de la diálisis peritoneal y su implicación en la clínica. In: *Tratado de diálisis peritoneal*, pp 51-79. Barcelona: Elsevier España.
- Termorshuizen F, Dekker FW, van Manen JG, Korevaar JC, Boeschoten EW, Krediet RT, Group NS (2004) Relative contribution of residual renal function and different measures of adequacy to survival in hemodialysis patients: an analysis of the Netherlands Cooperative Study on the Adequacy of Dialysis (NECOSAD)-2. *J Am Soc Nephrol* 15:1061-1070.
- Tessler S, Danbolt NC, Faull RL, Storm-Mathisen J, Emson PC (1999) Expression of the glutamate transporters in human temporal lobe epilepsy. *Neuroscience* 88:1083-1091.
- Theodoridis M, Thodis E, Tsigalou C, Pappi R, Roumeliotis A, Georgoulidou A, Passadakis P, Vargemezis V (2011) Alterations of dialysate markers in chronic peritoneal dialysis patients treated with the new less bioincompatible bicarbonate solutions. *Perit Dial Int* 31:196-199.
- The RANTTAS Investigators (1996) A randomized trial of tirilazad mesylate in patients with acute stroke (RANTTAS). The RANTTAS Investigators. *Stroke* 27:1453-1458.
- Tirkes T, Sandrasegaran K, Patel AA, Hollar MA, Tejada JG, Tann M, Akisik FM, Lappas JC (2012) Peritoneal and retroperitoneal anatomy and its relevance for cross-sectional imaging. *Radiographics* 32:437-451.
- Torp R, Hoover F, Danbolt NC, Storm-Mathisen J, Ottersen OP (1997) Differential distribution of the glutamate transporters GLT1 and rEAAC1 in rat cerebral cortex and thalamus: an in situ hybridization analysis. *Anat Embryol (Berl)* 195:317-326.
- Tranaeus A (2000) A long-term study of a bicarbonate/lactate-based peritoneal dialysis solution--clinical benefits. The Bicarbonate/Lactate Study Group. *Perit Dial Int* 20:516-523.
- Utsunomiya-Tate N, Endou H, Kanai Y (1997) Tissue specific variants of glutamate transporter GLT-1. *FEBS Lett* 416:312-316.
- Van Dijk CM, Ledesma SG, Teitelbaum I (2005) Patient characteristics associated with defects of the peritoneal cavity boundary. *Perit Dial Int* 25:367-373.
- van Meer MP, van der Marel K, Wang K, Otte WM, El Bouazati S, Roeling TA, Viergever MA, Berkelbach van der Sprenkel JW, Dijkhuizen RM (2010) Recovery of sensorimotor function after experimental stroke correlates with restoration of resting-state interhemispheric functional connectivity. *J Neurosci* 30:3964-3972.
- Wahlgren NG, Ahmed N (2004) Neuroprotection in cerebral ischaemia: facts and fancies--the need for new approaches. *Cerebrovasc Dis* 17 Suppl 1:153-166.
- Wahlgren NG, MacMahon DG, De Keyser J, Indredavik B, Ryman T (1994) Intravenous Nimodipine West European Stroke Trial (INWEST) of Nimodipine in the Treatment of Acute Ischaemic Stroke. *Cerebrovasc Dis* 4:204-210.
- Wahlgren NG, Ranasinha KW, Rosolacci T, Franke CL, van Erven PM, Ashwood T, Claesson L (1999) Clomethiazole acute stroke study (CLASS): results of a randomized, controlled trial of clomethiazole versus placebo in 1360 acute stroke patients. *Stroke* 30:21-28.

- Walters MR, Kaste M, Lees KR, Diener HC, Hommel M, De Keyser J, Steiner H, Versavel M (2005) The AMPA antagonist ZK 200775 in patients with acute ischaemic stroke: a double-blind, multicentre, placebo-controlled safety and tolerability study. *Cerebrovasc Dis* 20:304-309.
- Wallis RA, Panizzon KL, Nolan JP (1995) Glycine-induced CA1 excitotoxicity in the rat hippocampal slice. *Brain Res* 685:115-125.
- Wang Q, Tang XN, Yenari MA (2007) The inflammatory response in stroke. *J Neuroimmunol* 184:53-68.
- Wang ZB, Li M, Li JC (2010) Recent advances in the research of lymphatic stomata. *Anat Rec (Hoboken)* 293:754-761.
- Weber R, Ramos-Cabrera P, Justicia C, Wiedermann D, Strecker C, Sprenger C, Hoehn M (2008) Early prediction of functional recovery after experimental stroke: functional magnetic resonance imaging, electrophysiology, and behavioral testing in rats. *J Neurosci* 28:1022-1029.
- Weinberger JM (2006) Evolving therapeutic approaches to treating acute ischemic stroke. *J Neurol Sci* 249:101-109.
- WHO (1989) Stroke--1989. Recommendations on stroke prevention, diagnosis, and therapy. Report of the WHO Task Force on Stroke and other Cerebrovascular Disorders. *Stroke* 20:1407-1431.
- Wieczorowska-Tobis K, Styszynski A, Breborowicz A, Oreopoulos DG (2001a) Comparison of the biocompatibility of phosphate-buffered saline alone, phosphate-buffered saline supplemented with glucose, and dianeal 3.86%. *Perit Dial Int* 21 Suppl 3:S362-364.
- Wieczorowska-Tobis K, Polubinska A, Breborowicz A, Oreopoulos DG (2001b) A comparison of the biocompatibility of phosphate-buffered saline and dianeal 3.86% in the rat model of peritoneal dialysis. *Adv Perit Dial* 17:42-46.
- Wisden W, Seeburg PH (1993) Mammalian ionotropic glutamate receptors. *Curr Opin Neurobiol* 3:291-298.
- Wishart HA, Saykin AJ, McAllister TW (2002) Functional magnetic resonance imaging: emerging clinical applications. *Curr Psychiatry Rep* 4:338-345.
- Wu LG, Saggau P (1997) Presynaptic inhibition of elicited neurotransmitter release. *Trends Neurosci* 20:204-212.
- Yamaguchi T, Sano K, Takakura K, Saito I, Shinohara Y, Asano T, Yasuhara H (1998) Ebselen in acute ischemic stroke: a placebo-controlled, double-blind clinical trial. Ebselen Study Group. *Stroke* 29:12-17.
- Yang JL, Sykora P, Wilson DM, Mattson MP, Bohr VA (2011) The excitatory neurotransmitter glutamate stimulates DNA repair to increase neuronal resiliency. *Mech Ageing Dev* 132:405-411.
- Yu HL, Giammarco R, Goldstein MB, Stinebaugh DJ, Halperin ML (1976) Stimulation of ammonia production and excretion in the rabbit by inorganic phosphate. Study of control mechanisms. *J Clin Invest* 58:557-564.
- Yung S, Chan TM (2007) Mesothelial cells. *Perit Dial Int* 27 Suppl 2:S110-115.
- Zlotnik A, Gurevich B, Tkachov S, Maoz I, Shapira Y, Teichberg VI (2007) Brain neuroprotection by scavenging blood glutamate. *Exp Neurol* 203:213-220.
- Zlotnik A, Gurevich B, Cherniavsky E, Tkachov S, Matuzani-Ruban A, Leon A, Shapira Y, Teichberg VI (2008) The contribution of the blood glutamate scavenging activity of pyruvate to its neuroprotective properties in a rat model of closed head injury. *Neurochem Res* 33:1044-1050.
- Zlotnik A, Gruenbaum SE, Artru AA, Rozet I, Dubilet M, Tkachov S, Brotfain E, Klin Y, Shapira Y, Teichberg VI (2009) The neuroprotective effects of oxaloacetate in closed head injury in rats is mediated by its blood glutamate scavenging activity: evidence from the use of maleate. *J Neurosurg Anesthesiol* 21:235-241.

