



FACULTAD DE FARMACIA
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE

TRABAJO FIN DE GRADO

TÍTULO:

**NUEVAS DIANAS TERAPÉUTICAS EN EL TRATAMIENTO
DE LA ISQUEMIA CEREBRAL**

Autora: Alicia Celestino Cuadrado

Tutora: María Jesús Oset- Gasque

Convocatoria: Febrero 2018

ÍNDICE

RESUMEN

1. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES
 - 1.1 Diferencias entre el núcleo isquémico y zona de penumbra
 - 1.2 Progresión de la lesión tisular
 - 1.3 Tratamiento actual de la Isquemia Cerebral Aguda
2. OBJETIVOS
3. MATERIAL Y MÉTODOS
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN
 - 4.1 Neuroprotección Primaria
 - 4.2 Neuroprotección Secundaria
 - 4.3 Neuroprotección Terciaria
5. CONCLUSIÓN
6. BIBLIOGRAFÍA

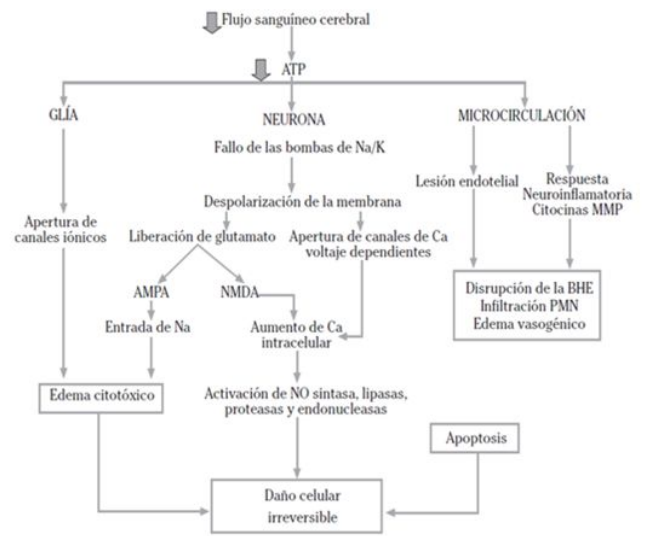
RESUMEN

La isquemia cerebral aguda se define como una enfermedad neurológica que ocurre por una disminución o bloqueo del flujo sanguíneo a parte del tejido cerebral. El síndrome más frecuente es el producido por la oclusión de la arteria cerebral media ACM (Medial cerebral arterial oclusión MACAO). La isquemia cerebral va a producirse por una reducción sostenida del flujo sanguíneo cerebral por debajo de 10 ml/mg/min que provoca necrosis cerebral con liberación de glutamato y entrada de calcio en las neuronas mediada por receptores NMDA de glutamato. Este bloqueo del flujo sanguíneo ocasiona la ruptura de los vasos sanguíneos, disminuyendo la cantidad de glucosa y oxígeno. A día de hoy, el tratamiento de elección es el activador tisular de plasminógeno recombinante (rt-PA), el único agente trombolítico disponible que presenta un período de efectividad muy estrecho lo que unido a sus exigentes riesgos de inclusión y sus efectos secundarios neurotóxicos hacen complicado su uso clínico. Un período de isquemia cerebral transitoria de 10 min puede producir un profundo daño neuronal que solo es evidente 3 días post-ictus y continúa progresivamente en los meses posteriores. Un alivio de la oclusión vascular es el primer método para tratar la isquemia, pero la instauración del daño independientemente de la recuperación del flujo sanguíneo hace necesaria la búsqueda de otras alternativas.

Palabras clave: Isquemia cerebral aguda, Síndrome de la arteria cerebral media (ACM), Receptores NMDA, Glutamato.

1. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

La isquemia cerebral aguda ocurre al disminuir o interrumpirse el flujo sanguíneo a parte del cerebro, con la consecuente disminución de la disponibilidad de oxígeno y glucosa. El consumo de oxígeno por parte del cerebro es aproximadamente el 20% del total de oxígeno del organismo, y debe mantener suficiente ATP a través de la cadena de transportadora de electrones en la mitocondria para restaurar los gradientes iónicos. Debido a la situación isquémica



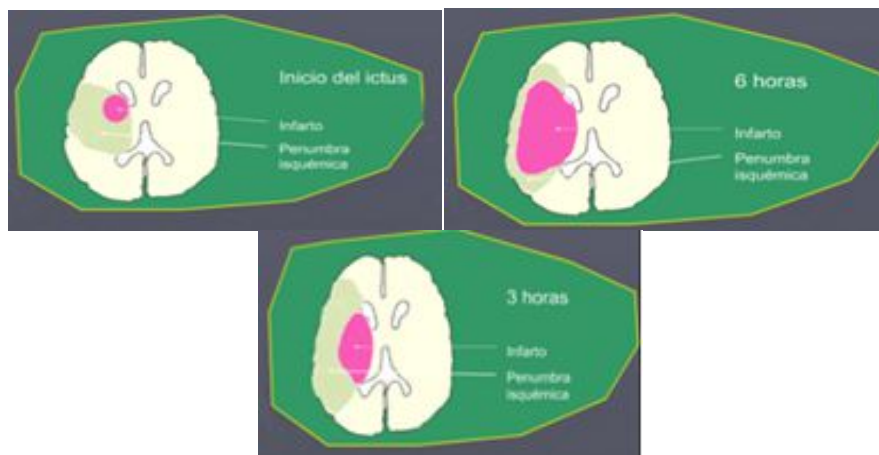
ocurre un fallo de la fosforilación oxidativa, reduciendo las concentraciones de Adenosina Trifosfato (ATP). Al disminuir las concentraciones de ATP, se desequilibra el balance energético, a causa de una interrupción en las bombas Na/k ATPasa, dando lugar a una despolarización de membrana, que libera potasio al espacio extracelular y permite la entrada de sodio. Este aumento de las concentraciones de sodio origina un transporte osmótico de agua que conduce a un edema citotóxico, lisis celular y necrosis.

