



Escuela Internacional de Doctorado

Facultad de Salud

**Evaluación de la capacidad
neuroprotectora de nuevas nitronas
para el tratamiento de la isquemia
cerebral**

Beatriz Chamorro Gorines

Dirigida por María Jesús Oset Gasque y José Luis Marco Contelles

Tutor: Francisco López Muñoz

Madrid, 2023

Ilustración de la portada: Paula Cenalmor
(<https://www.behance.net/paul4cenal99>).

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, me gustaría dedicar unas cuantas palabras en agradecimiento a las personas que me han ayudado a hacerla posible.

Sin ninguna duda, la primera persona a la que tengo que agradecer su apoyo incondicional es a mi co-directora de tesis, María Jesús Oset. Comencé mi carrera investigadora realizando el trabajo de fin de máster con ella, y desde entonces, se convirtió en mi máximo referente, enseñándome y corrigiéndome a cada paso, lo que permitió que yo pudiera desarrollar mi carrera y emprender este viaje de la manera en que lo he hecho. Siempre abierta al debate y al diálogo, agradezco todo el respaldo y los consejos, así como sus palabras para guiarme cada vez que resultaba muy complicado encontrar la salida a las dificultades. Y todo ello sin perder el ánimo ni la esperanza a pesar de todos los obstáculos que hemos tenido en el camino. Por otro lado, tengo que extender mi profundo agradecimiento al Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la UCM por permitirme realizar esta investigación en sus instalaciones.

También necesito agradecer inmensamente la labor de mi co-director José Luis Marco. Gracias a su colaboración, pude desarrollar esta tesis, ya que sin él no habría sido posible. Además, sus consejos y su apoyo en el ámbito de la química médica han sido completamente decisivos para mí, así que siempre le estaré agradecida por ello.

Otra persona a la que tengo que agradecer por toda la ayuda ofrecida, además de su gran comprensión y paciencia en todos los ámbitos, es a mi tutor Francisco López. Siempre he podido contar con él para consultar cualquier duda, por lo que su guía ha sido de incalculable valor para mí. Sin su asesoramiento, este trabajo no habría culminado de esta manera tan acertada. Además, también me gustaría agradecer inmensamente al grupo educativo SEK por otorgarme una Beca Predoctoral de excelencia I+D durante los años de 2019 a 2022, gracias a la cual se ha podido financiar este trabajo de investigación.

Debo agradecer también la ayuda prestada por todos los grupos de investigación que han intervenido en algún punto de la síntesis y la caracterización de los compuestos que se describen en este trabajo, en especial al grupo del Dr. Ricardo Martínez Murillo en el Instituto Cajal, gracias a quien fueron posible los experimentos *in vivo* de pMCAO y con quien tuve la oportunidad de colaborar. Su colaboración ha sido un pilar muy importante en esta tesis, y por ello, tienen mi gratitud.

Tampoco puedo olvidarme de agradecer a Paula, a M^a Ángeles y a Soledad, quienes con mucho empeño y esfuerzo, me han ayudado a dar la forma de esta tesis doctoral. Gracias a ellas y a su inestimable ayuda, esta tesis es el trabajo del que me enorgullezco hoy.

Por otro lado, tengo que agradecer a mi familia, mis padres, que son quienes han estado a mi lado en todo momento hasta que he llegado aquí. A mi madre Beatriz, con quien no sólo compartimos nombre, sino que también compartimos un vínculo tan fuerte que nada es capaz de dañarlo o romperlo. A mi padre Emiliano, con quien también comparto dicho vínculo, y que siempre me enseña las cosas desde su punto de vista, pero también tiene un don para aliviar y sacar una sonrisa en cualquier situación. Ambos habéis sido los principales pilares de mi vida, que habéis hecho que me convierta en quien soy ahora, y a los que adoro con locura. Siempre habéis sabido comprenderme y apoyarme, ayudándome a salir de los peores momentos y disfrutar al máximo en los buenos, y sinceramente, no puedo pedir nada más al universo. De corazón, gracias por darme siempre todo vuestro amor. Os quiero.

Siguiendo con mi familia, mis tíos y mis primos también han sido otro pilar en mi vida. La cantidad de tardes que hemos pasado jugando a cualquier plataforma, o incluso a las cartas, pero siempre en nuestra buena compañía. Nunca voy a olvidar todos los momentos vividos juntos, todos esos pequeños momentos y detalles que han hecho que esté donde esté, gracias a vosotros.