Zucker RS (1996) Exocytosis: a molecular and physiological perspective. *Neuron* 17:1049-1055.

Zwingmann C, Leibfritz D (2003) Regulation of glial metabolism studied by <sup>13</sup>C-NMR. *NMR Biomed* 16:370-399.

*PUBLICACIONES*  
*RELACIONADAS*





# Amelioration of ischemic brain damage by peritoneal dialysis

María del Carmen Godino,<sup>1</sup> Victor G. Romera,<sup>2</sup> José Antonio Sánchez-Tomero,<sup>3</sup> Jesus Pacheco,<sup>4</sup> Santiago Canals,<sup>4</sup> Juan Lerma,<sup>4</sup> José Vivancos,<sup>5</sup> María Angeles Moro,<sup>2</sup> Magdalena Torres,<sup>1</sup> Ignacio Lizasoain,<sup>2</sup> and José Sánchez-Prieto<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense, Madrid, Spain. <sup>2</sup>Departamento de Farmacología, Facultad de Medicina, Universidad Complutense, Madrid, Spain. <sup>3</sup>Servicio de Nefrología, Hospital Universitario de la Princesa, Madrid, Spain.

<sup>4</sup>Instituto de Neurociencias de Alicante, Universidad Miguel Hernández-Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Sant Joan d'Alacant, Spain.

<sup>5</sup>Servicio de Neurología, Hospital Universitario de la Princesa, Madrid, Spain.

**Ischemic stroke is a devastating condition, for which there is still no effective therapy. Acute ischemic stroke is associated with high concentrations of glutamate in the blood and interstitial brain fluid. The inability of the tissue to retain glutamate within the cells of the brain ultimately provokes neuronal death. Increased concentrations of interstitial glutamate exert further excitotoxic effects on healthy tissue surrounding the infarct zone. We developed a strategy based on peritoneal dialysis to reduce blood glutamate levels, thereby accelerating brain-to-blood glutamate clearance. In a rat model of stroke, this simple procedure reduced the transient increase in glutamate, consequently decreasing the size of the infarct area. Functional magnetic resonance imaging demonstrated that the rescued brain tissue remained functional. Moreover, in patients with kidney failure, peritoneal dialysis significantly decreased glutamate concentrations. Our results suggest that peritoneal dialysis may represent a simple and effective intervention for human stroke patients.**

## Introduction

Stroke is one of the leading causes of death and disability worldwide, for which no effective neuroprotective therapy exists. Ischemic brain damage is triggered by excessive release of the excitatory neurotransmitter L-glutamate (1, 2) as a result of energy failure and ion gradient collapse, resulting in a reversal of glutamate uptake via glutamate transporters (3, 4). Excessive glutamate-evoked Ca<sup>2+</sup> entry via NMDA receptors further promotes cell death by triggering an excitotoxic cascade that involves the activation of Ca<sup>2+</sup>-dependent enzymes, the disruption of mitochondrial function, and cell necrosis or apoptosis (5). Despite intense research efforts, suitable pharmacological strategies to enhance neuroprotection of ischemic tissues remain elusive (6), partly because pharmacotherapy tends to target a single step of the complex excitotoxic cascade and it does not distinguish between damaged and healthy tissue.

After acute ischemic stroke, there is an increase in glutamate levels in the blood (7), most likely due to enhanced brain-to-blood efflux (8, 9) that is driven by increased interstitial glutamate concentrations (10). We reasoned that peritoneal dialysis could decrease the blood levels of glutamate, thereby minimizing the interstitial glutamate in the brain and curtailing ischemia-induced brain damage (8, 9).

## Results and Discussion

We investigated the hypothesis that peritoneal dialysis could decrease the blood levels of glutamate, thereby minimizing brain damage in a model of brain ischemia in which rats were subjected to permanent middle cerebral artery occlusion (pMCAO) (Figure 1A). The concentration of glutamate transiently increased in plasma 4.5 and 5.5 hours after ischemia (pMCAO; Figure 1B),