La reducida producción de ATP seguido del desequilibrio Na/K contribuye a reducir la recaptación de glutamato. Esta condición provoca una sobreestimulación de los receptores de glutamato (NMDA y AMPA), y a consecuencia de estimula el flujo de calcio, produciendo una serie de eventos. El flujo de calcio inicial seguido de la estimulación glutamatérgica desencadena una segunda acumulación de calcio intracelular, y esta segunda respuesta está estrechamente relacionada con la muerte neuronal. Las bombas de calcio se ven afectadas por un aumento de la concentración de este ion durante la isquemia, lo que conduce a la activación de proteínas apoptóticas como proteasas calcio-dependientes, lipasas y Dnasas resultantes del daño celular en el núcleo isquémico. El glutamato es crítico en la neurodegeneración dando lugar a la generación de radicales libres, una activación transitoria de la permeabilidad mitocondrial y una excitotoxicidad neuronal. La excitotoxicidad es en esencia una exageración de los efectos excitatorios neuronales. Estos cambios homeostáticos pueden ser el detonante de la aparición de fenómenos como son la apoptosis y la necrosis. La despolarización de otras neuronas produce un aumento del flujo de calcio y de la liberación de glutamato que amplifica el daño isquémico. [1,2,3]

1.1 Diferencia entre núcleo isquémico y penumbra

Existen dos áreas separadas en el cerebro durante la isquemia cerebral aguda: el núcleo isquémico y la zona de penumbra. Unos minutos después del infarto cerebral, el núcleo isquémico experimenta una reducción del flujo sanguíneo, lo que da como consecuencia una muerte celular. Mientras la necrosis ha ocurrido en las primeras horas de instauración de la isquemia en el núcleo isquémico. La ruptura de la homeostasis iónica, la lipólisis y proteólisis conduce a una fragmentación de la membrana celular en el núcleo isquémico.

La apoptosis en el área de penumbra ocurre después de varias horas o días una vez ocurrida el infarto cerebral. En esta zona la cascada isquémica produce una disminución del potencial eléctrico, pero sigue siendo metabólicamente activo. Sin embargo, al darse la reperusión, las neuronas de esta área podrían restaurar sus potenciales de membrana. La muerte celular y neuronal en el núcleo isquémico y en el área de penumbra son fenómenos temporal y espacialmente separados. Aun así, encontramos marcadores de apoptosis y necrosis que pueden presentarse simultáneamente en la misma célula, por lo que más de una vía de muerte celular puede ocurrir al mismo tiempo.



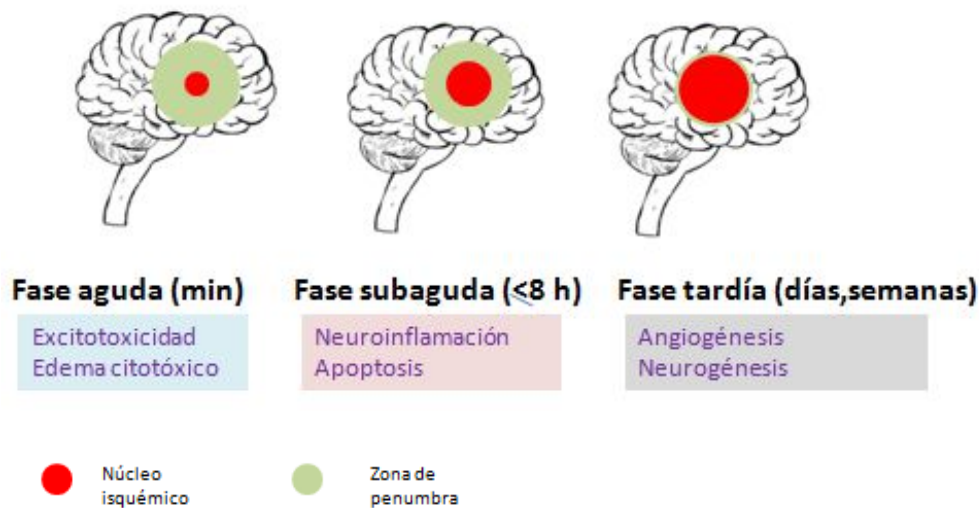
1.2 Progresión de la lesión tisular

La progresión del infarto cerebral puede diferenciarse en tres fases.

A los minutos de comenzar la isquemia se sucede una primera fase aguda, ocurre un fallo energético y la despolarización de la membrana celular dando lugar a excitotoxicidad y edema citotóxico. Posteriormente, se producen radicales libres, dañando la Barrera Hematoencefálica y el ADN. A partir de las 3 horas, el núcleo isquémico se expande en la penumbra, ocupando más del 50% de la lesión.

Como segunda etapa distinguimos el período subagudo que ocurre a las 6-8 horas a partir del comienzo de la lesión, se da lugar a una extensión de la zona post-infarto y alteraciones bioquímicas que ocasionan un daño molecular: apoptosis e inflamación por la activación de caspasas, citoquinas, quimioquinas, infiltración de leucocitos, activación microglial, aumento de la producción de radicales libres de oxígeno, aumento de prostaglandinas y leucotrienos, y la producción del edema vasogénico.

Como tercera y última situación entendemos la fase tardía, que ocurre a los días o semanas, el edema vasogénico produce inflamación y muerte celular programada, la lesión sigue su progreso que finaliza en neuroplasticidad, angiogénesis y neurogénesis.

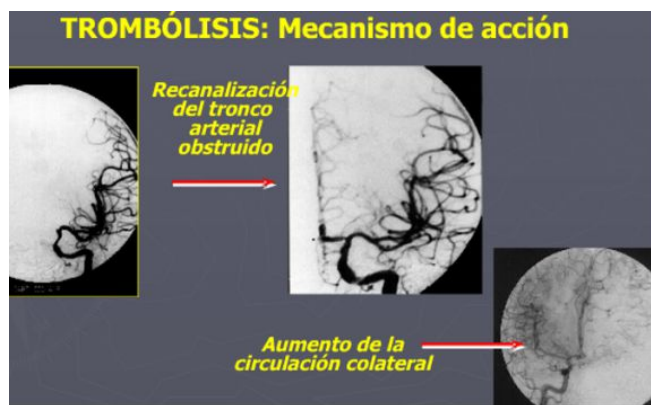


1.3 Tratamiento actual de la isquemia cerebral aguda

El objetivo del tratamiento actual es restablecer el flujo sanguíneo y limitar la afectación neurológica. Las actuaciones dentro de la ventana terapéutica se pueden dividir en dos tipos:

- Ventana de reperusión: cuyo objetivo es mejorar la perfusión mediante terapias recanalizadoras como trombolisis, angioplastia, STENT y terapias combinadas.
- Ventana de neuroprotección para evitar o limitar el daño mediante una acción no farmacológica o una acción farmacológica (tensión arterial, glucemia y fármacos neuroprotectores).

En la actualidad, el único tratamiento efectivo para la isquemia cerebral es la trombolisis mediante la administración del activador tisular de plasminógeno recombinante. Es el único agente trombolítico disponible en el infarto cerebral, sin embargo, tiene un periodo de efectividad muy estrecho, por lo que solo es efectivo en una minoría de pacientes (<10%) afectados por esta patología.