Tampoco puedo olvidarme de mis abuelos. Aquellos que siguen estando, Emi y Mari, y aquellos que me dejaron hace unos años, Guille y Carmen. Abuelitos, vosotros que me habéis cuidado tanto y que habéis dado tanto por mí, mirad ahora desde donde estéis, más lejos o más cerca, porque siempre os veo en cualquier cosa que hago. Siempre os querré y os llevaré en mi corazón. Gracias por todo lo que sois y lo que me habéis aportado en la vida.

Por supuesto, no puedo terminar sin hablar de mis amigos. Aquellos que estáis desde hace bastante tiempo, mi grupo de cuatro fantásticos favorito, que son Paula, Darwin, Javi y María. Gracias por todos los momentos bizarros, y no tan bizarros, que hemos vivido, y por todos los que quedan a vuestro lado. Gracias por aguantar mis momentos frikis e incluso ir a las expos a verme y apoyarme, o adentraros en la tienda de *merchandising* más conocida de Madrid solo porque sabíais que esos regalos me iban a encantar. Gracias por ser mi apoyo seguro, por seguir juntos tras tanto tiempo, y por hacer que las preocupaciones a vuestro lado parezcan desaparecer. Gracias por todos los viajes, las excursiones y los buenos planes que nos hemos marcado, ¡y los que quedan!

Gracias también a mis amigos y compañeros de laboratorio, Sara y Miguel. Gracias por haber hecho este último año mucho más llevadero, por haber colaborado en todo lo que podíais conmigo, por

todos los buenos momentos y risas (también lloros en el revelador de Western Blot) que hemos compartido. Gracias por aguantarme, por estar ahí siempre, y espero que después de estos momentos que hemos vivido, nos queden muchos más. Gracias también a Alejandra, nuestra TFG compartida y favorita (a veces te robo la bata de laboratorio sin querer), y por supuesto, muchísimas gracias a mi querido amigo David, compañero inseparable de comidas en la facultad de Farmacia y a quién le tengo un cariño inmenso. Sin vosotros no sería lo mismo.

A veces ocurre que la distancia que separa a los amigos es muy grande, pero la que los une es muy, muy pequeña. Eso es lo que me ocurre con mi amiga Sandra, con la que hablo tooodos los días, nos tiramos mandando audios de más de 5 min (y estoy redondeando a la baja) contándonos todo lo que nos ha pasado en el día, aunque realmente sea muy parecido al anterior. Y sinceramente, es mi momento favorito del día, el de recibir sus audios y poder contestarle mandándole otro igual. Siempre estaré agradecida por tu confianza, por todo lo que me escuchas y me comprendes y me animas, no sé si podría haber llegado tan lejos sin todo tu cariño. También vive muy lejos de mí un amigo con el que he compartido momentos preciosos, momentos de locura y mil millones de experiencias más que guardaré para siempre en mi corazón... Mi amigo Manu, orgulloso zamorano y de increíble talento, tanto encima de un escenario como fuera de él. Sin olvidarme de ir al sur... Porque allí fue donde conocí a mi amiga Alejandra, o como me gusta llamarla a mí, Chibi. Gracias por aguantar todos mis dramitas cotidianos, por apoyarme siempre y por darme todos tus valiosos consejos. Nunca cambiaría nuestras noches conectadas al ordenador por nada del mundo, haciendo cualquier cosa. Gracias y mil gracias a todos por aparecer en mi vida, y por seguir formando parte de ella.

Por último, pero no menos importante, tengo que agradecer a alguien muy especial en mi vida. Gracias a él, he podido soportar momentos en los que no era fácil mantener el ánimo. También ha sido mi compañero indirecto en esta aventura, porque no se puede calificar de otra manera este trabajo de investigación. Gracias por sostener mi mano cuando más lo necesito, gracias por acompañarme en mis momentos de mayor dicha, y gracias también por la paz que me transmites tan solo por estar contigo. Gracias, Javi.

ÍNDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	5
ABREVIATURAS	9
I. INTRODUCCIÓN	15
1. Teorías del envejecimiento	16
1.1. Teoría de la acumulación de mutaciones (MAT)	17
1.2. Teoría de la pleiotropía antagonista (APT)	17
1.3. Teoría del soma dispensable (DST).....	17
1.4. Teoría de los radicales libres (FRT) o del estrés oxidativo (OST)...	18
2. Enfermedades asociadas a la edad.....	22
2.1. Ictus e isquemia cerebral	23
2.1.1. <i>FISIOPATOLOGÍA DE LA ISQUEMIA CEREBRAL</i>	25
2.1.2. <i>CASCADA ISQUÉMICA</i>	27
2.1.3. <i>TIPOS DE MUERTE CELULAR EN LA ISQUEMIA CEREBRAL</i>	30
2.1.3.1. <i>Apoptosis</i>	30
2.1.3.2. <i>Necrosis</i>	35
2.1.3.3. <i>Autofagia</i>	37
2.2. <i>Enfermedades neurodegenerativas: la enfermedad de Alzheimer</i>	41
2.3. <i>Relación entre la isquemia y la demencia: la demencia vascular</i> ...	44
3. <i>Tratamientos actuales para el ictus isquémico</i>	47
3.1. <i>Activador tisular del plasminógeno recombinante</i>	47

3.2.	Retirada mecánica del coágulo.....	47
3.3.	Tratamientos neuroprotectores y neuroreparadores	48
4.	Tratamientos antioxidantes para el ictus y las enfermedades neurodegenerativas.....	52
4.1.	Inhibición de la formación de RONS	52
4.2.	Potenciación de la degradación de RONS	53
4.3.	Eliminación de radicales libres.....	53
5.	Las nitronas como nuevos fármacos para el tratamiento de las Enfermedades de la Edad	55
5.1.	Nitronas: estructura y mecanismos de acción	55
5.2.	Contribuciones del grupo de investigación al estudio del tratamiento con nitronas para el tratamiento de las enfermedades de la edad	57
II.	OBJETIVOS E HIPÓTESIS	63
III.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	67
1.	Materiales: compuestos de estudio.....	67
1.1.	Homo- <i>bis</i> -nitronas (HBNs)	67
1.2.	Homo- <i>tris</i> -nitronas (HTNs)	68
1.3.	Bi-fenil-nitronas (BPNs).....	68
1.4.	Quinolil-nitronas (QNs).....	69
1.5.	QN23 y ChN2.....	71
1.6.	Nitronas derivadas de nucleobases (NDNs)	72
1.6.1.	<i>MONO-NITRONAS DERIVADAS DE NUCLEOBASES (NDNS)</i>	<i>72</i>
1.6.2.	<i>BIS-NITRONAS DERIVADAS DE NUCLEOBASES (NDNS)</i>	<i>73</i>
2.	Métodos.....	73

2.1. Cultivos celulares de neuroblastoma	73
2.2. Tratamientos tóxicos	74
2.2.1. <i>TRATAMIENTO CON OLIGOMICINA A Y ROTENONA</i>	74
2.2.2. <i>TRATAMIENTO DE ISQUEMIA EXPERIMENTAL</i>	76
2.3. Estudio de la capacidad neuroprotectora.....	78
2.3.1. <i>MEDIDA DE LA VIABILIDAD CELULAR</i>	78
2.3.2. <i>MEDIDA DE LA ACTIVIDAD ANTI-NECRÓTICA</i>	79
2.3.3. <i>MEDIDA DE LA ACTIVIDAD ANTI-APOPTÓTICA</i>	80
2.4. Medida de la actividad antioxidante	81
2.5. Estudio de la autofagia: experimentos de Western Blot	84
2.5.1. <i>PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS</i>	84
2.5.2. <i>ELECTROFORESIS</i>	86
2.5.3. <i>TRANSFERENCIA A MEMBRANAS, BLOQUEO E INCUBACIÓN CON ANTICUERPOS</i>	86
2.5.4. <i>REVELADO DE LAS MEMBRANAS. QUIMIOLUMINISCENCIA (ECL)</i>	87
2.6. Experimentos <i>in vivo</i> : oclusión permanente de la arteria cerebral media (pMCAO)	88
2.6.1. <i>PREPARACIÓN DE LOS ANIMALES Y PROCEDIMIENTO QUIRÚRGICO DE PMCAO</i>	89
2.6.2. <i>MEDIDA DEL VOLUMEN DE INFARTO MEDIANTE TINCIÓN CON TTC</i>	90
2.6.3. <i>MEDIDA DEL VOLUMEN DE INFARTO MEDIANTE MRI</i>	90
2.7. Análisis estadístico	92
IV. RESULTADOS	95
1. Efecto neuroprotector y antioxidante de las homo- <i>bis</i> -nitronas.....	95
1.1. Efecto neuroprotector frente al daño mitocondrial.....	95