and a corresponding cerebral infarct of 23.3% ± 1.3% (*n* = 9) was observed 24 hours after pMCAO (Figure 1, D and E). Peritoneal dialysis is a procedure used to treat patients with severe chronic kidney disease, whereby fluids and dissolved substances are exchanged between the blood and the dialysate across the peritoneum (11, 12). In rats subjected to pMCAO, peritoneal dialysis 2.5 hours after pMCAO significantly attenuated the increase in plasma glutamate induced by ischemia (pMCAO plus dialysis at 2.5 hours; Figure 1B), and, importantly, this decrease in plasma glutamate levels was associated with a significant reduction in the volume of cerebral infarct (12.1% ± 2.2%, *n* = 5, *P* < 0.001) (Figure 1, D and E). Confirming that rat peritoneal dialysis leads to a reduction of plasma glutamate, we found that the accumulated glutamate in the dialysate after 1 hour of dialysis was 59.2 ± 12.2 μM (*n* = 8). As a control, we added glutamate to the dialysate infusion to cancel the concentration gradient for glutamate, therefore preventing its clearance from the blood. Indeed, the addition of glutamate (400 μM) to the dialysate abolished the glutamate clearance observed following peritoneal dialysis, resulting in a significant increase in blood glutamate concentration after pMCAO (pMCAO plus dialysis at 2.5 hours plus 400 μM glutamate; Figure 1C) and, importantly, abrogated the beneficial effect of peritoneal dialysis on cerebral infarct size (Figure 1D). In sham-operated rats, in which middle cerebral arteries were exposed but not occluded, no changes in plasma glutamate concentration were detected (Figure 1C) and no cerebral infarct was observed (Figure 1D). The changes in plasma glutamate correlated well with the size of cerebral infarct measured 24 hours after insult (*r*<sup>2</sup> = 0.5312, *P* = 0.0021; Figure 1E). We also observed that peritoneal dialysis is equally efficient in reducing the infarct volume when starting 5 hours after pMCAO (15.0% ± 1.2%, *n* = 7, *P* < 0.01; Figure 1, A and D), as plasma glutamate at 5.5 hours after pMCAO is still high and close to maximal levels (Figure 1B). These data indicate that by decreasing the glutamate concentration in the blood, peritoneal

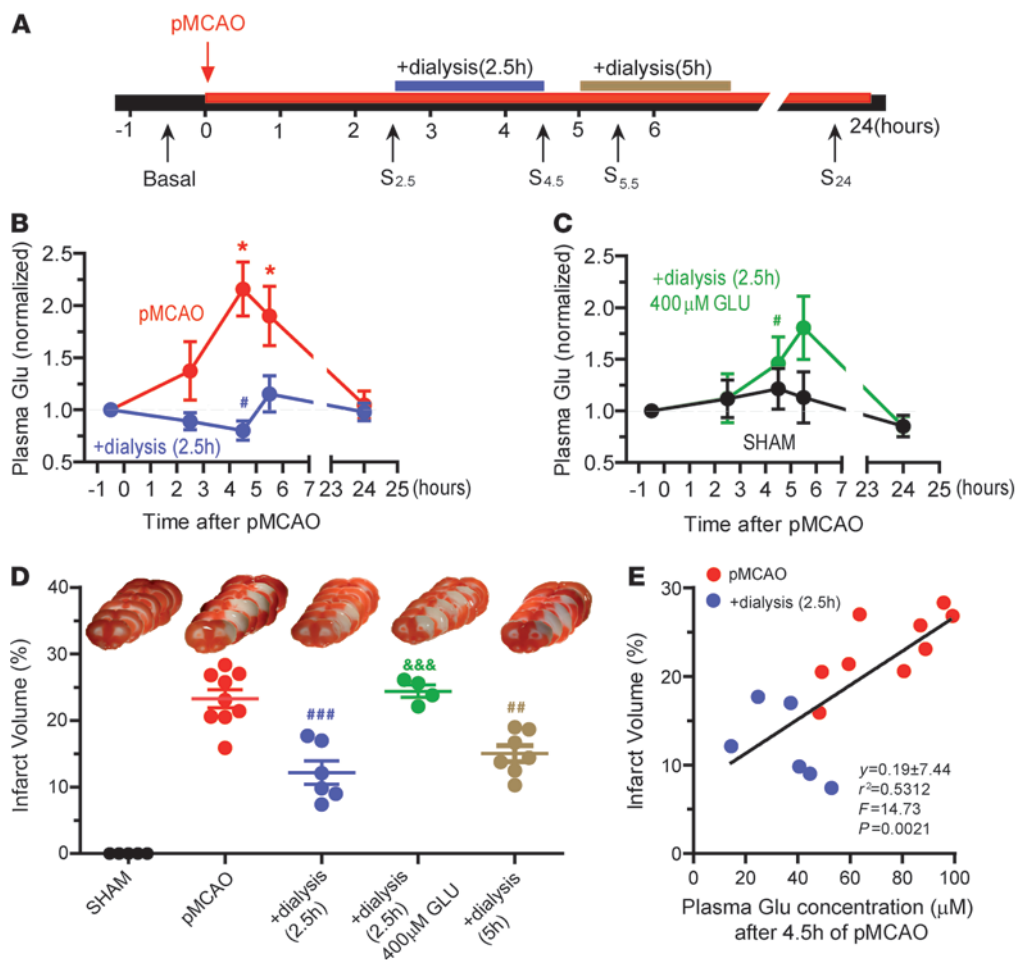
**Authorship note:** María del Carmen Godino and Victor G. Romera contributed equally to this work.