Existen muchos factores que afectan a un mayor riesgo de hemorragia como son: hiperglucemia, antecedentes de diabetes, HTA, gravedad basal de los síntomas, edad avanzada, cambios precoces de isquemia en la Tomografía Axial Computerizada, tamaño de la lesión isquémica en la Resonancia Magnética Nuclear, leucoaraiosis (pérdida difusa de densidad en regiones de la sustancia blanca del cerebro), retraso en el tratamiento, tratamiento previo con antiagregantes, antecedentes de insuficiencia cardíaca congestiva, etc.

El tiempo es un factor fundamental, un retraso de 20 o 30 minutos disminuye la mejora clínica en un 10-20%. La reducción aparente en el beneficio del tratamiento por encima de las 3 h no se debe al aumento de las hemorragias cerebrales, sino a la progresiva reducción del área de penumbra. El beneficio es mayor si los pacientes se seleccionan mediante imágenes radiológicas para detectar el área de penumbra. No obstante, el beneficio del tratamiento es mayor cuanto antes se aplique, sobretodo antes de los 90 minutos. Como criterios de inclusión: diagnóstico clínico de Ictus isquémico agudo con un comienzo de los síntomas dentro de las 3 horas previas al inicio del tratamiento trombolítico, edad entre 18 y 80 años, sin visualización en el TAC de una hemorragia ni infarto mayor de 1/3 del territorio vascular de la ACM. Los criterios de selección son muy estrictos por el alto riesgo de hemorragias. Como criterios de exclusión encontramos la ingesta de anticoagulantes o heparinas 48 horas previas, pancreatitis aguda, endocarditis bacteriana, ictus previo y diabetes concomitante, convulsiones al inicio del ictus, etc.

Algunos problemas del tratamiento trombolítico intravenoso son, por ejemplo, la poca recuperación funcional (40%), la estrechez de la ventana terapéutica, la escasez de enfermos que reúnen estas características, la gravedad de las complicaciones y la desconsideración de la ventana biológica. A esto se le suma que la selección por Tomografía Computerizada plantea dudas, la mala respuesta en oclusión de vaso grande y la baja tasa de recanalización (40%).

El uso de tPA tiene como contraposición su acción hemorrágica al interactuar con los receptores de lipoproteínas de baja densidad (low-density lipoprotein receptor-related protein 1 LRP-1) aumentando la permeabilidad de la barrera hematoencefálica. Así como su acción trombolítica y neurotóxica al interactuar con receptores NMAD.

2 OBJETIVOS

El objetivo de esta revisión bibliográfica es reunir la información más relevante sobre la búsqueda de nuevas dianas terapéuticas en el tratamiento de la Isquemia Cerebral.

3 MATERIAL Y MÉTODOS

Para la realización de este trabajo se ha llevado a cabo una revisión bibliográfica del tema tratado utilizando distintas fuentes de información. Se han consultado artículos de investigación clínica, bases de datos, libros de texto, revistas científicas y páginas web. En el apartado de bibliografía se detalla la lista de fuentes consultadas.

4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Neuroprotección Primaria.

En los primeros minutos de la lesión, el daño se debe a un fallo energético y al aumento de la excitabilidad por depleción de oxígeno, aumento de los niveles de calcio y glutamato, así como la producción de radicales libres. La neuroprotección primaria tiene como objetivo aumentar la resistencia de la neurona frente al daño isquémico si se instaura en los primeros momentos, una protección endógena anti excitabilidad. El papel de los receptores NMDA en la entrada de calcio durante la patogénesis del ictus podría ser tratada con antagonistas de NMDAR, y bloqueantes de canales de calcio. La protección contra la hipoxia neuronal in vitro y la isquemia cerebral in vivo se puede lograr mediante antagonistas directos del receptor NMDA, antagonistas del receptor AMPA (el cual es necesario para la activación de NMDAR), antagonismo simultáneo de ambos o antagonismo de canales de sodio y calcio voltaje-dependientes.

Antagonistas de los receptores NMDA

Antagonizar directamente los receptores NMDA parece ser suficiente para adquirir neuroprotección contra la muerte neuronal hipoxémica comparada con la co-antagonización de diferentes receptores excitotóxicos y fuentes de calcio. El receptor NMDA es normalmente bloqueado por iones magnesio y solo responderá al glutamato cuando este magnesio sea eliminado durante la despolarización. El Magnesio Sulfato, que puede a su vez impedir la liberación de glutamato y antagonizar los receptores de NMDA de manera no competitiva, ha mostrado buenos resultados en estudios con animales y estudios de fase II en pacientes con ictus , pero no en ensayos de fase III, dando lugar a efectos secundarios y mala farmacocinética [5].

Un antagonista no competitivo de los receptores NMDA, es el Aptinganel (Cerestat) cuyos efectos neuroprotectivos se estudiaron en modelos con ratas con isquémica focal, actuando como protector de la materia gris y de la materia blanca cerebral y previniendo la degeneración de la mielina y los axones . Pero al mostrar limitaciones en ensayos en humanos, debido a su falta de eficacia y al potencial ratio de mortalidad, se declaró desfavorable el balance beneficio/riesgo para poder continuar con la investigación. [6]

Otros antagonistas no competitivos son el dextrometorfano, que ha mostrado tener propiedades neuroprotectivas; la molécula MK-801, la cual atraviesa la barrera hematoencefálica permitiendo su administración sistémica y ha demostrado ser efectiva en modelos in vivo e in vitro de isquemia [4]; y la memantina. Ésta última se ha testado a una dosis óptima sobre receptores sinápticos y extra sinápticos, al realizar una curva dosis-respuesta se ha obtenido una ventana terapéutica que muestra que actúa sobre los receptores extra sinápticos en mayor medida; siendo más baja su acción en los receptores sinápticos. Al salirse de la dosis óptima se

bloqueaban los dos a la vez, ya que posee una ventana terapéutica estrecha. Esta situación nos interesa ya que sugiere que la memantina actuaría solo a nivel de los receptores extrasinápticos y no comprometería la



función de receptores sinápticos con función de supervivencia. A nivel preclínico ya se ha usado en isquemia, a nivel clínico solo ha sido usado en la enfermedad del Alzheimer. Estudios avalan la posibilidad de su uso en el tratamiento de la isquemia cerebral, por su papel como bloqueante de los receptores NMDA. [7]. Pero otra hipótesis en vías de

investigación es la posibilidad de que la memantina no actúe solamente como bloqueante de los receptores de NMDA, sino que pueda disminuir la apoptosis celular mediante la eliminación de la vía calpainas-caspasa 3. Esta vía es activada por el flujo de calcio ocasionado por la liberación de glutamato mediada por los receptores NMDA. [8]

El receptor NMDA también posee un sitio de unión a la glicina y un sitio de unión a poliaminas, y el canal catión solo se abrirá en respuesta a glutamato si glicina y poliamina están ya unidas a estos sitios específicos. Por eso se estudiaron antagonistas selectivos como Gavestinel (GV150526) y Licostinel (ACEA1021), que se unen al sitio de la glicina, y fueron desarrollados con el intento de reducir los efectos secundarios que se observaron en los antagonistas convencionales de NMDAR cuyo blanco eran los sitios de unión del glutamato o el canal poro NMDAR. Como los antagonistas convencionales, gavestinel y licostinel son fuertemente protectivos contra el daño de la isquemia neuronal in vivo.