1.2.	Efecto neuroprotector frente a privación de oxígeno y glucosa (OGD).....	97
1.3.	Efecto de las HBNs frente a necrosis y apoptosis inducida por OGD	100
1.4.	Neurotoxicidad basal de las HBNs.....	102
1.5.	Capacidad antioxidante de las HBNs	103
1.6.	Contribución de HBN6 a la prevención del daño cerebral.....	106
2.	Efecto neuroprotector y antioxidante de las homo- <i>tris</i> -nitronas	109
2.1.	Efecto neuroprotector frente al daño mitocondrial.....	109
2.2.	Efecto neuroprotector frente a privación de oxígeno y glucosa (OGD).....	112
2.3.	Efecto neuroprotector de las HTNs en muerte celular necrótica y apoptótica inducida por OGD.....	114
2.4.	Neurotoxicidad basal de las HTNs.....	117
2.5.	Capacidad antioxidante de las HTNs	118
3.	Efecto neuroprotector y antioxidante de las bi-fenil-nitronas (BPMNs y BPHBNs)	121
3.1.	Estudio de neuroprotección frente a la disfunción mitocondrial... ..	121
3.2.	Análisis de neuroprotección en un modelo de privación de oxígeno y glucosa (OGD) seguido de perfusión (IR)	123
3.3.	Efecto de las BPNs 1-5 sobre la muerte celular necrótica y apoptótica inducida por el modelo de OGD e IR.....	126
3.4.	Neurotoxicidad basal de las BPNs, PBN y NAC.....	128

3.5.	Capacidad antioxidante de las BPNs 1-5, PBN y NAC: eliminación de radical superóxido.....	129
4.	Efecto neuroprotector y antioxidante de las nitronas derivadas de nucleobases (NDNs).....	132
4.1.	Efectos neuroprotectores de las NDNs en el modelo de privación de oxígeno y glucosa (OGD).....	132
4.2.	Efectos neuroprotectores de las NDNs en la muerte celular necrótica y apoptótica inducida por el modelo de OGD e IR.....	136
4.2.1.	<i>ANÁLISIS DEL EFECTO NEUROPROTECTOR DE LAS NITRONAS DERIVADAS DE NUCLEOBASES.....</i>	<i>139</i>
4.3.	Neurotoxicidad basal de las nitronas 9a-i.....	141
4.4.	Actividad antioxidante de las nitronas 9a-i.....	142
5.	Efecto neuroprotector y antioxidante de las quinolil-nitronas (QNs)...	146
5.1.	Análisis de la neuroprotección de QNs 1-6 en un modelo de OGD-IR	146
5.2.	Efecto de las QNs 1-6 en la muerte celular necrótica y apoptótica inducida por OGD-IR.....	149
5.3.	Neurotoxicidad basal de las QNs 1-6.....	155
5.4.	Capacidad antioxidante de QNs 1-6: producción de O ₂ ^{·-} en células SH-SY5Y	155
5.5.	Contribución de QN6 a la prevención del daño cerebral.....	158
6.	Propiedades neuroprotectoras y antioxidantes de la colesteronitrona ChN2 y la quinolil-nitrona QN23.....	161
6.1.	Perfil neuroprotector de ChN2, QN23 y HBN6: efecto sobre la viabilidad celular o actividad metabólica	162

