

ISQUEMIA CEREBRAL: MECANISMOS FISIOPATOLÓGICOS Y OPORTUNIDADES TERAPÉUTICAS

Rosario Campos-Mojena^{1&}, Javier Marín-Prida^{2&*}, Beatriz Piniella-Matamoras¹, Gilberto L. Pardo-Andreu², Giselle Pentón-Rol¹

[&]coautoría principal compartida

¹ Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (CIGB). Ave. 31 e/ 158 y 190, Cubanacán, Playa, La Habana, Cuba. CP 10600.

² Centro de Estudios para las Investigaciones y Evaluaciones Biológicas (CEIEB), Instituto de Farmacia y Alimentos (IFAL), Universidad de la Habana. Calle 222 No. 2317 entre 23 y 31, La Coronela, La Lisa, La Habana, CUBA. CP 13600.

*Email: javier.marin@ifal.uh.cu

Resumen

La isquemia cerebral constituye una de las principales causas de muerte y discapacidad a nivel mundial. La trombolisis por el factor activador del plasminógeno tisular (t-PA) es la única opción farmacológica aprobada en la práctica clínica, pero con una corta ventana terapéutica de 4,5 h. En la presente revisión nos proponemos exponer los avances más recientes realizados en la investigación de mecanismos fisiopatológicos, así como de posibles blancos farmacológicos para el ictus isquémico. La cascada isquémica se establece a partir de la interrupción del flujo sanguíneo e incluye a procesos como la excitotoxicidad mediada por el glutamato, el estrés oxidativo, la disfunción mitocondrial, la ruptura de la barrera hematoencefálica, la inflamación y la muerte celular. Los mediadores moleculares de tales procesos pueden actuar con carácter bifásico y de manera concomitante en dependencia de la etapa temporal postisquémica. Los objetivos fundamentales de la identificación y evaluación de dianas terapéuticas son la revascularización (trombolisis), el bloqueo de los eventos deletéreos de esta cascada (neuroprotección), o la inducción de procesos endógenos de reparación cerebral (neurorestauración). Entre estas estrategias se encuentran nuevas moléculas trombolíticas o dispositivos médicos para incrementar la efectividad del t-PA, diferentes clases de compuestos con acciones neuroprotectoras, así como la inducción de neurogénesis y angiogénesis. Las evidencias obtenidas hasta el momento, sugieren que la combinación de estas estrategias tendría una mayor efectividad que individualmente, lo que incrementa las potencialidades de su aplicación clínica.

Palabras clave: isquemia cerebral, mecanismos fisiopatológicos, estrategias terapéuticas

Physiopathological mechanisms and therapeutic opportunities

Abstract

Ischemic stroke is a major cause of death and disability worldwide. Thrombolysis by the tissue plasminogen activator (t-PA) is the only pharmacological option approved for clinical practice, but with a narrow therapeutic window of 4,5 h. In this review we aim to describe the most recent advances in the research of pathophysiological mechanisms as well as possible pharmacological targets for ischemic stroke. Ischemic cascade is established immediately after the interruption in the cerebral blood flow, and it include processes like excitotoxicity, oxidative stress, mitochondrial dysfunction, disruption of the blood-brain barrier, inflammation and cell death. The molecular mediators of these processes can act in a biphasic way and concomitantly depending on the postischemic step. The main objectives of the identification and evaluation of therapeutic targets are the revascularization (thrombolysis), the blockade of the deleterious events involved in the ischemic cascade (neuroprotection) or the induction of endogenous processes of brain repair (neurorestoration). For example, new thrombolytic molecules or medical devices aimed to increase the t-PA effectiveness, different classes of compounds with neuroprotective actions, and the induction of neurogenesis and angiogenesis. The accumulated evidence suggest that the combination of these strategies would be more effective than individually, which may increase their potentialities of clinical application.

Keywords: ischemic stroke, physiopathological mechanisms, therapeutic strategies

Introducción

Las Enfermedades Cerebrovasculares (ECV) constituyen un grupo de trastornos encefálicos ocasionados por algún proceso patológico en uno o varios vasos sanguíneos que irrigan el sistema nervioso central. Entre estos procesos se pueden encontrar lesiones en la pared vascular, la oclusión o la ruptura de algún vaso sanguíneo y el incremento en la viscosidad de la sangre.¹ Son sinónimas las denominaciones accidente o ataque cerebrovascular, apoplejía y el término latino “ictus”, que al igual que su correspondiente en idioma inglés “stroke”, significa “golpe”, indicando el carácter brusco y súbito de la patología. Las ECV son heterogéneas con más de 150 causas identificadas hasta el momento. Se han realizado diversas clasificaciones de las ECV de acuerdo a diferentes criterios, como por ejemplo la naturaleza de la lesión, su localización, la presentación clínica y la causa, realizadas a partir de registros hospitalarios de casos clínicos.² Entre las ECV se encuentra el llamado ictus isquémico, ya sea focal o global, el cual ha sido definido como la oclusión temporal o permanente de uno o varios vasos sanguíneos que irrigan una parte o todo el encéfalo, respectivamente. Datos reportados por la Asociación Americana del Corazón muestran que cada año 795 000 estadounidenses sufren un ataque cerebrovascular, o sea, ocurre un ictus cada 40 segundos aproximadamente en ese país, de los cuales el 87% es de causa isquémica y el resto de origen hemorrágico.³ En Cuba, las ECV constituyen la tercera causa de muerte incluyendo todas las edades y en todas las provincias del país, y se ha observado un incremento sostenido en su incidencia y mortalidad en las últimas tres décadas.⁴

En la presente revisión se abordan los avances más recientes realizados en la investigación de mecanismos fisiopatológicos del ictus isquémico, así como posibles blancos farmacológicos que pudieran abrir nuevas oportunidades para el desarrollo de estrategias terapéuticas.

Estudios de patología clínica

El ictus isquémico puede presentarse de diversas formas y con etiologías diferentes, generando una gran variabilidad en los casos clínicos. Su estudio ha transitado por etapas históricas con una fuerte influencia de corrientes filosóficas y religiosas, como por ejemplo en el antiguo Egipto, donde se consideraba al corazón y no al cerebro como órgano principal para el pensamiento y la inteligencia.⁵ Los ataques cerebrovasculares fueron mencionados en los escritos de Hipócrates con el término de “apoplejía” en la antigua Grecia (400 A.C.), al referirse a la presencia de parálisis súbita y adormecimiento.⁶ Posteriormente, Galeno de Pergamon (131-201 D.C.) estudió la vasculatura de cerdos y bueyes, y realizó analogías con el cuerpo humano, cuya disección era prohibida debido a las implicaciones religiosas. Aunque no logró identificar la etiología de la apoplejía, definió la misma como una pérdida súbita, simultánea y completa del movimiento y el sentido, y estableció la