En estudios con animales tratados con MK-801 se han observado cambios patomorfológicos en neuronas. Consecuente con lo observado en estos ensayos en animales, antagonistas de NMDAR que se unen al sitio de unión al glutamato y al canal poro causan sedación y efectos secundarios psicomiméticos en humanos. Antagonistas selectivos al sitio de unión a la glicina de NMDAR son bien tolerados y muestran ausencia de efectos secundarios, incluyendo los cambios patomorfológicos y la disfunción neuronal, ambos en estudios con animales y en ensayos clínicos; sin embargo, pacientes que recibieron este tratamiento no mostraron una mejoría en los resultados del ictus.[4]

Los receptores NMDA son estructuras macromoleculares que se forman por combinaciones de diferentes subunidades: NMDAR1 (NR1), NMDAR2 (NR2) y (NR3). La NR1 está codificada por un gen único, sin embargo, el transcrito puede generar al menos ocho isoformas, mientras que para las subunidades tipo NR2 existen cuatro genes diferentes que codifican para las subunidades NR2A, NR2B, NR2C y NR2D. En el ictus, NR2A y NR2B son necesarias para la supervivencia y muerte neuronal mediada por glutamato. Dado que GluN2A tiene un papel en la función neuronal, incluyendo el LTP (long-term potentiation) en la eficacia sináptica y la señal de supervivencia neuronal mediada por NMDAR, se estudió la posibilidad de diseñar inhibidores específicos de GluN2B. [2,4] Un ejemplo de esto es el ifenprodil, un antagonista selectivo de GluN2B. Este tipo de antagonistas selectivos por GluN2B tienen una gran efectividad contra la muerte neuronal isquémica in vitro e in vivo, y no están asociados a la aparición de efectos secundarios neurológicos como otros antagonistas convencionales de NMDAR. Además, como los antagonistas específicos al sitio de unión de la glicina, no inducen cambios patomorfológicos en el cerebro de las ratas de

estudio. Ifenprodil y sus derivados (eliprodil, taxoprodil), como los bloqueadores no específicos de NMDAR, solo son efectivos al ser administrados inmediatamente después de ocurrir el ictus, y pierden rápidamente su eficacia cuando el tratamiento se retrasa. Esta estrecha ventana terapéutica hace difícil su uso clínico. [4]

Ya sea mediante antagonistas competitivos o no competitivos, todos actúan inhibiendo el sitio de unión del glutamato, el sitio de unión de la glicina o el canal poro en el tratamiento del daño isquémico. Ninguna de estas moléculas dirigidas a los receptores NMDA ha sido aprobada para su uso clínico, y muchos de estos compuestos han fallado en aspectos de sus estudios clínicos. La razón del fracaso en los estudios clínicos puede ser debido a que los bloqueantes de NMDAR producen muchos efectos secundarios, como efectos psicóticos; o debido a la existencia de funciones neurológicas que necesitan del funcionamiento de estos receptores, por ello es importante buscar la manera de bloquear receptores extrasinápticos, y no aquellos que tengan un papel en la supervivencia. A su vez los bloqueantes de NMDAR tiene una estrecha ventana terapéutica para su administración, solo son efectivos cuando se administran antes o inmediatamente después del ictus.

Otra de las hipótesis sugiere el papel que desempeña el glutamato en la fase neurodestruccion posterior al daño isquémico, aunque una vez pasado este periodo, el glutamato asume sus funciones normales fisiológicas que incluyen la promoción de la supervivencia neuronal. Por todo esto se piensa que los antagonistas de NMDAR han fallado en ensayos clínicos de isquemia en humanos debido a que el bloqueo de la transmisión sináptica mediada por los receptores NMDA impide la supervivencia neuronal. [9]

Antagonistas de los receptores AMPA

El receptor del ácido α -amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazolpropiónico (AMPA) es un receptor transmembrana ionotrópico de glutamato, necesario para la activación de los receptores NMDA.

Perampanel, antagonista no competitivo de los receptores AMPA con buena disponibilidad oral y propiedades farmacocinéticas, ha mostrado reducir el edema cerebral en MCAO inducido en ratas, así como el volumen de la lesión infartada y la apoptosis neuronal. Perampanel disminuye la expresión de citoquinas proinflamatorias como son IL-1 β y TNF α , e inhibe la generación de óxido nítrico posterior a la oclusión de la arteria cerebral media. [10]

NBQX (2,3-Dihydroxy-6-nitro-7-sulphamoyl-benzo(f)quinoxaline), anticonvulsivo y sedante, es un antagonista no selectivo del receptor NMDA y antagonista selectivo competitivo del receptor AMPA ha mostrado su función neuroprotectiva retrasando la muerte neuronal en modelos in vivo de isquemia transitoria global. Sin embargo, ha sido estudiado junto con Cerestat, un antagonista del receptor NMDA, mostrando el Cerestat una mayor recuperación de las disfunciones neuronales que NBQX a los mismos tiempos. [11, 12]

Mientras los antagonistas de NMDAR fallaban en los ensayos clínicos por sus efectos secundarios y su estrecha ventana terapéutica, los antagonistas de AMPAR derivados de quinoxalinediona no pueden ser usados en humanos por su insolubilidad y la posibilidad de producir toxicidad renal. Otra quinoxalinediona es ZK200775 (MPQX), un antagonista selectivo y competitivo del receptor AMPA, estudios en pacientes sanos han mostrado tolerancia a este agente y estudios en modelos experimentales de isquemia cerebral transitoria ha mostrado neuroprotección, y una ancha ventana terapéutica en modelos de oclusión de la arteria media cerebral en ratas. Pero el mostrar efectos sedativos y disfunción neuronal en ensayos de doble ciego en los que se estudiada su tolerancia y seguridad hace imposible su desarrollo como agente en este ámbito. [13]

YM872, un antagonista del receptor AMPA fue co-administrado con t-PA para investigar los efectos en un modelo de ictus embólico en ratas. Administrados separados 2 horas después del embolismo, el volumen de la zona infartada disminuyó, pero al administrarlos conjuntamente se demostró un aumento de los efectos neuroprotectivos quedando patente la sinergia de los dos agentes. Es neuroprotectivo al disminuir la pérdida de tejido cortical y edema cerebral después de un daño isquémico. [14,15]