6.2.	Efectos de ChN2, QN23 y HBN6 sobre la muerte celular necrótica y apoptótica	165
6.3.	Neurotoxicidad basal de ChN2 y QN23 comparativa con HBN6, PBN y NAC.....	169
6.4.	Efectos antioxidantes de ChN2 y QN23	170
6.5.	Correlación entre las diferentes propiedades neuroprotectoras de ChN2, QN23, HBN6, PBN y NAC.....	172
7.	Implicación de la autofagia en la muerte celular inducida por el estrés oxidativo y la isquemia experimental, y en el efecto neuroprotector de las nitronas.....	175
7.1.	Implicación de la autofagia en la muerte celular inducida por el estrés oxidativo y la isquemia experimental	175
7.2.	Implicación de la autofagia el efecto neuroprotector de ChN2, QN23, HBN6, PBN y NAC	180
V.	DISCUSIÓN	187
1.	Efecto neuroprotector y antioxidante de las homo- <i>bis</i> -nitronas (HBNs), las homo- <i>tris</i> -nitronas (HTNs) y las bi-fenil-nitronas (BPNs)	187
2.	Efecto neuroprotector y antioxidante de las nitronas derivadas de nucleótidos (NDNs)	193
3.	Efecto neuroprotector y antioxidante de las quinolil-nitronas (QNs) ...	196
4.	Efecto neuroprotector y antioxidante de la ChN2 y QN23	199
VI.	CONCLUSIONES	205
VII.	BIBLIOGRAFÍA	211
VIII.	ANEXO: RESUMEN DE LOS TRABAJOS PUBLICADOS EN ESTA TESIS DOCTORAL	239

ÍNDICE DE FIGURAS

INTRODUCCIÓN

Figura 1. Esperanza de vida mundial en 2019	15
Figura 2. Rutas de formación y eliminación de ROS.....	20
Figura 3. Representación esquemática de enfermedades asociadas a la edad...	23
Figura 4. Representación esquemática de la cascada de señalización celular que conduce a necrosis, neurotoxicidad e inflamación, y contribuye a la progresión del daño cerebral.....	28
Figura 5. Cascada de señalización de la vía intrínseca de la apoptosis.....	32
Figura 6. Esquema de la cascada de señalización de la vía extrínseca de la apoptosis.....	35
Figura 7. Esquema representativo de los pasos iniciales de la autofagia	38
Figura 8. Esquema de las posibles vías de señalización de la autofagia en la isquemia cerebral.....	41
Figura 9. Tipos de demencia y porcentaje de casos en función de cada uno de ellos	45
Figura 10. Modelo hipotético del papel de la disfunción de los vasos sanguíneos en la AD	46
Figura 11. Estructura general de una nitrona (a) y principales nitronas ensayadas en investigación (b, c, d)	56

MATERIALES Y MÉTODOS

Figura 12. Estructura de las homo- <i>bis</i> -nitronas (HBNs) 1-9 ensayadas en esta tesis doctoral	67
Figura 13. Estructura de las homo- <i>tris</i> -nitronas (HTNs) 1-3 ensayadas en esta tesis doctoral	68
Figura 14. Estructuras de las 6 bi-fenil-nitronas (BPNs) sintetizadas.....	69

Figura 15. Estructura de las quinolil-nitronas (QNs) 1-6 ensayadas en este trabajo de investigación.....	70
Figura 16. Estructura de la colesteronitrona ChN2 (A) y la quinolil-nitrona 23 (QN23) (B) ensayadas en este trabajo de investigación	1
Figura 17. Estructura de las nueve nitronas derivadas de nucleobases (NDNs) ensayadas en este trabajo de investigación.....	72
Figura 18. Representación esquemática de las dos partes de la respiración celular: la cadena de transporte de electrones mitocondrial (MRC) y la fosforilación oxidativa mitocondrial, y dianas de acción de los inhibidores oligomicina y rotenona	75
Figura 19. Fórmula para el cálculo del porcentaje de liberación de LDH.....	80
Figura 20. Detección de ROS en células intactas	82
Figura 21. Medida de ROS ($O_2^{\bullet-}$) en células de neuroblastoma humano SH-SY5Y mediante la sonda fluorescente DHET.....	83
Figura 22. Arteria cerebral media y su bifurcación expuesta tras craneotomía..	89
Figura 23. Equipo ICON-1T de bioimagen de la UCM.....	91
RESULTADOS	
Figura 24. Efecto neuroprotector de las HBNs 1-9 en la viabilidad celular de células de neuroblastoma humano SH-SY5Y con O/R	95
Figura 25. Efecto neuroprotector de las HBNs 1-9 en la viabilidad de células de neuroblastoma tras OGD (4h) y reperusión (24 h) (IR 24 h)	98
Figura 26. Efecto de las HBNs 1-9 en la liberación de LDH en células SH-SY5Y tras IR	100
Figura 27. Efecto de las HBNs 1-9 en la actividad de la caspasa-3 en células de neuroblastoma SH-SY5Y tras IR	101
Figura 28. Efecto de las HBNs 1-9 y PBN en la viabilidad de células de neuroblastoma humano SH-SY5Y en condiciones basales.....	102