intensidad del daño respiratorio como un síntoma fundamental en su pronóstico. Estos conceptos fueron axiomáticos en Europa durante más de trece siglos.⁷ El origen vascular del ictus no se comenzó a vislumbrar hasta tiempo después, cuando en el siglo 17 D.C. el médico inglés William Harvey (1578-1657) publicó la primera descripción detallada del sistema circulatorio del cuerpo humano, estableciendo las bases de la investigación moderna del sistema cardiovascular.⁸ Posteriormente, a partir de la disección post-mortem de pacientes apopléjicos, el Dr. Johannn Jacob Wepfer descubrió que el bloqueo de los vasos sanguíneos cerebrales podía ser la causa de esta patología.⁹ Los análisis de gran número de casos fueron revelando el sustrato anatómico de la apoplejía y su correlación con la sintomatología clínica, tales como los realizados por Thomas Willis (1621-1675), en honor del cual se nombró con el término de “círculo de Willis” al polígono arterial de la base del encéfalo, G.B. Morgagni (1682-1771), J. Cheyne (1777-1836) y L. Rostan (1790-1866). Más adelante, el patólogo alemán R.L.K. Virchow (1821-1902) logró describir mediante el microscopio óptico la fenomenología de la trombosis arterial y el embolismo (términos acuñados por él), así como la importancia de la interacción entre la sangre y la pared arterial. Virchow estableció el término de “isquemia” al proceso de interrupción del flujo sanguíneo a un órgano o tejido, abriendo el camino de la investigación en los mecanismos fisiológicos de los ataques cardio y cerebrovasculares.¹⁰

El advenimiento del siglo XX trajo aparejado la estandarización y aplicación de modelos experimentales para esta enfermedad, permitiendo avanzar en el estudio de la fisiopatología y en la evaluación de estrategias terapéuticas, con énfasis en el carácter predictivo y la relevancia clínica.¹¹ Sin embargo, han existido discrepancias entre los resultados experimentales y la situación clínica, lo cual puede derivarse de alguna de las etapas de la investigación preclínica: la selección adecuada del modelo experimental y el método para inducir la isquemia, el método apropiado para evaluar y analizar el daño isquémico, y la interpretación correcta de los resultados.¹²

Fisiopatología

En condiciones fisiológicas normales, el metabolismo energético cerebral se mantiene en estrecha relación con el flujo sanguíneo cerebral (FSC) (ej. 50-60 mL/100g/min en el hombre¹³ y de 100-120 mL/100g/min en la rata),¹⁴ el cual se mantiene regulado de forma dinámica con la presión arterial y con la barrera hematoencefálica. Estos valores de FSC garantizan una liberación continua de oxígeno y glucosa como sustratos imprescindibles en el mantenimiento de los potenciales de membrana celular y la homeostasis iónica, y reflejan adaptaciones específicas de acuerdo a la especie y localmente, en las distintas regiones cerebrales.¹⁵

El daño cerebral luego de la interrupción del FSC se establece a partir de la drástica caída en el soporte energético, generando una serie compleja de eventos fisiopatológicos que evolucionan

progresivamente en tiempo y espacio, de una manera no lineal, concomitante y con múltiples niveles fenomenológicos. Estos incluyen tanto al nivel molecular, el celular (denominado unidad neurovascular), el regional encefálico y el de individuo, hasta diferencias poblacionales de acuerdo a la base genética y a los factores de riesgo presentes. Además, diversos mediadores tienen carácter bifásico, o sea pueden ser dañinos o beneficiosos en dependencia del estado previo del tejido o de la etapa post-isquémica en que se encuentren actuando.¹⁶

En 1977 fue publicado uno de los estudios más importantes en la historia moderna de la investigación del ictus isquémico. Astrup *et al.*¹⁷ demostraron, mediante mediciones electrofisiológicas, la existencia de regiones que eran disfuncionales pero todavía viables en primates no humanos sometidos a una isquemia cerebral focal. En las áreas centrales del ictus, llamado foco isquémico, la caída del flujo sanguíneo era severa y las células morían rápidamente; mientras que en las áreas periféricas, con un flujo sanguíneo moderado, las neuronas todavía retenían su potencial de membrana de reposo, aunque habían perdido su capacidad de disparar potenciales de acción. Cuando se incrementaba la presión sanguínea y el flujo colateral aumentaba, estas áreas se recuperaban y los potenciales de acción eran restaurados. Sin embargo, la restauración era dependiente del tiempo: luego de un período prolongado de interrupción sanguínea no era posible su recuperación. Los autores denominaron a esas áreas con el término “penumbra”, probablemente haciendo referencia al carácter intermedio entre zonas de luz, que indica vida, y de oscuridad, que se refiere a la muerte. A partir de entonces, la penumbra, definida como aquellas regiones cerebrales que tras un ataque isquémico eran afectadas pero que todavía se mantenían con vida, ha sido el blanco fundamental para intervenciones terapéuticas. Este concepto permitió establecer como estrategia la posibilidad de rescatar esas áreas de la muerte si una terapia adecuada se aplica a tiempo. El estudio de la penumbra en el ictus isquémico ha marcado diversas etapas de acuerdo a los abordajes metodológicos empleados: a) la electrofisiología, el flujo sanguíneo cerebral y el metabolismo; b) los mecanismos moleculares fisiopatológicos; c) el desarrollo de las neuroimágenes; y d) el impacto de los mecanismos de protección endógena y de restauración.¹⁸ Aunque todavía no es conocido con exactitud la dinámica cerebral en la penumbra, estos abordajes han ido revelando procesos fundamentales de la cascada isquémica, tales como la excitotoxicidad mediada por el glutamato, el estrés oxidativo, la disfunción mitocondrial, la ruptura de la barrera hematoencefálica, la inflamación y la muerte celular.¹⁹

Desregulación del Ca^{2+} y excitotoxicidad mediada por el glutamato

Como consecuencia del bloqueo arterial, se interrumpe el suministro de O_2 y glucosa al tejido cerebral, que conduce al cese de la fosforilación oxidativa en la respiración mitocondrial y a la

disminución del ATP. En estas circunstancias, una fuente energética alternativa es la glucólisis anaerobia, la cual sin embargo, genera altas concentraciones de ácido láctico, que provoca una disminución del pH tisular.²⁰ Esta acidosis tisular es detectada por receptores de membrana neuronal denominados canales iónicos sensibles a ácido (del inglés: “acid-sensing ion channel”, ASIC), complejos hetero u homotriméricos permeables al Ca^{2+} que producen efectos dañinos neuronales luego de un ataque isquémico.²¹ Como los mecanismos encargados de mantener la homeostasis iónica son dependientes de ATP (ej. Na^+/K^+ ATPase, Ca^{2+} ATPase de la membrana y del retículo endoplasmático), esta se pierde rápidamente luego del ataque isquémico. Al incrementarse el Na^+ intracelular ocurre una despolarización de la membrana neuronal responsable de una rápida elevación del Ca^{2+} citosólico (debido a canales de Ca^{2+} sensibles al voltaje). Este promueve la liberación de glutamato desde las terminales pre-sinápticas, el cual luego interactúa con sus receptores ionotrópicos post-sinápticos tipo NMDA (N-metil-D-aspartato) y no-NMDA, como el de AMPA (ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico) y el de kainato, produciendo a su vez una entrada masiva de calcio, sodio y agua en la neurona post-sináptica. Estos cambios traen como consecuencia el aumento del edema tisular y del volumen celular, lo que produce la lisis celular osmótica o muerte por necrosis temprana en el foco isquémico.²² El glutamato se acumula en el espacio sináptico al no ser reciclado completamente por los astrocitos, e induce otros procesos deletéreos. Esta acumulación conduce a un continuo aumento del influjo de Ca^{2+} a las neuronas, mediador fundamental del proceso conocido como excitotoxicidad. El Ca^{2+} intracelular es secuestrado mayormente por la mitocondria, por lo que la disfunción de este orgánulo durante el evento isquémico lo convierte en pieza clave en el daño neuronal por excitotoxicidad.²³