**Conflict of interest:** The authors have declared that no conflict of interest exists.

**Citation for this article:** *J Clin Invest*. doi:10.1172/JCI67284.



## brief report



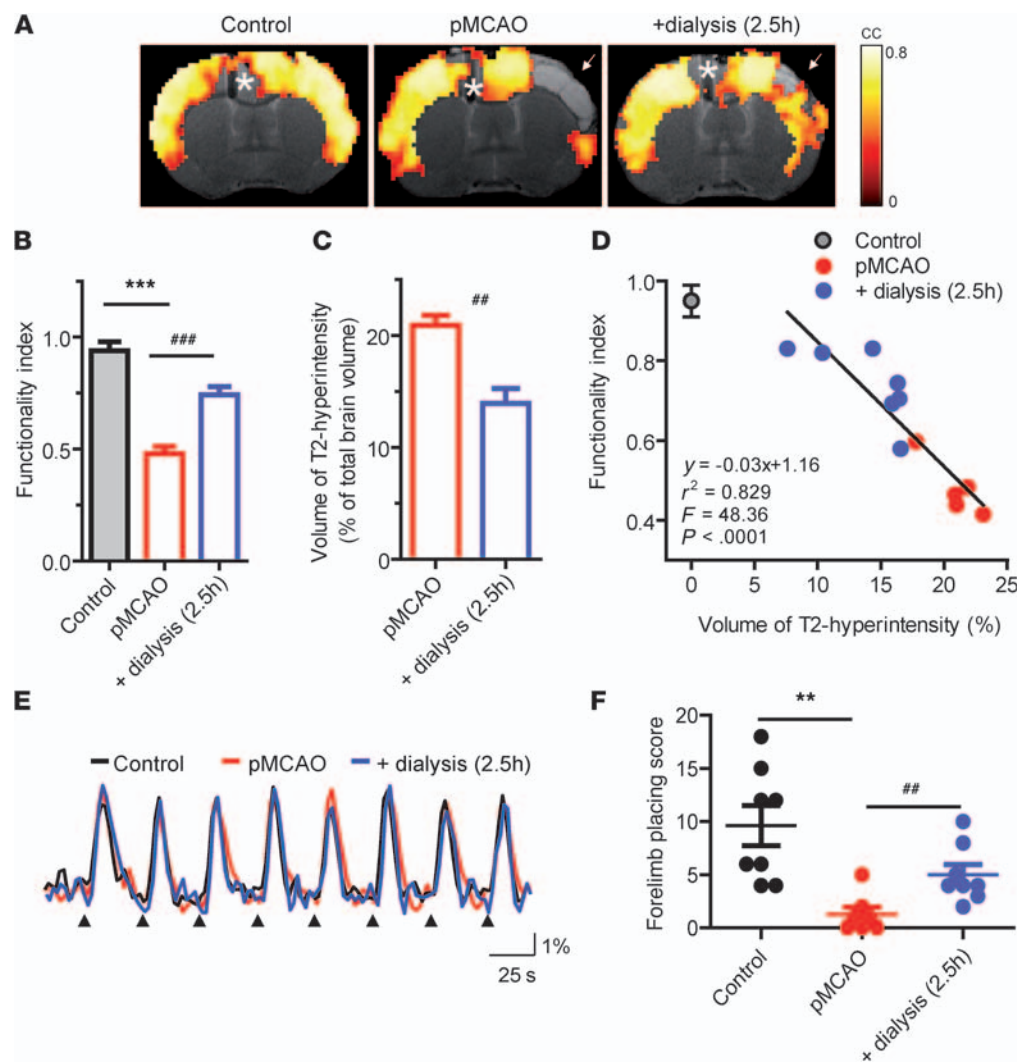
**Figure 1**

Peritoneal dialysis attenuates ischemia-induced increases in plasma glutamate concentration and cerebral infarct size. **(A)** The glutamate concentration was determined in plasma samples taken prior to (basal) and at different times (hours) after pMCAO (samples were taken at 2.5 hours [S2.5], 4.5 hours [S4.5], 5.5 hours [S5.5], and 24 hours [S24]), with peritoneal dialysis initiated 2.5 hours after pMCAO induction. Cerebral infarct size was measured 24 hours after pMCAO. Plasma glutamate (normalized to basal levels) and cerebral infarct size were determined in the following conditions: **(B, D, and E)** pMCAO as well as pMCAO plus peritoneal dialysis at 2.5 hours [+dialysis (2.5h)]; **(C and D)** pMCAO plus peritoneal dialysis at 2.5 hours with 400  $\mu\text{M}$  glutamate in the dialysate [+dialysis (2.5h) 400  $\mu\text{M}$  GLU] as well as sham-operated rats (SHAM); and **(D)** pMCAO plus peritoneal dialysis at 5 hours [+dialysis (5h)]. **(E)** Correlation between plasma glutamate (measured 4.5 hours after pMCAO) and infarct size. The average basal glutamate values were  $51.8 \pm 2.6 \mu\text{M}$  ( $n = 21$ ). Data represent the mean  $\pm$  SEM, and  $n = 5-9$  for each condition. \* $P < 0.05$  versus basal values (ANOVA); # $P < 0.05$ , ## $P < 0.01$ , ### $P < 0.001$  versus corresponding values in pMCAO (ANOVA); &&& $P < 0.001$  versus corresponding values in [+dialysis (2.5h)] (ANOVA).

dialysis effectively promotes brain-to-blood glutamate efflux (9), minimizing the ischemic increase in extracellular glutamate and the resulting tissue damage.

Despite the apparent beneficial effects of peritoneal dialysis, it remains unclear whether the tissue rescued from death, according to structural and anatomical parameters, remains functional. To clarify this issue, we used blood oxygenation level-dependent (BOLD) functional magnetic resonance imaging (fMRI) to determine tissue functionality (13). fMRI experiments were performed 14 days after the ischemic insult in treated (dialyzed) and untreated animals. Electric stimulation of the corpus callosum produces widespread fMRI activation maps in the cerebral cortex (Figure 2A). The time course of BOLD signals during callosal activation showed fully recovered hemodynamic responses after every stimulation epoch and the absence of movement artifacts

or spontaneous poststimulus activations suggestive of seizures (Figure 2E). Functional activation extends to both hemispheres almost symmetrically in intact animals (Figure 2A). The symmetry was lost in pMCAO animals due to the ischemic injury (Figure 2A). To quantify tissue viability, we defined a functionality index as the ratio of cortical volume activated in the infarcted hemisphere divided by the contralateral (spared) side, during callosal stimulation. Intact animals were used as reference. Thus, the functionality index measures the extension of the functional lesion normalized to the healthy hemisphere and decreases experimental variability. As shown in Figure 2B, pMCAO induced a severe loss of cortical viability. Peritoneal glutamate dialysis partially prevented this functional damage, rescuing tissue viability (Figure 2B). In the same animals, we also measured the infarct size based on the volume of the T2-hyperintense signal in MRI anatomical scans and



## Figure 2

Functional recovery of the cerebral cortex. **(A)** Representative cortical activation during corpus callosum stimulation. fMRI maps are thresholded at  $P < 0.0001$  (uncorrected) and overlaid on anatomical scans. Electrode artifact is marked with asterisks, and the arrows point toward the infarct area. Color-coded scale represents correlation of the BOLD signal with the stimulation paradigm. Note almost symmetric bilateral activation of the cortex in healthy animals upon corpus callosum stimulation. **(B)** Functionality index measured as the volume of active tissue in the right (ischemic) cortex normalized by the left (healthy) cortex. Intact animals (black,  $n = 3$ ) are used as control for animals subjected to pMCAO (red,  $n = 5$ ) and pMCAO plus peritoneal dialysis at 2.5 hours (blue,  $n = 7$ ). Signal loss introduced by the implanted electrode (asterisk in **A**) was corrected. Data represent mean  $\pm$  SEM. **(C)** Volume of the hyperintense T2-weighted signal (arrows in **A**). Data represent mean  $\pm$  SEM. **(D)** Highly significant negative correlation was found between the volume of the ischemic lesion (measured in **C**) and the functionality index (measured in **B**). **(E)** Average hemodynamic signal in response to callosal stimulation across all significant voxels in **A** ( $P < 0.0001$ , uncorrected). Stimulation epochs are marked by arrowheads. **(F)** Behavioral testing of the simultaneous use of both forelimbs on cylinder wall during exploratory activity. Data represent the mean  $\pm$  SEM ( $n = 5-7$ ). Statistical analysis was performed by **(B)** ANOVA followed by Bonferroni's test, **(C and F)** 2-tailed Student's  $t$  test, or **(D)** linear regression.  $**P < 0.01$ ,  $***P < 0.001$  control versus pMCAO;  $##P < 0.01$ ,  $###P < 0.001$  pMCAO versus +dialysis (2.5h).