Inhibidores de transportadores de glutamato

Los transportadores encargados de la recaptación de glutamato son esenciales durante la transmisión sináptica retirando el glutamato de la hendidura sináptica, por lo que una inhibición crónica de la recaptación neuronal y/o de la glia induce a una excitotoxicidad. Sin embargo, estos transportadores pueden ejercer el efecto contrario en situaciones de fallo energético como durante la isquemia, liberando glutamato al espacio extracelular. Una aproximación para prevenir el daño cerebral mediado por el glutamato es reducir la concentración extracelular de glutamato mediante la acción sobre transportadores específicos de este neurotransmisor. Los transportadores de aminoácidos excitatorios EAATS (excitatory amino acid transporter) intercambian glutamato por iones potasio, de la hendidura sináptica y sitios extrasinápticos, mediante su recaptación hacia neuronas y astrocitos. En la isquemia

estos transportadores se revierten y liberan glutamato, lo que les convierte en una diana importante. Por lo que EAATs media ambos procesos durante la isquemia: la liberación (transporte contrario) y la recaptación de glutamato. Se diferencian subtipos de transportadores de glutamato como GLT-1 (EAAT2) y GLAST (EAAT1). Un aumento de la expresión de GLT-1 protege contra el daño isquémico. La modulación farmacológica aumentando la actividad de EAAT1 en ensayos clínicos con ratas afectadas por un oclusión cerebral de la arteria media han mostrado resultados positivos en cuanto a una recuperación de la función neuronal después de ocurrido el daño. [16]

El inhibidor HIP (hydroxy-tetrahydro-pyrrolo-isoxazole carboxylic acid), que inhibe selectivamente la recaptación contraria de glutamato (mediada por EAAT) en lugar de la recaptación de glutamato, ha mostrado tener un papel neuroprotectivo durante la isquemia. En comparación, el inhibidor general de transportadores de glutamato DL-TBOA (DL-threo-benzyloxyaspartic acid) y altas dosis no selectivas de HIP no son neuroprotectivas y pueden exacerbar el daño isquémico neuronal. [4,17]

Una terapia combinada de un antagonista del receptor NMDA como es el MK-80, el cual ha fallado en los ensayos clínicos debido a su estrecha ventana terapéutica; y un agente promotor del transportador de glutamato de astrocitos GLT-1 post-isquemia (ácido maslínico) ha mostrado tener efectos sinérgicos, aumentándose la ventana terapéutica del agente MK-801 e induciendo efectos neuroprotectivos. [2]

Inhibidores de canales de sodio y calcio voltaje dependientes

Bloqueando los canales presinápticos se evita la despolarización y la liberación de glutamato. Se ha buscado diseñar bloqueantes específicos para los canales de sodio y calcio voltaje dependientes.

El Lubeluzol bloquea los canales de sodio, y además de inhibir la neurotoxicidad por el óxido nítrico, reduce el daño isquémico en modelos experimentales con ratones, demostrando una reducción de la mortalidad en estudios de fase II, pero siendo ineficaces en estudios de fase III. [18]

Un importante bloqueador de canales de calcio es el nimodipino. No se han encontrado evidencias para asumir que este agente tenga un papel importante en salvar la vida de estos pacientes una vez sufrida la isquemia cerebral. En un estudio reciente se combinó telmisartán y nimodipino, siendo la hipertensión uno de los principales factores de riesgo en la isquemia cerebral. Este estudio muestra que su administración antes de la isquemia protege a las

neuronas del daño por la reperfusión isquémica por energía dependiente de la regulación de aminoácidos excitatorios. [19]

Estos agentes tienen el beneficio de inhibir la liberación isquémica de glutamato bloqueando la recaptación contraria mientras potencian la transmisión fisiológica de glutamato bloqueando la recaptación de glutamato. Son más seguros que los antagonistas de receptores de NMDA, al no producir neurotoxicidad en regiones no isquémicas. Sin embargo, pocas moléculas han pasado los ensayos requeridos para su uso clínico.

4.2 Neuroprotección Secundaria

Después de la instauración de la lesión isquémica, se busca incidir en procesos tardíos que llevarán a la muerte neuronal, como es la inflamación y la apoptosis. Interfiriendo en la acción de ciertas citoquinas proinflamatorias, enzimas y receptores, se intenta evitar la progresión de la isquemia y evitar la muerte neuronal.

Citoquinas proinflamatorias

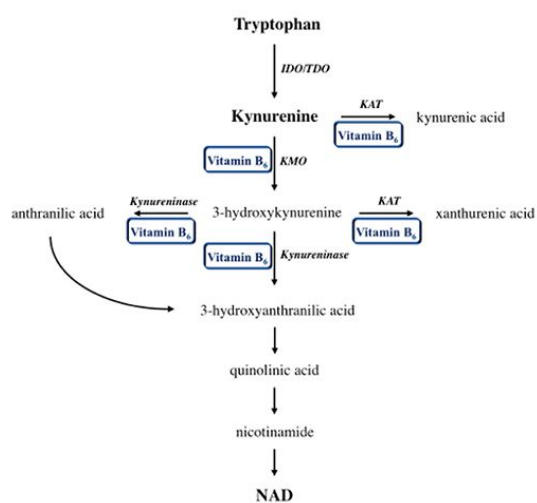
La interleuquina 1 (IL-1) aumenta después de una isquemia permanente o momentánea en microglia, astrocitos y neuronas. IL-1 interacciona con los receptores NMDA, aumentando la entrada de calcio. Potencia la inflamación reclutando neutrófilos y la expresión de moléculas de adhesión como son las e-selectinas, ICAM-1, ICAM-2, VCAM-1, aumentando la infiltración de leucocitos en la Barrera Hematoencefálica. En modelos con ratones con IL- $\alpha\beta$ knock-out se obtuvieron resultados con un menor volumen infartado que el control. La administración de antagonistas recombinantes de receptores IL-1 disminuye el tejido necrosado y el volumen infartado[2]. El antagonista del receptor de Interleuquina 1 (IL-1RA) es el inhibidor natural de IL-1, pero la barrera hematoencefálica limita su penetración, impidiendo su correcta acción neuroantiinflamatoria. Actualmente, se estudia la posibilidad de fusionar IL-1RA con un péptido que permita su penetración (PEP). Así, mediante la actuación de IL-1RA-PEP se reduciría la expresión de IL-6, TNF- α y ROS, aliviando el daño ocasionado en la reperfusión durante la isquemia. [20]