Estrés oxidativo y disfunción mitocondrial

El estrés oxidativo es un estado patológico caracterizado por un desbalance entre la producción de especies reactivas oxidantes y la actividad de los sistemas biológicos antioxidantes (incluyendo sus niveles cuantitativos).²⁴ El término de ERO es usado aquí siguiendo el criterio de B. Halliwell (2006) en referencia a todas las moléculas que contienen oxígeno en su estructura y con capacidad de dañar o modificar a las biomoléculas mediante reacciones de oxidación-reducción. Estas incluyen a las derivadas del propio O_2 , del nitrógeno, del cloro, del bromo y del sulfuro, aunque también existen otras que no contienen al oxígeno.²⁵ La acumulación del Ca^{2+} libre en el citosol neuronal induce procesos catabólicos debido a la activación de proteasas, lipasas y nucleasas, así como la activación de enzimas involucradas en la generación de especies reactivas del oxígeno (ERO), como la óxido nítrico sintasa.²⁶ El exceso de Ca^{2+} activa proteasas como la calpaína que está involucrada en la liberación del factor inductor de apoptosis de la membrana mitocondrial (del inglés: “apoptosis

inducing factor", AIF).²⁷ El Ca^{2+} puede, además, perturbar la dinámica estructural de la mitocondria por fragmentación, mitofagia, mitogénesis o fisión/fusión,²⁸ la cual a su vez puede estar implicada en los procesos de muerte neuronal.²⁹ Un efecto fundamental del Ca^{2+} sobre la mitocondria cuando se encuentra a niveles suprafisiológicos, se ha denominado la Transición de Permeabilidad Mitocondrial, caracterizada por el incremento en la permeabilidad de las membranas mitocondriales a la libre difusión de solutos con dimensiones menores a 1,5 kDa (como por ejemplo el agua).³⁰ Entre sus consecuencias se encuentran: a) la disrupción de la fosforilación oxidativa; b) el incremento en la actividad ATP hidrolasa (modo reverso) de la F₀F₁-ATP sintasa; c) la inhibición del complejo I debido a la disminución del NADH; d) la liberación de Ca^{2+} mitocondrial y de mediadores de cascadas de muerte celular tales como el citocromo c, el factor AIF y la proteína Smac/Diablo.³¹ La cadena de transporte electrónico mitocondrial es la principal fuente de generación de ERO en la mayoría de las células eucariotas,³² al ocurrir una reducción parcial (monoelectrónica) del O_2 que produce el anión superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$), una especie altamente reactiva que luego es transformado a la especie más estable peróxido de hidrógeno (H_2O_2) por las superóxido dismutasas mitocondriales.³³ Al ocurrir un ataque isquémico seguido por el restablecimiento al menos parcial del FSC, el tejido cerebral es reoxigenado, pero debido a las alteraciones previas de la cadena de transporte electrónico, se incrementa la producción de $\text{O}_2^{\bullet-}$, el cual en presencia de elevados niveles de óxido nítrico (NO) (por la activación excitotóxica de la óxido nítrico sintetasa), genera una especie altamente dañina, el peroxinitrito (ONOO^-).³⁴ A partir de su capacidad oxidante y de nitración sobre proteínas, lípidos y ácidos nucleicos, el ONOO^- produce la modificación covalente de receptores membranales, con la consecuente afectación de señales secuencia abajo, la inhibición de enzimas antioxidantes y la inducción de peroxidación lipídica (POL).³⁵ Además de sus acciones directas sobre las biomoléculas, el ONOO^- genera otras especies altamente dañinas, tales como el ácido peroxinitroso (ONOOH) en presencia de un pH tisular ácido, y los radicales anión carbonato ($\text{CO}_3^{\bullet-}$) y el dióxido de nitrógeno ($\bullet\text{NO}_2$) a partir de su reacción con el CO_2 .³⁶ Por otra parte, diversas enzimas que producen ERO como un subproducto normal de su actividad, en un ambiente isquémico también contribuyen al establecimiento del desbalance oxidativo, como por ejemplo la monoamino oxidasa.³⁷ Además, la auto-oxidación de sustancias endógenas en presencia de O_2 , como la dopamina, la 6-hidroxidopamina, los grupos tioles (ej. de cisteína) y las catecolaminas, producen $\text{O}_2^{\bullet-}$.³⁸ Unido a estos mecanismos generadores de ERO, se encuentra la activación, dependiente de Ca^{2+} de la fosfolipasa A_2 , la cual libera ácido araquidónico, cuyo metabolismo por las lipooxigenasas y ciclooxigenasas 1 y 2 (COX-1,-2) hasta la formación de eicosanoides, también producen $\text{O}_2^{\bullet-}$.³⁹