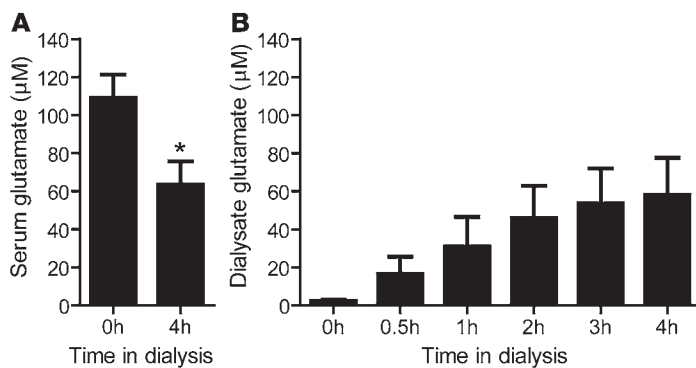
were able to demonstrate not only the reduced lesion volume under dialysis (Figure 2C), but also a tight correlation between the volume of the T2 lesion and the calculated functionality index (Figure 2D). As a whole, these findings demonstrate that the reduction in infarct volume by dialysis preserves neuronal integrity and confirms the validity of anatomical measures of ischemic lesion based on T2-weighted images as predictors of functionality. In good agreement with the fMRI results, we were able to demonstrate that the functionality of the system, measured behaviorally

using the limb-use asymmetry test, was also largely preserved in dialyzed animals (Figure 2F). Taken together, our results indicate that the functional deficit produced by ischemic insult can be partially prevented by peritoneal dialysis.

The endothelial cells that form the blood-brain barrier are endowed with facilitative and  $\text{Na}^+$ -dependent glutamate transporters in the luminal and abluminal membranes, respectively, that mediate glutamate efflux to the blood. Glutamate is actively transported from the interstitial space to the endothelial cells and



## brief report

**Figure 3**

Peritoneal dialysis decreases serum glutamate levels in patients with severe chronic kidney disease. **(A)** Serum glutamate concentration in patients prior to and after one 4-hour session of peritoneal dialysis. Glutamate levels were determined fluorimetrically using glutamate dehydrogenase. The serum glutamate concentrations were  $109.2 \pm 17.6 \mu\text{M}$  and  $63.6 \pm 10.7 \mu\text{M}$  before and after a 4-hour dialysis session, respectively. **(B)** Time-dependent accumulation of glutamate in the dialysate. The results represent the mean  $\pm$  SEM ( $n = 7$ ).  $*P < 0.05$  as compared with serum glutamate concentration prior to the dialysis session (Student's *t* test).

from the endothelial cells into the circulation via facilitative transporters (8). Peritoneal dialysis is primarily used to treat patients with chronic kidney disease (14), which constitute approximately 15% of all dialysis patients. Thus, to further demonstrate the validity of our proposal that peritoneal dialysis promotes brain-to-blood glutamate efflux, we analyzed serum glutamate concentrations in patients before and after dialysis. One session of peritoneal dialysis significantly reduced serum glutamate levels in patients with severe chronic kidney disease (Figure 3A). As expected, glutamate rapidly accumulated in the dialysate ( $58.0 \pm 19.5 \mu\text{M}$  after 4 hours of dialysis; Figure 3B), almost reaching serum glutamate concentrations, indicating that glutamate is rapidly exchanged from the blood to the dialysate. These results demonstrate that the peritoneum promotes rapid and efficient glutamate exchange between the blood and the dialysate and that peritoneal dialysis induces rapid clearance of interstitial glutamate. Based on these findings, we propose that peritoneal dialysis may offer a suitable treatment to decrease blood glutamate concentrations in acute stroke patients, efficiently reducing interstitial glutamate levels and ultimately ameliorating cerebral damage.

Synaptically released glutamate is nontoxic to neurons because its diffusion, binding, and transport via  $\text{Na}^+$ -dependent glutamate transporters rapidly lower the concentration of this glutamate to concentrations in the submicromolar range, preventing tonic activation of NMDA receptors (15, 16). By contrast, cerebral ischemia provokes a more sustained increase in extracellular glutamate concentration (10) that can exert toxic effects on metabolically viable tissue around the infarct area (17, 18). Indeed, plasma glutamate concentrations remain elevated in patients with progressing ischemic stroke 24 hours after stroke (7), reflecting the ongoing cell death. Moreover, polymorphisms affecting glutamate uptake are associated with elevated levels of plasma glutamate and a poorer neurological outcome following stroke (19). Therapeutic interventions based on impeding glutamate receptor activation have so far failed to ameliorate tissue degeneration after stroke. However, the present findings suggest that removing glutamate from the extracellular space may represent an effective means of preventing tissue damage surrounding the infarct area. Interestingly, decreases in serum glutamate levels induced by intravenous injection of oxalacetate and pyruvate (9, 20) also produce neuroprotection in both focal (21) and global brain ischemia (22, 23) and in traumatic brain injury (24). However, undesirable side effects of this approach have been reported in vivo, including enhanced excitatory transmission in the cortex (25).

Peritoneal dialysis overcomes some of the drawbacks associated with the pharmacological neuroprotectants that have failed to

produce beneficial effects in clinical trials. First, rather than targeting a single step of the complex excitotoxic cascade initiated by glutamate (5, 17, 26), peritoneal dialysis removes the source of the problem, the interstitial glutamate itself, thereby preventing excitotoxicity around the damaged tissue. Second, neuroprotective drugs do not distinguish between damaged and healthy tissue, and, thus, NMDA antagonists will block NMDA receptor-driven  $\text{Ca}^{2+}$  influx in the infarct area (27) while also altering NMDA receptor-dependent synaptic plasticity in healthy brain regions (28). By contrast, the peritoneal dialysis procedure removes interstitial glutamate preferentially from the infarct areas that contain the higher brain/blood glutamate gradients. Furthermore, the use of peritoneal dialysis may substantially reduce the time of treatment.