Por otro lado, NF-K es un factor involucrado en la activación de varios genes proinflamatorios: TNF α , ICAM-1, IL-6, iNOS, COX2. Tnf- α . Promueve la infiltración de neutrófilos induciendo la expresión de moléculas de adhesión en células endoteliales e interrumpe la barrera hematoencefálica estimulando a otros mediadores inflamatorios. En ensayos con ratones se demostró que la administración de anticuerpos anti-TNF y la unión de

proteínas TNF α disminuye el volumen infartado.[2] A día de hoy, se estudia la posibilidad de que el canabidiol (CBD) cause una reducción del volumen infartado, el edema cerebral y la permeabilidad de la barrera hematoencefálica, interfiriendo en la expresión de TNF α durante el daño isquémico.[21]

L-quinurenina-AhR

La L-quinurenina es un metabolito que proviene de la degradación del L-triptófano por las enzimas triptófano-2,3-dioxigenasa (TDO) o indolamina-2,3-dioxigenasa (IDO). Además de ser uno de los 20 aminoácidos que constituyen las proteínas, el triptófano es también un precursor para la síntesis de la serotonina y la L-quinurenina en condiciones fisiológicas. L-quinurenina es un metabolito intermedio de la vía metabólica que termina con NAD⁺, quinurénico y ácido xanturénico. La mayoría de los metabolitos de la vía de quinurenina son neuroactivos y tienen funciones esenciales en la regulación de NMDA (N-metil-D-aspartato), la función del receptor y la producción de radicales libres.



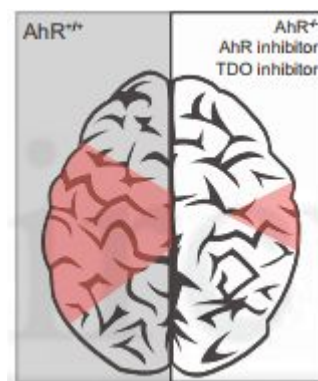
La L-quinurenina interacciona con el Receptor de Hidrocarburos Aromáticos o Receptor de Dioxina (AhR ArylHydrocarbon Receptor AhR), que está inactivo en condiciones basales y retenido en el citoplasma celular unido a proteínas chaperonas. Al unirse sus ligandos, como pueden ser L-quinurenina o contaminantes ambientales (dioxinas), se da la

activación del receptor, que pasa al núcleo, y se une al ADN para inducir cambios en la expresión de genes. Esta señalización tiene un papel importante en el desarrollo fisiopatológico y en la modulación de señales inflamatorias. Esta vía de señalización, la L-quinurenina-AhR, puede participar en la lesión cerebral isquémica abriendo la posibilidad al estudio de una nueva diana terapéutica.

La L-quinurenina se acumula en el cerebro durante la isquemia aguda al aumentar la concentración de la enzima TDO (triptófano-2,3-dioxigenasa), uniéndose como un ligando endógeno a AhR, inhibiendo la señalización de CREB (proteína de unión al elemento de respuesta de Camp), un factor de transcripción con funciones neuroprotectoras. Bloqueando

farmacológicamente esta enzima, TDO, se disminuyen los niveles de L-quirunenina, se inhibe la activación de AhR, disminuyendo el tamaño de la zona infartada y los déficits neurológicos.

En modelos experimentales en ratones con un ictus inducido por la oclusión de la arteria cerebral media (MCAO) se ha visto que tras el daño isquémico los niveles proteicos, la traslocación nuclear y la actividad transcripcional del receptor AhR están aumentados en las neuronas de la corteza cerebral. Otros experimentos con ratones deficientes genéticamente en AhR en los que se ha observado una mejora en la angiogénesis inducida por la isquemia han corroborado su papel en la lesión isquémica. El siguiente paso será saber si la manipulación de dianas terapéuticas como la enzima TDO o el receptor AhR pueden tener beneficio en la reperfusión y aumentar la ventana durante la cual la revascularización cerebral es efectiva. [22,23]



Drp-1: Dynamin related protein

En el hipocampo se distinguen distintas áreas: CA1, CA2, CA3 y CA4. CA1 es un área particularmente sensible a la hipoxia, mientras CA2 y CA3 son medianamente resistentes a la hipoxia. La resistencia de las neuronas CA3 y la tolerancia a la isquemia conferida por las precondiciones isquémicas (IPC Ischaemic preconditioning, adaptación al estrés isquémico precedido de períodos cortos de isquemia y reperfusión) son dos mecanismos neuroprotectivos conocidos. La resistencia de las neuronas a la isquemia depende en parte de su habilidad para mantener la homeostasis mitocondrial. La mitocondria juega un papel en procesos de producción de ATP, apoptosis, generación de radicales libres y la homeostasis del calcio.

El constante estado de los procesos de mitosis y fusión es responsable de condiciones como neurodegeneración y degradación mitocondrial. El proceso de mitosis mitocondrial está inducido en respuesta a una situación de hipoxia e isquemia en el cortex, seguido de una disminución de la mitosis y una acumulación de la mitocondria dañada. El principal control de la mitosis mitocondrial es una GTPasa, dynamin related protein (Drp-1), que conduce a la mitosis cuando se trasloca desde el citosol hasta el exterior de la membrana mitocondrial. La expresión de Drp-1 se ve aumentada en el cortex después del estrés isquémico, ya que es requerida para la eliminación de la mitocondria dañada a través de mitofagia. Un aclaramiento

a tiempo del daño mitocondrial puede evitar consecuencias del daño ocasionado por ROS, sobrecarga de calcio y apoptosis.

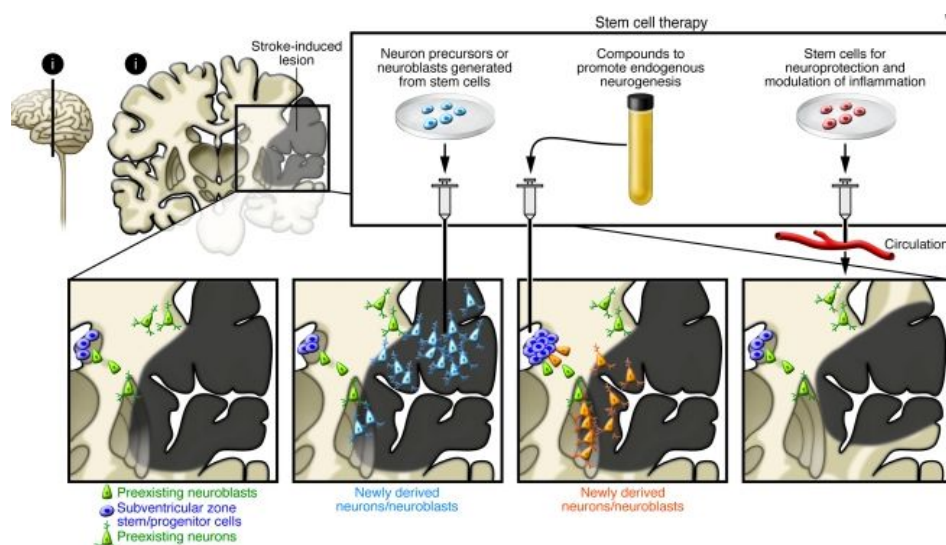
La translocación de Drp-1 al exterior de la membrana mitocondrial en CA3 está aumentada en respuesta a una isquemia global. Drp-1 mitocondrial está también sobrerregulada en CA1 después de una situación isquémica, mejorando la resistencia celular y protegiendo a las neuronas del daño isquémico. Basado en estos resultados se silenciaron in vitro la expresión de Drp-1 o se bloqueo la translocación de Drp-1 con un inhibidor selectivo in vivo. Como resultado, se confirmó la contribución neuroprotectora de Drp-1 en la resistencia de las células de CA3. Drp-1 se presenta como un agente protector contra la isquemia facilitando la vía autofágica y la eliminación de la mitocondria dañada. [24]