Otra de las fuentes importantes de $O_2^{\bullet -}$ en el ictus isquémico es la enzima NADPH oxidasa, la cual comprende una familia de isoformas (Nox1-5, DUOX1-2) que incluyen varias subunidades (1 catalítica y hasta 5 reguladoras).⁴⁰ Esta enzima puede localizarse en diferentes membranas biológicas (ej. núcleo, retículo endoplasmático, endosoma, fagosoma, mitocondria o membrana celular) y cataliza la transferencia de electrones desde el NADPH citosólico hasta el O_2 , produciendo el anión $O_2^{\bullet -}$ (Nox1, 2, 5) o en determinadas isoformas, el H_2O_2 (Nox4, DUOX1, DUOX2). En condiciones normales, las NADPH oxidasas tienen funciones fisiológicas importantes (ej. supervivencia, migración y proliferación de células endoteliales; modulación de la respuesta inflamatoria), pero tras un ataque isquémico su sobre-activación contribuye sustancialmente al estrés oxidativo y el daño cerebrales.⁴¹ Una de las especies más reactivas conocidas es el radical hidroxilo ($OH^{\bullet}$). Entre sus fuentes principales se encuentran las denominadas reacciones de Fenton ($Fe^{2+} + H_2O_2 = Fe^{3+} + OH^{\bullet} + OH^-$)⁴² y de Haber-Weiss ($O_2^{\bullet -} + H_2O_2 = O_2 + OH^{\bullet} + OH^-$).⁴³ El Fe^{2+} puede ser generado por reducción directa del superóxido ($Fe^{3+} + O_2^{\bullet -} = Fe^{2+} + O_2$), o por acción dañina de este anión sobre las enzimas que lo contienen, o por liberación de las proteínas secuestradoras de hierro (ej. ferritina, transferrina) inducido por las condiciones isquémicas tales como la acidosis.⁴⁴ El tejido cerebral es particularmente vulnerable al estrés oxidativo debido, entre otras razones, a que posee una alta tasa de consumo de O_2 (ej. ~20% del consumo total del cuerpo humano) y de generación mitocondrial de $O_2^{\bullet -}$, además de que las membranas neuronales son ricas en ácidos grasos poli-insaturados, los cuales son particularmente susceptibles a la POL.⁴⁵ En respuesta al incremento de las ERO, el cerebro cuenta con sistemas de defensa antioxidante enzimáticos y no enzimáticos. La superóxido dismutasa (SOD), enzima que convierte el $O_2^{\bullet -}$ en H_2O_2 y O_2 , está presente en todo el cerebro, pero debe estar acompañada por la actividad de otra enzima que sea capaz de remover el H_2O_2 formado. La catalasa (CAT), que realiza esta función, no tiene una expresión importante en el tejido cerebral.⁴⁶ Por su parte, la glutatión peroxidasa también es capaz de eliminar el H_2O_2 cerebral, al acoplar su reducción con la oxidación del tripéptido Glu-Cys-Gly (glutatión o GSH) ($H_2O_2 + 2GSH = GSSG + 2H_2O$). La glutatión peroxidasa, además, también participa en la detoxificación de otros radicales, tales como peróxidos lipídicos, radicales peroxilos y alcoxilos.⁴⁷ Estudios con animales *knock-out* y transgénicos para estas enzimas han revelado su importancia en la protección cerebral frente al ictus isquémico.⁴⁸

Ruptura de la barrera hematoencefálica

La barrera hematoencefálica (BHE) impide el influjo de ciertas moléculas hacia el parénquima cerebral basado en su polaridad y tamaño molecular. Las células principales que constituyen la BHE son las células endoteliales capilares, que forman uniones fuertes y están rodeadas por la lámina

basal, los pericitos vasculares, y los pies terminales de los astrocitos.⁴⁹ Aunque la BHE admite la entrada libre de oxígeno, dióxido de carbono y moléculas lipofílicas, es impermeable a moléculas hidrofílicas que son esenciales para la vida, como la glucosa, los aminoácidos y otros metabolitos críticos. Estas moléculas hidrofílicas atraviesan la BHE a través de transportadores y canales iónicos.⁵⁰ Durante un daño cerebral existen mediadores químicos tales como el glutamato, el ATP, el óxido nítrico y el TNF- α (del inglés: "Tumor Necrosis Factor") que contribuyen a aumentar la permeabilidad de la BHE.⁵¹ Además, durante estos procesos, se afecta la señalización entre los astrocitos, los pericitos y el endotelio.

Inflamación

En etapas tempranas luego del ictus, el proceso inflamatorio comienza en el espacio intra-vascular a partir de la oclusión del vaso, cuando la hipoxia estimula la cascada de coagulación, activa el sistema del complemento, las plaquetas⁵² y modula a las células endoteliales (ej. expresión de factores de adhesión vascular, producción de ERO, inhibición de eNOS, aumento del transporte trans-endotelial, expresión de proteasas, disminución en los niveles de proteínas de unión endotelial adyacente).⁵³ Al mismo tiempo, en el espacio perivascular, las células mastoides liberan diversos mediadores, como la histamina, proteasas y el TNF, mientras que los macrófagos activados producen citocinas y quimiocinas proinflamatorias que refuerzan la inducción de proteínas de adhesión endotelial, la ruptura de la BHE y la trans migración de células inflamatorias (neutrófilos, leucocitos, monocitos).⁵⁴ De igual manera, en el parénquima cerebral, la microglia y los astrocitos hipóxicos adquieren un estado caracterizado por, entre otros aspectos, la producción de citocinas y quimiocinas, de receptores específicos y de metaloproteinasas de la matriz extracelular,^{55,56} y contribuyen de esta forma al ambiente pro-inflamatorio. La necrosis neuronal libera al parénquima diversas moléculas que en su conjunto se han denominado patrones moleculares asociados a daños (del inglés: "damage-associated molecular patterns", DAMPs) que activan a las células inflamatorias mediante diferentes receptores como por ejemplo los de tipo Toll, expresados en la microglia, los macrófagos perivascuales y las células endoteliales.⁵⁷ Las DAMPs pueden tener efectos beneficiosos o deletéreos en dependencia de la etapa del proceso inflamatorio postisquémico. Las células T entran al parénquima cerebral tras su adhesión al endotelio facilitada por la disrupción de la BHE y las quimiocinas, y producen localmente interferón gamma (IFN- γ), el cual es altamente tóxico para las neuronas.⁵⁸ El papel deletéreo en la etapa aguda postictus de los linfocitos T se ha demostrado por diferentes métodos, por ejemplo, la depleción o bloqueo farmacológico de células T $\gamma\delta$,⁵⁹ CD8⁺ o CD4⁺,⁶⁰ disminuye el daño isquémico cerebral.

Muerte celular

La mitocondria está involucrada tanto en los procesos de necrosis, de apoptosis, como de autofagia luego del ictus isquémico, en dependencia de la severidad del daño, la presencia de reperusión tisular y la naturaleza de la ruta de señalización celular. Al bloquearse completamente la producción de ATP por la mitocondria en las neuronas del foco isquémico, se produce en cuestión de minutos una sobrecarga de Ca^{2+} intracelular y alteraciones iónicas que resultan en la muerte celular por necrosis.⁶¹ Sin embargo, en zonas donde la caída del FSC es menos severa, diversas vías de señalización celular involucran a la mitocondria en eventos que desencadenan la apoptosis, entre ellos, la liberación de citocromo c al citoplasma, donde interactúa con factores citosólicos como Apaf-1 y caspasa-9, activa la caspasa-3 y el subsecuente clivaje de proteínas sustratos, dentro de los que se incluye la poli-ADP-ribosa polimerasa.⁶²

Estudios recientes sugieren que la autofagia pudiera contribuir a la reestructuración del tejido cerebral dañado mediante la degradación de agregados proteicos y orgánulos defectuosos.⁶³ Sin embargo, la desregulación de este proceso también conlleva a efectos deletéreos cerebrales. Diversas ERO son capaces de oxidar e inactivar a proteínas reguladoras o efectoras de la autofagia neuronal, como por ejemplo el H_2O_2 puede oxidar a la proteína Atg4 (del inglés: "autophagic related gene 4") e induce la pérdida de su función.⁶⁴ La modulación adecuada de los procesos autofágicos podría constituir, por tanto, una estrategia terapéutica para el ictus, por ejemplo para reciclar componentes celulares dañados como las mitocondrias disfuncionales.⁶⁵