Most strokes are ischemic and occur after vessel occlusion, while about 15% are hemorrhagic in nature. Thrombolysis with recombinant tissue plasminogen activator (rtPA) is the only treatment approved for reperfusion and reversal of vessel obstruction, although in practice this treatment is available to a limited number of patients (6). Administration of rtPA requires prior distinction between thrombotic and hemorrhagic stroke, as this treatment is not suitable for hemorrhagic stroke patients. Accordingly, peritoneal dialysis has the additional advantage that it is applicable in cases of both ischemic and hemorrhagic stroke, as the elevation of interstitial glutamate is a feature common to both conditions (29). Other conditions characterized by increases in brain glutamate levels, such as glioma-induced seizures (30), may also benefit from this approach. Moreover, peritoneal dialysis can be implemented rapidly by the nephrologist when the patient arrives to hospital. The short time required for catheter implantation (15 minutes) ensures that peritoneal dialysis can be applied well within the time window for glutamate clearance and for therapeutic effect. Finally, the use of peritoneal dialysis for the treatment of stroke would benefit greatly from the widespread experience already attained by medical personnel in the use of this technique. Nonetheless, preclinical work is needed in order to prove that peritoneal dialysis is also effective and safe in aged and/or comorbid animals, reflecting the clinical situation, and clinical trials are required to demonstrate the efficacy of peritoneal dialysis in acute ischemic stroke and other brain pathologies.

**Methods**

Further information is available in the Supplemental Methods (supplemental material available online with this article; doi:10.1172/JCI67284DS1).

*pMCAO.* The pMCAO was achieved by ligature as described previously (31). In sham-operated control rats, the middle cerebral artery was exposed but not occluded.



**Statistics.** Data are expressed as the mean  $\pm$  SEM. ANOVA with Tukey's multiple comparison test, ANOVA followed by Bonferroni's test, or 2-tailed Student's *t* test were used. A *P* value of less than 0.05 was considered significant.

**Study approval.** All patients provided informed consent prior to participation in this study. All the experimental procedures were performed in accordance with the guidelines and with the approval of the Animal Welfare Committee of the Universidad Complutense (DC 86/609/EU).

## Acknowledgments

This work was supported by grants from the Spanish MINECO to J. Sánchez-Prieto (BFU2010/16947), I. Lizasoain (SAF2011-23354), and M.A. Moro (SAF2009-08145, SAF2012-33216, and CSD2010-00045); from Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER) "Instituto de Salud Carlos III" (RD06/0026, RD12/0014) to I. Lizasoain, M. Torres, J. Vivancos, and J. Sánchez-Prieto; from the "Comunidad de Madrid" (CAM-I2M2 2011-BMD-2349) to I.

Lizasoain, M. Torres, J. Vivancos, and J. Sánchez-Prieto; and from NEUROSTEMCM to M.A. Moro (S2010/BMD-2336). Research in the laboratory of S. Canals and J. Lerma is supported by grants from the Spanish MINECO (BFU2009-09938, BFU2011-24084, and CSD2007-00023). We thank M. Sefton for editorial assistance and Begoña Fernández for excellent technical assistance.

Received for publication October 11, 2012, and accepted in revised form July 3, 2013.

Address correspondence to: Ignacio Lizasoain, Departamento de Farmacología, Facultad de Medicina, Universidad Complutense, Madrid-28040, Spain. Phone: 34.91.3941465; Fax: 34.91.3941464; E-mail: ignacio.lizasoain@med.ucm.es. Or to: José Sánchez-Prieto, Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense, Madrid-28040, Spain. Phone: 34.91.3943891; Fax: 34.91.3943909; E-mail: jsprieto@vet.ucm.es.