4.2 Neuroprotección Terciaria

La neuroprotección terciaria busca potenciar la capacidad de recuperación del tejido nervioso a largo plazo, a nivel post-isquémico. En este punto de la lesión se estudia el trasplante de células madre. La neurorreparación y neurorregeneración mediante la administración de células madres pluripotenciales reduce el volumen de la lesión y mejora la recuperación después de una situación de isquemia y reperfusión cerebral, favoreciendo el reemplazo de neuronas y células gliales dañadas, así como la remielinización, las acciones tróficas y la modulación de la inflamación.

Diferentes tipos de células madre pluripotenciales han sido estudiadas: MSCs: mesenchymal stem cells; UCBCs: umbilical cord blood cells; DSCs: dental stem cells; ESCs: embryonic stem cells; BMSCs: bone marrow stem cells; NSCs: neural stem cells.

Pero son principalmente las células madre neuronales (NSCs) y las células madre mesenquimales (MSCs) las cuales han mostrado mejorar la función post isquémica en ratas por diversos mecanismos: ya sea mediante su inyección por vía sistémica para la mejora de la neuroprotección y la inflamación, la generación de precursores neuronales o neuroblastos, o por actuación de compuestos que promueven la neurogénesis provenientes de células madre de la zona subventricular.



Terapias basadas en la utilización de células madre en el tratamiento de la isquemia cerebral. [25]

La inyección intravenosa de células madre neuronales humanas (NSCs) induce una mejora en el daño isquémico después de un ictus hemorrágico en ratas, promueve la angiogénesis al aumentar el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF). En ensayos con ratas, al administrar este tipo de células madre tres días después de ocurrir la isquemia, se vio una disminución de la inflamación, y la formación de la cicatrización de la glía, aumentando la recuperación funcional, la cual se observa 18 días después de darse la lesión. Este último dato indica que la ventana terapéutica es más amplia utilizando células madre neuronales.

Por otro lado, la inyección intravenosa de células madre mesenquimales humanas (MSCs) reduce los déficits inducidos por la isquemia, favoreciendo el aumento del flujo sanguíneo cerebral. Células embrionarias humanas derivadas de MSCs, fueron administradas por vía intravenosa en ensayos con ratas y se observó la migración de éstas hacia la zona infartada, expresando marcadores celulares neuronales y endoteliales. Estos resultados corroboraron su función neuroprotectora.

Otro mecanismo estudiado es la estimulación endógena de la neurogénesis. En la isquemia, células madre neuronales y otros precursores neuronales aumentan su proliferación en la zona Subventricular, diferenciándose en neuroblastos y migrando al área infartada. La limitación que encontramos en esta técnica es la escasa supervivencia de los neuroblastos formados, apenas un 20% de los iniciales. Mediante el uso de agentes que modulen la inflamación, factores neurotróficos o inhibidores de caspasas se podría optimizar el proceso de neurogénesis. Como último recurso, estimular la diferenciación de neuronas corticales ha sido estudiado ya que su formación se encuentra disminuida una vez instaurada la lesión isquémica. [25]

5. CONCLUSIÓN

El estudio del desarrollo de la lesión isquémica, así como su abordaje para evitar o limitar el daño cerebral, ha permitido descubrir nuevas dianas terapéuticas. Sin embargo, los investigadores se encuentran con limitaciones que impiden desarrollar una terapia útil a nivel clínico. El reto de la ciencia del Siglo XXI es superar estas limitaciones, sabiendo que nos enfrentamos al desconocimiento del total funcionamiento de la máquina más compleja e imprevisible del cuerpo humano, nuestro cerebro.