Estrategias terapéuticas

Trombolisis

Hasta el momento, existen cuatro intervenciones que se emplean en la práctica clínica y han demostrado cierta mejoría en los pacientes elegibles al ser aplicadas en la etapa aguda postictus: 1) el manejo de los pacientes dentro de unidades hospitalarias especializadas (unidades de ictus);⁶⁶ 2) el uso de la aspirina antes de las 48 h postictus;⁶⁷ 3) la hemicraneotomía o descompresión quirúrgica;⁶⁸ 4) la trombolisis por el factor activador del plasminógeno tisular (tPA) antes de las 4,5 h postictus.⁶⁹ Un número considerable de estrategias se han evaluado y continúan probándose tanto en modelos experimentales como en ensayos clínicos con el objetivo de incrementar el arsenal terapéutico frente al ictus isquémico. Estas pueden ser divididas en: a) abordajes que mejoran la aplicación del t-PA o nuevas moléculas trombolíticas; b) remoción mecánica del trombo; c) neuroprotección y restauración neurológica.

Para incrementar la efectividad del t-PA se han implementado los denominados protocolos "puente", en los cuales se aplica el t-PA por vía intravenosa inicialmente, y si no se demuestra la recanalización

arterial dentro de un período de tiempo determinado, se realiza una segunda administración de ese fármaco,⁷⁰ que puede ser combinado con dispositivos mecánicos, por ejemplo los sistemas MERCI⁷¹ o PENUMBRA.⁷² Además, también se ha demostrado experimentalmente y en estudios clínicos la efectividad de la aplicación concomitante del ultrasonido con t-PA, mediada por un mejor transporte de este fármaco hasta el coágulo que bloquea la arteria.⁷³ Entre las nuevas moléculas trombolíticas con potencialidades clínicas se encuentran la desmoteplasa,⁷⁴ la tenecteplasa,⁷⁵ el ancrod,⁷⁶ la batroxobina,⁷⁷ y el activador del plasminógeno tipo uroquinasa tisular humana.⁷⁸ Algunas de ellas tienen una mayor especificidad por la fibrina que el t-PA, por lo que reducen el riesgo de complicaciones por hemorragias.

Neuroprotección

La neuroprotección para el accidente cerebrovascular isquémico se define como las estrategias aplicadas individualmente o en combinación, que antagonizan los eventos bioquímicos y moleculares perjudiciales que transcurren durante la cascada isquémica.⁷⁹ Las estrategias terapéuticas dirigidas fundamentalmente a la vascularización cerebral y que tienen como objetivo el mantenimiento de la permeabilidad circulatoria o la reversión de la oclusión vascular no están incluidas en esta definición, porque aunque estas terapias protegen al cerebro, están basadas en su acción trombolítica. El objetivo de la neuroprotección farmacológica es limitar el área de la lesión cerebral, bloqueando la denominada cascada isquémica para evitar o retrasar la evolución hacia la muerte celular.⁸⁰ Han sido numerosas las estrategias neuroprotectoras evaluadas tanto en estudios preclínicos como en ensayos clínicos, entre las cuales se encuentran:^{81,82}

- Fármacos que actúan sobre la sinapsis neuronal, como antagonistas del receptor postsináptico, moduladores de la activación de este o como inhibidores de la liberación presináptica.
- Fármacos que actúan como antagonistas de los canales de calcio.
- Fármacos con actividad antioxidante.
- Fármacos moduladores de la respuesta inflamatoria.
- Fármacos que actúan sobre los mecanismos de apoptosis celular.

Las intervenciones neuroprotectoras más prometedoras incluyen a la hipotermia, el sulfato de magnesio, la citicolina y la albúmina.⁸³ Nuestro grupo ha demostrado un potente efecto neuroprotector de la C-Ficocianina, principal biliproteína de la cianobacteria *Spirulina platensis*, en modelos preclínicos de isquemia cerebral.^{84,85} La C-Ficocianina ha evidenciado, además, poseer efectos protectores en modelos experimentales de múltiples enfermedades basado en sus propiedades antioxidantes e inmunomoduladoras.⁸⁶ Por otro lado, la búsqueda de dianas farmacológicas en tipos

celulares específicos de la unidad neurovascular también ha generado resultados promisorios. Por ejemplo, inducir un fenotipo restaurador en los astrocitos ha producido efectos neuroprotectores frente al daño isquémico, así como la reparación tisular.⁸⁷

Neurorestauración

1- Neurogénesis

La neurogénesis endógena se establece a partir de las células madres neuronales y de las células progenitoras, su diferenciación y migración a la zona dañada, donde se diferencian hacia un fenotipo neuronal e integran el tejido local. Luego de una isquemia cerebral, la producción y diferenciación de las células progenitoras en la zona subgranular del giro dentado está fuertemente estimulada, lo que incrementa la neurogénesis.⁸⁸ Basado en evidencias experimentales, se han identificado varios mecanismos de autoreparación por neurogénesis posterior a una isquemia cerebral, lo que permite identificar blancos terapéuticos potenciales.⁸⁹

2- Factores de crecimiento

Los factores de crecimiento pueden actuar modificando la cinética de la división celular, promoviendo la supervivencia celular, o induciendo la angiogénesis y la neurogénesis. En este caso, pueden activar las células progenitoras neurales con vistas a su proliferación, su migración al sitio de la lesión y su diferenciación neuronal.⁹⁰ Se ha observado que el paso a través de la BHE constituye una de sus posibles limitaciones. En un estudio reciente se demuestra que la administración intranasal del Factor Estimulador de Colonias de Granulocitos (G-CSF: "*Granulocyte-Colony Stimulating Factor*") incrementa su efecto protector en ratas isquémicas, mediado por acciones neurogénicas y angiogénicas.⁹¹ Asimismo, se ha observado que el G-CSF es capaz de reducir los efectos adversos asociados a la aplicación del t-PA, al reducir en un 38,9% la hemorragia intracerebral y aumentar la ventana terapéutica de este fármaco a 6 h.⁹²

El Factor de Crecimiento del Endotelio Vascular (VEGF por sus siglas en inglés: "*Vascular Endothelial Growth Factor*"), un potente estimulador de la angiogénesis, es capaz de promover la arteriogénesis en el cerebro luego del daño cerebral en ratas. Sus efectos incluyen además, la disminución del volumen de infarto, del déficit neurológico, y la inhibición la apoptosis neuronal. Lo anterior sugiere que la administración de VEGF podría tener importancia terapéutica debido a sus propiedades angiogénicas y neurogénicas.⁹³

La isquemia cerebral continúa siendo una patología de alta prevalencia y mortalidad a nivel mundial. Los mecanismos fisiopatológicos subyacentes incluyen a múltiples tipos celulares que conforman la unidad neurovascular, así como diferentes procesos biológicos que actúan con carácter bifásico y de

manera concomitante. Las evidencias obtenidas sugieren que los abordajes terapéuticos más efectivos serían aquellos que permitan actuar sobre distintas dianas farmacológicas. Por ejemplo, la combinación de fármacos trombolíticos con fármacos neuroprotectores o con aquellos que sean capaces de promover la neurorestauración.