- Choi DW, Rothman SM. The role of glutamate neurotoxicity in hypoxic-ischemic neuronal death. *Annu Rev Neurosci.* 1990;13:171-182.
- Lipton P. Ischemic cell death in brain neurons. *Physiol Rev.* 1990;79(4):1431-1568.
- Sánchez-Prieto J, González MP. Occurrence of a large Ca<sup>2+</sup>-independent release of glutamate during anoxia in isolated nerve terminals. *J Neurochem.* 1988;59(4):1322-1325.
- Rossi D, Oshima T, Attwell D. Glutamate release in severe brain ischaemia is mainly by reversed uptake. *Nature.* 2000;403(6767):316-321.
- Moskowitz MA, Lo EH, Iadecola C. The science of stroke: mechanisms in search of treatments. *Neuron.* 2010;67(2):181-198.
- Endres M, et al. Improving outcome after stroke: overcoming the translational roadblock. *Cerebrovasc Dis.* 2008;25(3):268-278.
- Castillo J, Dávalos A, Noya M. Progression of ischaemic stroke and excitotoxic aminoacids. *Lancet.* 1997;349(9045):79-83.
- Hawkins RA, O'Kane R, Simpson IA, Viña JR. Structure of the blood-brain barrier and its role in the transport of amino acids. *J Nutr.* 2006;136(suppl):218S-226S.
- Teichberg VI, Cohen-Kashi-Malina K, Cooper I, Zlotnik A. Homeostasis of glutamate in brain fluids: an accelerated brain-to-blood efflux of excess glutamate is produced by blood glutamate scavenging and offers protection from neuropathologies. *Neuroscience.* 2009;158(1):301-308.
- Benveniste H, Drejer J, Schousboe A, Diemer NH. Elevation of the extracellular concentrations of glutamate and aspartate in rat hippocampus during transient cerebral ischemia. *J Neurochem.* 1984;43(5):1369-1374.
- Gokal R. Peritoneal dialysis in the 21st century: an analysis of current problems and future developments. *J Am Soc Nephrol Suppl.* 2002;13(5):S104-S116.
- Johansson L, Brown EA. Peritoneal dialysis. *Semin Dial.* 2009;22(1):27-29.
- Logothetis NK. What we can do and what we cannot do with fMRI. *Nature.* 2008;453(7197):869-878.
- Jain N, Simoyi P. An overview of chronic kidney disease management and CAPD in the home. *Br J Community Nurs.* 2008;13(5):213-218.
- Bergles DE, Jahr CE. Synaptic activation of glutamate transporters in hippocampal astrocytes. *Neuron.* 1997;19(6):1297-1308.
- Attwell D, Gibb A. Neuroenergetics and the kinetic design of excitatory synapses. *Nat Rev Neurosci.* 2005;6(11):841-849.
- Dirnagl U, Iadecola C, Moskowitz MA. Pathobiology of ischemic stroke: an integrated view. *Trends Neurosci.* 1999;22(9):391-397.
- Dreier JP. The role of spreading depression, spreading depolarization and spreading ischemia in neurological disease. *Nat Med.* 2011;17(4):439-447.
- Mallolas J, et al. A polymorphism in the EEAT2 promoter is associated to higher glutamate concentrations and a higher frequency of progressing stroke. *J Exp Med.* 2006;203(3):711-717.
- Gottlieb M, Wang Y, Teichberg VI. Blood-mediated scavenging of cerebrospinal fluid glutamate. *J Neurochem.* 2003;87(1):119-126.
- Nagy D, et al. Oxalacetate decreases the infarct size and attenuates the reduction in evoked responses after photothrombotic focal ischemia in the rat cortex. *Cell Mol Neurobiol.* 2009;29(6-7):827-835.
- Marosi M, et al. Oxalacetate restores the long-term potentiation impaired in CA1 region by 2-vessel occlusion. *Eur J Pharmacol.* 2009;604(1-4):51-57.
- Campos F, et al. Neuroprotection by glutamate oxalacetate transaminase in ischemic stroke: an experimental study. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2011;31(6):1378-1386.
- Zlotnik A, et al. The contribution of the blood glutamate scavenging activity of pyruvate to its neuroprotective properties in a rat model of closed head injury. *Neurochem Res.* 2008;33(6):1044-1050.
- Nagy D, et al. Effects of blood glutamate scavenging on cortical evoked potentials. *Cell Mol Neurobiol.* 2010;30(7):1101-1106.
- Choi DW, Maulucci-Gedde M, Kriegstein AR. Glutamate neurotoxicity in cortical cell culture. *J Neurosci.* 1987;7(2):357-368.
- Albers GW, Goldberg MP, Choi DW. N-methyl-D-aspartate antagonists: ready for clinical trials in brain ischemia. *Ann Neurol.* 1989;25(4):398-403.
- Malenka RC, Nicoll RA. NMDA-receptor-dependent synaptic plasticity: multiple forms and mechanisms. *Trends Neurosci.* 1993;16(12):521-527.
- Qureshi AI, et al. Extracellular glutamate and other amino acids in experimental intracerebral hemorrhage: an in vivo microdialysis study. *Crit Care Med.* 2003;31(5):1482-1489.
- Buckingham SC, et al. Glutamate release by primary brain tumors induces epileptic activity. *Nat Med.* 2011;17(10):1269-1274.
- Sobrado M, et al. Longitudinal studies of ischemic penumbra by using 18F-FDG PET and MRI techniques in permanent and transient focal cerebral ischemia in rats. *Neuroimage.* 2011;57(1):45-54.

## **Supplemental Methods**

### *Permanent middle cerebral artery occlusion (pMCAO)*

Experiments were performed on adult male Sprague-Dawley rats (250-300 g; Harlan Laboratories, Barcelona, Spain). All the experimental procedures were performed in accordance with the guidelines of the Animal Welfare Committee of the Universidad Complutense (DC 86/609/EU). Rats were anaesthetized with isoflurane (1.5-2% in a mixture of 80% synthetic air/20% oxygen) and their body temperature was maintained at  $37 \pm 0.5^\circ\text{C}$  during surgery using a servo-controlled rectal probe heating pad. The pMCAO was achieved by ligature as described previously (36), while in sham-operated control rats (sham) the MCA was exposed but not occluded. All rats were returned to their cages following surgery and sacrificed 24 hours later, except for those used in fMRI experiments.

Blood samples (100  $\mu\text{L}$ ) were collected from the femoral artery after cannulation and treated with 3.15% citrate buffer before it was centrifuged at 1,164 x g for 5 minutes to obtain plasma. Samples were frozen at  $-80^\circ\text{C}$  until the glutamate content was assayed. Further details of other methods can be found in Supplemental Methods.

### *Determination of infarct area*

The brain of each rat was removed 24 h after pMCAO and a series of coronal brain slices (2 mm; Brain Matrix, WPI, UK) were stained with 1% TTC (2,3,5-triphenyl-tetrazolium chloride; Merck) in 0.2 M phosphate buffer. Infarct size was determined as described previously (1); digital images (Nikon Coolpix 990, Nikon Corporation, Tokyo, Japan) of stained sections were used to delineate the infarct borders by an observer blind to the experimental conditions using an operator-controlled cursor. The infarct area that was not stained was determined by counting the pixels within the outlined regions of interest, expressed in square millimeters (ImageJ 1.33u software; National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA). The results were expressed as a percentage of infarct volume.

### *Rat peritoneal dialysis*

A port pre-attached 4 French silicone catheter (ID 0.25mm, OD 0.47mm) with dacron cuff and cross holes (Access Technologies, Skokie, Illinois, USA) was used for rat peritoneal dialysis. One hour before starting peritoneal dialysis, the catheter was implanted surgically under general anesthesia with the help of a needle. A midline incision was made through the abdominal skin and a hole was pierced close to linea alba using a 2mm diameter needle (16Gx2", OD 1.70mm, long 51 mm, Terumo Europe, Leuven, Belgium). The catheter (1.5 cm) was inserted in the incision and secured by suture of the superficial abdominal muscle fascia. Peritoneal dialysis was initiated by the infusion by gravity (flow rate 1.5-2 ml/min) of 10 ml dialysate containing: glucose, 8.3 mM, NaCl 140 mM, CaCl<sub>2</sub> 1.75 mM, MgCl<sub>2</sub> 0.5 mM, lactic acid 3.5 mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 10 mM (pH 6.5). The dialysate was maintained in the peritoneal cavity for 20 min, and then removed for glutamate analysis. This was followed by a second infusion with fresh dialysate.

### *Human peritoneal dialysis*

Peritoneal dialysis was performed by means of a permanent Tenckhoff silicone catheter with two cuff (Covidien, Madrid, Spain) located within the peritoneal cavity using the Seldinger blind technique and according to standard medical practice. The procedure takes 15 minutes. Peritoneal dialysate samples were collected at different times (0, 0.5, 1, 2, 3 and 4 hours) after infusion of 2000 cc of Physioneal (3.86%: Baxter, Madrid, Spain) and the samples were obtained by partial draining of the effluent at each time point. Glutamate levels were also quantified in dialysate samples obtained after 10 hours of dialysis from a previous nocturnal session.