6. BIBLIOGRAFÍA

1. Radak D, Katsiki N, Resanovic I, Jovanovic A, Sudar-Milovanovic E, Zafirovic S, Mousad SA, Isenovic ER¹. Apoptosis and Acute Brain Ischemia in Ischemic Stroke. *Curr Vasc Pharmacol*. 2017;15(2):115-122. doi: 10.2174/1570161115666161104095522.
2. Khoshnam SE¹, Winlow W^{2,3}, Farzaneh M⁴, Farbood Y⁵, Moghaddam HF⁵. Pathogenic mechanisms following ischemic stroke. *Neurol Sci*. 2017 Jul;38(7):1167-1186. doi: 10.1007/s10072-017-2938-1. Epub 2017 Apr 17.
3. Simone Vidale, ^a Arturo Consoli, ^b Marco Arnaboldi, ^a and Domenico Consoli Postischemic Inflammation in Acute Stroke *J Clin Neurol*. 2017 Jan; 13(1): 1–Published online 2016 Dec 30. doi: 10.3988/jcn.2017.13.1.1
4. Lai TW¹, Zhang S², Wang YT³. Excitotoxicity and stroke: identifying novel targets for neuroprotection. *Prog Neurobiol*. 2014 Apr;115:157-88. doi: 10.1016/j.pneurobio.2013.11.006. Epub 2013 Dec 17.
5. Muir, K.W., Lees, K.R., Ford, I., Davis, S., 2004. Magnesium for acute stroke (intravenous magnesium efficacy in stroke trial): randomised controlled trial. *Lancet* 363, 439–445
6. Albers GW, Goldstein LB, Hall D, Lesko LM, Aptiganel Acute Stroke Investigators: Aptiganel hydrochloride in acute ischemic stroke: a randomized controlled trial. *JAMA* 2001;286:2673-2682.
7. Chen ZZ¹, Yang DD¹, Zhao Z¹, Yan H¹, Ji J¹, Sun XL². Memantine mediates neuroprotection via regulating neurovascular unit in a mouse model of focal cerebral ischemia. *Life Sci*. 2016 Apr 1;150:8-14. doi: 10.1016/j.lfs.2016.02.081. Epub 2016 Feb 23
8. Chen B¹, Wang G², Li W³, Liu W⁴, Lin R⁴, Tao J⁴, Jiang M², Chen L⁵, Wang Y⁶. Memantine attenuates cell apoptosis by suppressing the calpain-caspase-3 pathway in an experimental model of ischemic stroke. *Exp Cell Res*. 2017 Feb 15;351(2):163-172. doi: 10.1016/j.yexcr.2016.12.028. Epub 2017 Jan 6.
9. Ikonomidou C¹, Turski L. Why did NMDA receptor antagonists fail clinical trials for stroke and traumatic brain injury? *Lancet Neurol*. 2002 Oct;1(6):383-6.
10. Niu HX¹, Wang JZ², Wang DL³, Miao JJ³, Li H⁴, Liu ZG⁴, Yuan X⁴, Liu W^{5,6}, Zhou JR⁷ The Orally Active Noncompetitive AMPAR Antagonist Peramppanel Attenuates Focal Cerebral Ischemia Injury in Rats. *Cell Mol Neurobiol*. 2017 Apr 11. doi: 10.1007/s10571-017-0489-x.
11. Malcolm J. Sheardown, Elsebet Ø. Nielsen, Joergen Drejer, Tage Honoré, 2,3-Dihydroxy-6-nitro-7-sulphamoyl-benzo(f)quinoxaline, a selective non-N-methyl-D-aspartate excitatory amino acid receptor antagonist, has neuroprotective properties in a model of transient global ischaemia. *Amino Acids* pp 505-509|
12. Pitsikas N¹, Brambilla A, Besozzi C, Bonali P, Fodritto F, Grippa N, Scandroglio A, Borsini F. Effects of cerestat and NBQX on functional and morphological outcomes in rat focal cerebral ischemia. *Pharmacol Biochem Behav*. 2001 Mar;68(3):443-7
13. Walters MR¹, Kaste M, Lees KR, Diener HC, Hommel M, De Keyser J, Steiner H, Versavel M. The AMPA antagonist ZK 200775 in patients with acute ischaemic stroke: a double-blind, multicentre, placebo-controlled safety and tolerability study. *Cerebrovasc Dis*. 2005;20(5):304-9. Epub 2005 Aug 30.
14. Suzuki M¹, Sasamata M, Miyata K. Neuroprotective effects of YM872 coadministered with t-PA in a rat embolic stroke model. *Brain Res*. 2003 Jan 3;959(1):169-72

15. Furukawa T, Hoshino S, Kobayashi S, Asakura T, Takahashi M, Atsumi T, Teramoto A: The glutamate AMPA receptor antagonist, YM872, attenuates cortical tissue loss, regional cerebral edema, and neurological motor deficits after experimental brain injury in rats. *J Neurotrauma* 2003;20:269-278.
16. Beschoner R¹, Dietz K, Schauer N, Mittelbronn M, Schluesener HJ, Trautmann K, Meyermann R, Simon P. Expression of EAAT1 reflects a possible neuroprotective function of reactive astrocytes and activated microglia following human traumatic brain injury. *Histol Histopathol.* 2007 May;22(5):515-26. doi: 10.14670/HH-22.515.
17. Colleoni S¹, Jensen AA, Landucci E, Fumagalli E, Conti P, Pinto A, De Amici M, Pellegrini-Giampietro DE, De Micheli C, Mennini T, Gobbi M. Neuroprotective effects of the novel glutamate transporter inhibitor (-)-3-hydroxy-4,5,6,6a-tetrahydro-3aH-pyrrolo[3,4-d]-isoxazole-4-carboxylic acid, which preferentially inhibits reuptake (glutamate release) compared with glutamate reuptake. *J Pharmacol Exp Ther.* 2008 Aug;326(2):646-56. doi: 10.1124/jpet.107.135251. Epub 2008 May 1.
18. Diener HC¹, Cortens M, Ford G, Grotta J, Hacke W, Kaste M, Koudstaal PJ, Wessel T. Lubeluzole in acute ischemic stroke treatment: A double-blind study with an 8-hour inclusion window comparing a 10-mg daily dose of lubeluzole with placebo. *Stroke.* 2000 Nov;31(11):2543-51.
- 19.[No authors listed] Comparison of pre- and post-ischemic treatment of telmisartan and nimodipine combination in experimentally induced cerebral ischemia. *Indian J Exp Biol.* 2016 Sep;54(9):560-8.
20. Zhang DD¹, Zou MJ², Zhang YT², Fu WL², Xu T², Wang JX², Xia WR², Huang ZG², Gan XD², Zhu XM², Xu DG³. A novel IL-1RA-PEP fusion protein with enhanced brain penetration ameliorates cerebral ischemia-reperfusion injury by inhibition of oxidative stress and neuroinflammation. *Exp Neurol.* 2017 Nov;297:1-13. doi: 10.1016/j.expneurol.2017.06.012. Epub 2017 Jun 8.
21. Khaksar S¹, Bigdeli MR¹ Intra-cerebral cannabidiol infusion-induced neuroprotection is partly associated with the TNF- α /TNFR1/NF- κ B pathway in transient focal cerebral ischaemia. *Brain Inj.* 2017;31(13-14):1932-1943. doi: 10.1080/02699052.2017.1358397. Epub 2017 Sep 5
22. Arun Padmanabhan, MD, PhD¹ ; Saptarsi M. Haldar, MD^{2,3}. Neuroprotection in Ischemic Stroke: AhR We Making Progress? Dept of Medicine, Massachusetts General Hospital, Harvard Medical School, Boston, MA; 2 Case Cardiovascular Research Institute, Dept of Medicine, Case Western Reserve University School of Medicine, Cleveland, OH; 3 Harrington Heart & Vascular Institute, University Hospitals Case Medical Center, Cleveland, OH
23. Cuartero MI, Ballesteros I, de la Parra J, Harkin AL, Abautret-Daly A, Sherwin E, Fernández- Salguero P, Corbi AL, Lizasoain I, Moro MA. An L-kynurenine/aryl hydrocarbon receptor pathway mediates brain damage after experimental stroke. *Circulation.* 2014;130:XXXXX. 11. Denison MS, Nagy SR. Activation of the aryl hydrocarbon receptor by structurally diverse
24. Zuo W¹, Yang PF¹, Chen J¹, Zhang Z¹, Chen NH¹. Drp-1, a potential therapeutic target for brain ischaemic stroke. *Br J Pharmacol.* 2016 May;173(10):1665-77. doi: 10.1111/bph.13468. Epub 2016 Apr 7.
25. Lindvall O¹, Kokaia Z. Stem cells in human neurodegenerative disorders--time for clinical translation? *J Clin Invest.* 2010 Jan;120(1):29-40. doi: 10.1172/JCI40543.