Referencias

- ¹ Martí Vilalta JL. Concepto y clasificación de las enfermedades cerebrovasculares. En: Castillo Sánchez J, Álvarez Sabín J, Martí Vilalta JL, Martínez Vila F, Matías Guiu J, eds. Manual de enfermedades vasculares cerebrales. Barcelona: JR Prous; 1995:26-32.
- ² Amarenco P, Bogousslavsky J, Caplan LR, Donnan GA, Hennerici MG. Classification of stroke subtypes. *Cerebrovasc Dis* 2009; 27: 493–501.
- ³ Go AS, Mozaffarian D, Roger VL, Benjamin EJ, Berry JD, Blaha MJ *et al.* (on behalf of the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee of the American Heart Association). Heart Disease and Stroke Statistics--2014 Update: A Report From the American Heart-Heart Disease and Stroke Statistics. *Circulation* 2014; 129: e28-e292.
- ⁴ Ministerio de Salud Pública, Cuba. Anuario estadístico de salud, 2014. (Folleto en internet) (acceso 8 noviembre 2015). Disponible en: www.infomed.sld.cu/servicios/estadisticas/
- ⁵ Tatu L, Moulin T, Monnier G. The discovery of encephalic arteries. From Johann Jacob Wepfer to Charles Foix. *Cerebrovasc Dis* 2005; 20: 427–432.
- ⁶ Garrison FH. History of Neurology. 1969, Springfield, Illinois.
- ⁷ Karenberg A, Hort I. Medieval descriptions and doctrines of stroke: preliminary analysis of select sources. Part III: multiplying speculations—the high and late Middle Ages (1000–1450). *J Hist Neurosci* 1998; 3: 186–200.
- ⁸ Harrison WC. Dr William Harvey and the discovery of circulation. 1967, Macmillan, New York.
- ⁹ Gurdjian ES, Gurdjian ES. History of occlusive cerebrovascular disease, I: from Wepfer to Moniz. *Arch Neurol* 1979; 36: 340–343.
- ¹⁰ Paciaroni M, Bogousslavsky J. The history of stroke and cerebrovascular disease. *Handbook of Clinical Neurology* 2009; 92: 3-28.
- ¹¹ Perel P, Roberts I, Sena E, Wheble P, Briscoe C, Sandercock P *et al.* Comparison of treatment effects between animal experiments and clinical trials: systematic review. *BMJ* 2007; 334: 197-200.
- ¹² Hossmann KA. Cerebral ischemia: Models, methods and outcomes. *Neuropharmacology* 2008; 55: 257-70.
- ¹³ Guevara G M, Rodríguez R, Álvarez L A, Riaño M A, Rodríguez P. Mecanismos celulares y moleculares de la enfermedad cerebrovascular isquémica. *Rev Cubana Med* 2004; 43(4). Disponible en: http://bvs.sld.cu/revistas/med/vol43_4_04/med08404.htm
- ¹⁴ Ginsberg MD. Adventures in the pathophysiology of brain ischemia: penumbra, gene expression, neuroprotection. The 2002 Thomas Willis Lecture. *Stroke* 2003; 34: 214-223.
- ¹⁵ Candelario-Jalil E. Injury and repair mechanisms in ischemic stroke: considerations for the development of novel neurotherapeutics. *Curr Opin Investig Drugs* 2009; 10: 644–54.
- ¹⁶ Xing C, Arai K, Lo EH, Hommel M. Pathophysiologic cascades in ischemic stroke. *Int J Stroke* 2012; 7: 378–385.
- ¹⁷ Astrup J, Symon L, Branston NM, Lassen NA. Cortical evoked potential and extracellular K⁺ and H⁺ at critical levels of brain ischemia. *Stroke* 1977; 8: 51–57.
- ¹⁸ Lo EH. A new penumbra: transitioning from injury into repair after stroke. *Nat Med* 2008; 14: 497-500.
- ¹⁹ Dirnagl U, Iadecola C, Moskowitz MA. Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. *Trends Neurosci* 1999; 22: 391–397.
- ²⁰ Lipton P. Ischemic cell death in brain neurons. *Physiol Rev.* 1999; 79: 1431-1568.

- ²¹ Pignataro G, Simon RP, Xiong ZG. Prolonged activation of ASIC1a and the time window for neuroprotection in cerebral ischaemia. *Brain* 2007; 130: 151–58.
- ²² Mergenthaler P, Dirnagl U, Meisel A. Pathophysiology of stroke: lessons from animal models. *Metab Br Dis* 2004; 19: 151-67.
- ²³ Starkov AA, Chinopoulos C, Fiskum G. Mitochondrial calcium and oxidative stress as mediators of ischemic brain injury. *Cell Calcium* 2004; 36: 257–64.
- ²⁴ Halliwell B. Gutteridge JMC. Free radicals in biology and medicine. 4th edn, 2006, Oxford University Press, Oxford.
- ²⁵ Halliwell B. Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now? *J Neurochemistry* 2006; 97: 1634–58.
- ²⁶ Sattler R, Xiong Z, Lu WY, Hafner M, MacDonald JF, Tymianski M. Specific coupling of NMDA receptor activation to nitric oxide neurotoxicity by PSD- 95 protein. *Science* 1999; 284: 1845–48.
- ²⁷ Cao G, Xing J, Xiao X, Liou AK, Gao Y, Yin XM *et al.* Critical role of calpain I in mitochondrial release of apoptosis-inducing factor in ischemic neuronal injury. *J Neurosci* 2007; 27: 9278–93.
- ²⁸ Szabadkai G, Simoni AM, Bianchi K, De Stefani D, Leo S, Wieckowski MR *et al.* Mitochondrial dynamics and Ca²⁺ signaling. *Biochim Biophys Acta* 2006; 1763: 442–49.
- ²⁹ Rugarli EI, Langer T. Mitochondrial quality control: a matter of life and death for neurons. *EMBO J* 2012; 31: 1336–49.
- ³⁰ Baines CP. The molecular composition of the mitochondrial permeability transition pore. *J Mol Cell Cardiol* 2009; 46: 850–57.
- ³¹ Stavrovskaya IG, Kristal BS. The powerhouse takes control of the cell: Is the mitochondrial permeability transition a viable therapeutic target against neuronal dysfunction and death? *Free Radic Biol Med* 2005; 38: 687–97.
- ³² Kowaltowski AJ, de Souza-Pinto NC, Castilho RF, Vercesi AE. Mitochondria and reactive oxygen species. *Free Radic Biol Med* 2009; 47: 333–43.
- ³³ Cardoso AR, Chausse B, da Cunha FM, Luévano-Martínez LA, Marazzi TB, Pessoa PS *et al.* Mitochondrial compartmentalization of redox processes. *Free Radic Biol Med* 2012; 52: 2201–08.
- ³⁴ Allen CL, Bayraktutan U. Oxidative stress and its role in the pathogenesis of ischaemic stroke. *Int J Stroke* 2009; 4: 461–70.
- ³⁵ Szabó C, Ischiropoulos H, Radi R. Peroxynitrite: biochemistry, pathophysiology and development of therapeutics. *Nat Rev Drug Discov* 2007; 6: 662-80.
- ³⁶ Augusto O, Bonini MG, Amanso AM, Linares E, Santos CC, De Menezes SL. Nitrogen dioxide and carbonate radical anion: two emerging radicals in biology. *Free Radic Biol Med* 2002; 32: 841–59.
- ³⁷ Gal S, Zheng H, Fridkin M, Youdim MB. Novel multifunctional neuroprotective iron chelator–monoamine oxidase inhibitor drugs for neurodegenerative diseases. In vivo selective brain monoamine oxidase inhibition and prevention of MPTP-induced striatal dopamine depletion. *J Neurochem* 2005; 95: 79–88.
- ³⁸ Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* 2007; 39: 44-84.
- ³⁹ Simonian NR, Coyle JT. Oxidative stress in neurodegenerative diseases *Ann Rev Pharmacol Toxicol* 1996; 36: 83-106.
- ⁴⁰ Infanger DW, Sharma RV, Davisson RL. NADPH oxidases of the brain: distribution, regulation, and function. *Antioxid Redox Signal* 2006; 8: 1583–96.
- ⁴¹ Kahles T, Brandes RP. NADPH oxidases as therapeutic targets in ischemic stroke. *Cell Mol Life Sci* 2012; 69: 2345–63.
- ⁴² Leonard SS, Harris GK, Shi X. Metal-induced oxidative stress and signal transduction. *Free Radic Biol Med* 2004; 37: 1921–42.