Two venous blood samples were collected before and after the diurnal dialysis session and after 30 min at room temperature, the serum was centrifuged at 1,500 x g for 10 min and the supernatant was collected. Peritoneal effluent and serum samples were immediately frozen at -80°C.

### *Fluorimetric determination of glutamate*

Glutamate content in rat plasma, human serum and human peritoneal dialysate samples was assayed by on-line fluorometry, in which the increased glutamate concentration is reflected by an increase in fluorescence due to NADPH formation in the presence of glutamate dehydrogenase.

### *Electrode implantation and microstimulation for fMRI experiments*

Animals were anesthetized with urethane (1.2-1.5 g/kg, i.p.) and secured in a stereotaxic device. Stimulating electrodes were implanted using standard surgical and stereotaxic procedures, as described previously (2,3). A twisted platinum-iridium Teflon-coated bipolar electrode (200  $\mu$ m diameter, 10-15 k $\Omega$ ; A-M Systems, WA, US) was positioned in the corpus callosum for widespread activation of the cerebral cortex (0 mm anteroposterior and 1 mm lateral relative to bregma; 2.3 mm ventral to the dural surface (4)). The stimulating electrode was secured to the skull with dental cement and its position confirmed by means of anatomical scans, connecting the stimulating electrode to a constant current source and a pulse generator once in the scanner (STG2004, Multichannel Systems, Reutlingen, Germany). The stimulation protocol was a block design consisting of 10 periods of 4 s stimulation epochs, each followed by a resting epoch of 26 s (10 min in total), which was repeated 5 times per animal. Stimulation pulses were of 0.1 ms in duration, 0.5 mA in intensity and at a frequency of 10 Hz.

### *MR imaging*

For MRI experiments, urethane-anesthetized animals were placed in a custom-made animal holder with adjustable bite and ear bars, and positioned on the magnet chair. Their temperature, heart rate, SpO<sub>2</sub> and breathing rate were monitored throughout the session, and the experiments were carried out in a horizontal 7 Tesla scanner with a 30

cm diameter bore (Biospec 70/30v, Bruker Medical, Ettlingen, Germany). Functional MRI was performed in 15 coronal slices using a GE-EPI sequence applying the following parameters: FOV, 25 x 25mm; slice thickness, 1 mm; matrix, 96 x 96; segments, 1; FA, 60°; TE, 15ms; TR, 2000 ms. T2 weighted anatomical images were collected using a rapid acquisition relaxation enhanced sequence (RARE), applying the following parameters: FOV, 25 x 25 mm; 15 slices; slice thickness, 1 mm; matrix, 192 x 192; TE<sub>eff</sub>, 56 ms; TR, 2 s; RARE factor, 8. A 1H rat brain receive-only phase array coil with integrated combiner and preamplifier, and no tune/no match, was employed in combination with the actively detuned transmit-only resonator (Bruker BioSpin MRI GmbH, Germany).

Functional MRI data were analyzed offline using our own software developed in MATLAB, which included statistical parametric mapping packages (SPM2, [www.fil.ion.ucl.ac.uk/spm](http://www.fil.ion.ucl.ac.uk/spm)). After linear detrending, temporal (0.015-0.2 Hz) and spatial filtering (3 x 3 gaussian kernel of 1.5 sigma) of voxel time series, a general linear model or cross-correlation analysis, was applied with a simple boxcar model shifted forward in time, typically by 2 sec, or a boxcar convoluted with a gamma probability density function (MatLab), in order to account for the hemodynamic delay in the BOLD signal. Functional maps were generated from voxels that had a significant component for the model ( $P < 0.0001$ , uncorrected) and they were clustered together in space. Similar results were obtained with the different analytical methods.

#### *Limb-use asymmetry test*

Forelimb use during explorative activity was analyzed by videotaping rats in a transparent cylinder (20 cm diameter and 30 cm height) for 3-10 min depending on the degree of movement maintained during the trial. This test is appropriated to evaluate sensorimotor function in unilateral models of central nervous system injury (5). We scored simultaneous use of both forelimbs for contacting the wall of the cylinder during a full rear.

### *Statistical analyses*

Data are expressed as the means  $\pm$  SEM, and an analysis of variance (ANOVA Tukey's multiple comparison test) was used to compare the blood glutamate values before and at different times after pMCAO. The analysis of variance was also used to compare the infarct volume values in the different conditions (pMCAO, + dialysis (2.5h), + dialysis (5h), + dialysis (2.5h) 400 $\mu$ M GLU) with the corresponding value in the pMCAO condition. ANOVA followed by Bonferroni's test was used to compare the functionality index in the different conditions (control, pMCAO, + dialysis 2.5h). Two tailed Student's t-test was used to compare the following mean values: the volume of T2-hyperintensity in pMCAO and +dialysis (2.5h); the forelimb placing score in the different conditions (pMCAO, + dialysis 2.5h) with control; serum glutamate before and after a 4 hours of peritoneal dialysis session in patients. The relationship between plasma glutamate and infarct size was analyzed using the Pearson's correlation coefficient. **In all tests, a  $p < 0.05$  was considered significant.**

### **References for Materials and Methods**

- 1.- Hurtado O, et al. Delayed post-ischemic administration of CDP-choline increases EAAT2 association to lipid rafts and affords neuroprotection in experimental stroke. *Neurobiol. Dis.* 2008; 29(1): 123–131.
- 2.- Canals S, Beyerlein M, Murayama Y, Logothetis NK. Electric stimulation fMRI of the perforant pathway to the rat hippocampus. *Magn. Reson. Imaging* 2008; 26(7): 978-986.
- 3.- Canals S, Beyerlein M, Merkle H, Logothetis NK. Functional MRI evidence for LTP-induced neural network reorganization. *Curr Biol.* 2009; 19(5): 398-403.
- 4.- Paxinos G, Watson C. Eds. *Elsevier*. The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates, Academic Press; 2007.

5.- Schallert T, Fleming SM, Laesure JM, Tillerson JL, Bland ST. CNS plasticity and assessment of forelimb sensorimotor outcome in unilateral rat models of stroke, cortical ablation, parkinsonism and spinal cord injury. *Neuropharmacology* 2000; 39(5): 777-787.