- ⁴³ Liochev SI, Fridovich I. The Haber–Weiss cycle—70 years later: An alternative view. *Redox Rep* 2002; 7: 55–57.
- ⁴⁴ Selim MH, Ratan RR. The role of iron neurotoxicity in ischemic stroke. *Ageing Res Rev* 2004; 3: 345–53.
- ⁴⁵ Cui K, Luo X, Xu K, Ven Murthy MR. Role of oxidative stress in neurodegeneration: recent developments in assay methods for oxidative stress and nutraceutical antioxidants. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2004; 28: 771–99.
- ⁴⁶ Turrens JF. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J Physiol* 2003; 552: 335–44.
- ⁴⁷ Brigelius-Flohe R. Tissue-specific functions of individual glutathione peroxidases. *Free Radic Biol Med* 1999; 27: 951–65.
- ⁴⁸ Saito A, Maier CM, Narasimhan P, Nishi T, Song YS, Yu F *et al.* Oxidative stress and neuronal death/survival signaling in cerebral ischemia. *Mol Neurobiol* 2005; 31: 105–16.
- ⁴⁹ Sofroniew MV, Vinters HV. Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol* 2010; 119: 7–35.
- ⁵⁰ Ballabh P, Braun A, Nedergaard M. The blood–brain barrier: an overview: structure, regulation, and clinical implications. *Neurobiol Dis* 2004; 16: 1–13.
- ⁵¹ Escobar A, Gómez B. Barrera hematoencefálica. *Neurobiología, implicaciones clínicas y efectos del estrés sobre su desarrollo. Rev Mex Neuroci* 2008; 9: 395–405.
- ⁵² Peerschke EI, Yin W, Ghebrehiwet B. Complement activation on platelets: implications for vascular inflammation and thrombosis. *Mol Immunol* 2010; 47: 2170–75.
- ⁵³ Eltzschig HK, Carmeliet P. Hypoxia and inflammation. *N Engl J Med* 2011; 364: 656–65.
- ⁵⁴ Konsman JP, Drukarch B, Van Dam AM. (Peri)vascular production and action of pro-inflammatory cytokines in brain pathology. *Clin Sci (Lond.)* 2007; 112: 1–25.
- ⁵⁵ Takano T, Oberheim N, Cotrina ML, Nedergaard M. Astrocytes and ischemic injury. *Stroke* 2009; 40: S8–S12.
- ⁵⁶ Yenari MA, Kauppinen TM, Swanson RA. Microglial activation in stroke: therapeutic targets. *Neurotherapeutics* 2010; 7: 378–91.
- ⁵⁷ Marsh BJ, Williams-Karnesky RL, Stenzel-Poore MP. Toll-like receptor signaling in endogenous neuroprotection and stroke. *Neuroscience* 2009; 158: 1007–20.
- ⁵⁸ Yilmaz G, Arumugam TV, Stokes KY, Granger DN. Role of T lymphocytes and interferon-gamma in ischemic stroke. *Circulation* 2006; 113: 2105–12.
- ⁵⁹ Konoeda F1, Shichita T, Yoshida H, Sugiyama Y, Muto G, Hasegawa E *et al.* Therapeutic effect of IL-12/23 and their signaling pathway blockade on brain ischemia model. *Biochem Biophys Res Commun* 2010; 402: 500–6.
- ⁶⁰ Liesz A1, Zhou W, Mracskó É, Karcher S, Bauer H, Schwarting S *et al.* Inhibition of lymphocyte trafficking shields the brain against deleterious neuroinflammation after stroke. *Brain* 2011; 134: 704–20.
- ⁶¹ Puyal J, Ginet V, Clarke PG. Multiple interacting cell death mechanisms in the mediation of excitotoxicity and ischemic brain damage: a challenge for neuroprotection. *Prog Neurobiol* 2013; 105: 24–48.
- ⁶² Yuan J. Neuroprotective strategies targeting apoptotic and necrotic cell death for stroke. *Apoptosis* 2009; 14: 469–77.
- ⁶³ Luo T, Park Y, Sun X, Liu C, Hu B. Protein misfolding, aggregation, and autophagy after brain ischemia. *Transl Stroke Res* 2013; 4: 581–8.
- ⁶⁴ Lee J, Giordano S, Zhang J. Autophagy, mitochondria and oxidative stress: cross-talk and redox signalling. *Biochem J* 2012; 441: 523–40.
- ⁶⁵ Li Q, Zhang T, Wang J, Zhang Z, Zhai Y, Yang GY *et al.* Rapamycin attenuates mitochondrial dysfunction via activation of mitophagy in experimental ischemic stroke. *Biochem Biophys Res Commun* 2014; 444: 182–8.
- ⁶⁶ Donnan G, Fisher M, Macleod M, Davis SM. Stroke. *Lancet* 2008; 371: 1612–23.

- ⁶⁷ The International Stroke Trial (IST): a randomized trial of aspirin, subcutaneous heparin, both, or neither among 19,435 patients with acute ischaemic stroke. International Stroke Trial Collaborative Group. *Lancet* 1997; 349: 1569–81.
- ⁶⁸ Vahedi K, Hofmeijer J, Juettler E, Vicaut E, George B, Algra A *et al.* Early decompressive surgery in malignant infarction of the middle cerebral artery: a pooled analysis of three randomised controlled trials. *Lancet Neurol* 2007; 6: 215–22.
- ⁶⁹ Tissue plasminogen activator for acute ischemic stroke. The National Institute of Neurological Disorders and Stroke rt-PA Stroke Study Group. *N Engl J Med* 1995; 333: 1581–87.
- ⁷⁰ Khatri P, Hill MD, Palesch YY, Spilker J, Jauch EC, Carrozzella JA *et al.* Methodology of the Interventional Management of Stroke III Trial. *Int J Stroke* 2008; 3: 130–7.
- ⁷¹ Smith WS, Sung G, Starkman S, Saver JL, Kidwell CS, Gobin YP *et al.* Safety and efficacy of mechanical embolectomy in acute ischemic stroke: results of the MERCI trial. *Stroke* 2005; 36: 1432–38.
- ⁷² Bose A, Henkes H, Alfke K, Reith W, Mayer TE, Berlis A *et al.* The Penumbra System: a mechanical device for the treatment of acute stroke due to thromboembolism. *AJNR Am J Neuroradiol* 2008; 29: 1409–13.
- ⁷³ Tsvigoulis G, Eggers J, Ribo M, Perren F, Saqqur M, Rubiera M *et al.* Safety and efficacy of ultrasound-enhanced thrombolysis: a comprehensive review and meta-analysis of randomized and nonrandomized studies. *Stroke* 2010; 41: 280–87.
- ⁷⁴ Liberatore GT, Samson A, Bladin C, Schleuning WD, Medcalf RL. Vampire bat salivary plasminogen activator (desmoteplase): a unique fibrinolytic enzyme that does not promote neurodegeneration. *Stroke* 2003; 34: 537–43.
- ⁷⁵ Haley EC, Thompson JL, Grotta JC, Lyden PD, Hemmen TG, Brown DL *et al.* Tenecteplase in stroke investigators. Phase IIB/III trial of tenecteplase in acute ischemic stroke: results of a prematurely terminated randomized clinical trial. *Stroke* 2010; 41: 707–11.
- ⁷⁶ Levy DE, del Zoppo GJ, Demaerschalk BM, Demchuk AM, Diener HC, Howard G *et al.* Ancrod in acute ischemic stroke: results of 500 subjects beginning treatment within 6 hours of stroke onset in the ancrod stroke program. *Stroke* 2009; 40: 3796–3803.
- ⁷⁷ Xu G, Liu X, Zhu W, Yin Q, Zhang R, Fan X. Feasibility of treating hyperfibrinogenemia with intermittently administered batroxobin in patients with ischemic stroke/transient ischemic attack for secondary prevention. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2007; 18: 193–97.
- ⁷⁸ Hu HH, Teng MM, Hsu LC, Wong WJ, Wang LM, Luk YO *et al.* A pilot study of a new thrombolytic agent for acute ischemic stroke in Taiwan within a five-hour window. *Stroke* 2006; 37: 918–9.
- ⁷⁹ Ginsberg MD. Neuroprotection for ischemic stroke: past, present and future. *Neuropharmacology* 2008; 55: 363–89.
- ⁸⁰ Castillo J, Alvarez-Sabin J, Davalos A, Diez-Tejedor E, Lizasoain I, Martínez-Vila E *et al.* Consensus review. Pharmacological neuroprotection in cerebral ischemia: Is it still a therapeutic option? *Neurologia* 2003; 18: 368–84.
- ⁸¹ Castillo J. Luces y sombras de la neuroprotección en la isquemia cerebral. *Neuropsiquiatría* 2001; 64: 354–81.
- ⁸² Danton GH, Dietrich WD. The search for neuroprotective strategies in stroke. *AJNR* 2004; 25: 181–194.
- ⁸³ Sahota P, Savitz SI. Investigational therapies for ischemic stroke: neuroprotection and neurorecovery. *Neurotherapeutics* 2011; 8: 434–45.
- ⁸⁴ Pentón-Rol G, Marín-Prida J, Pardo-Andreu G, Martínez-Sánchez G, Acosta-Medina EF, Valdivia-Acosta A *et al.* C-Phycocyanin is neuroprotective against global cerebral ischemia/reperfusion injury in gerbils. *Brain Res Bull* 2011, Aug 10; 86 (1-2): 42–52.
- ⁸⁵ Marín-Prida J, Pentón-Rol G, Rodrigues FP, Alberici LC, Stringhetta K, Leopoldino AM *et al.* C-Phycocyanin protects SH-SY5Y cells from oxidative injury, rat retina from transient ischemia and rat brain mitochondria from Ca²⁺/phosphate-induced impairment. *Brain Res Bull* 2012; 89: 159–167.

-
- ⁸⁶ Marín-Prida J, Llópiz-Arzuaga A, Pavón N, Pentón-Rol G, Pardo-Andreu GL. Applications of C-Phycocyanin: methods of purification and pharmacological properties. *Revista de Ciencias Farmacéuticas y Alimentarias* 2015; 1 (1): 29-43.
- ⁸⁷ Barreto G, White RE, Ouyang Y, Xu L, Giffard RG. Astrocytes: targets for neuroprotection in stroke. *Cent Nerv Syst Agents Med Chem*. 2011; 11: 164–173.
- ⁸⁸ Niv F, Keiner S, Krishna K, Witte OW, Lie DC, Redecker C. Aberrant neurogenesis after stroke: a retroviral cell labeling study. *Stroke* 2012; 43: 2468-75.
- ⁸⁹ Darsalia V, Heldmann U, Lindvall O, Kokaia Z. Stroke-induced neurogenesis in aged brain. *Stroke* 2005; 36: 1790–95.
- ⁹⁰ Dibajnia P, Morshead C. Role of neural precursor cells in promoting repair following stroke. *Acta Pharmacol Sin* 2013; 34: 78-90.
- ⁹¹ Sun BL, He MQ, Han XY, Sun JY, Yang MF, Yuan H *et al*. Intranasal delivery of Granulocyte Colony-Stimulating Factor enhances its neuroprotective effects against ischemic brain injury in rats. *Mol Neurobiol* 2016; 53: 320-30.
- ⁹² de la Peña IC, Yoo A, Tajiri N, Acosta SA, Ji X, Kaneko Y *et al*. Granulocyte colony-stimulating factor attenuates delayed tPA-induced hemorrhagic transformation in ischemic stroke rats by enhancing angiogenesis and vasculogenesis. *J Cereb Blood Flow Metab* 2015; 35: 338-46.
- ⁹³ Larphaveesarp A, Ferriero DM, Gonzalez FF. Growth factors for the treatment of ischemic brain injury (Growth Factor Treatment). *Brain Sci* 2015; 5: 165-77.