Figura 29. Efectos inhibitorios en la producción de ROS (superóxido) de HBNs 1-9 y PBN en células de neuroblastoma humano SH-SY5Y expuestas a 3 h de OGD y 3 h de IR.....	104
Figura 30. El tratamiento con HBN6 reduce el volumen de infarto tras pMCAO, rama frontal, en ratones.....	107
Figura 41. Efectos neuroprotectores de las BPNs 1-5, PBN y NAC frente a muerte celular necrótica (A) y apoptótica (B) inducida por el tratamiento de OGD e IR en células de neuroblastoma humano SH-SY5Y	128
Figura 42. Efecto de las BPNs 1-5, PBN y NAC sobre la viabilidad de las células de neuroblastoma humano SH-SY5Y en condiciones basales.....	129
Figura 43. Efectos inhibitorios de las BPNs 1-5, PBN y NAC sobre la producción de ROS (superóxido) en células de neuroblastoma humano SH-SY5Y sometidas a 3 h de OGD y 3 h de perfusión (IR).....	130
Figura 44. Efecto antioxidante de las BPNs 1-5, PBN y NAC tras IR en células de neuroblastoma humano SH-SY5Y	131
Figura 45. Efecto neuroprotector de las nitronas 9a-i, PBN y NAC en la actividad metabólica de células de neuroblastoma humano SH-SY5Y tras el tratamiento de 4 h de OGD y 24 h de IR	133
Figura 46. Efectos neuroprotectores de las NDNs 9a-i, PBN y NAC frente al daño metabólico celular inducido por el tratamiento de OGD e IR en cultivos de neuroblastoma humano SH-SY5Y	135
Figura 47. Efecto anti-necrótico de las nitronas 9a-i, PBN y NAC en células SH-SY5Y tras OGD e IR	136
Figura 48. Efectos protectores de las nitronas 9a-i, PBN y NAC frente a la muerte necrótica inducida por el tratamiento de IR en células SH-SY5Y	138
Figura 49. Efectos anti-apoptóticos de las nitronas 9a-i, PBN y NAC frente al tratamiento de OGD e IR en células SH-SY5Y	139

Figura 50. Efecto de las nitronas 9a-i, PBN y NAC en la viabilidad de células de neuroblastoma humano SH-SY5Y en condiciones basales.....	141
Figura 51. Efectos inhibitorios de las nitronas 9a-i, PBN y NAC en la producción de superóxido en cultivos celulares de SH-SY5Y sometidos a 3 h de OGD y 3 h de IR.....	142
Figura 52. Efecto antioxidante de las nitronas 9a-i, PBN y NAC tras OGD e IR en células de neuroblastoma humano SH-SY5Y	145
Figura 53. Efecto neuroprotector de las QNs 1-6, PBN y NAC en la actividad metabólica de células de neuroblastoma humano de la línea SH-SY5Y tras 4 h de OGD y 24 h de IR.....	147
Figura 54. Efectos neuroprotectores de las QNs 1-6, PBN y NAC frente a la pérdida de capacidad metabólica inducida por IR en células de neuroblastoma humano SH-SY5Y.....	148
Figura 55. Efecto de las QNs 1-6, PBN y NAC en la liberación de LDH tras el tratamiento de OGD-IR en células SH-SY5Y	149
Figura 56. Efecto de las QNs 1-6, PBN y NAC en la liberación de LDH tras el tratamiento de OGD-IR en células SH-SY5Y	151
Figura 57. Efectos neuroprotectores de QNs 1-6, PBN y NAC frente a muerte celular apoptótica inducida por OGD-IR en células SH-SY5Y.....	152
Figura 58. Efectos neuroprotectores de las QNs 1-6, PBN y NAC frente a la muerte apoptótica inducida por el tratamiento de OGD-IR en células de neuroblastoma humano SH-SY5Y	153
Figura 59. Efecto de las QNs 1-6, PBN y NAC en la viabilidad de células de neuroblastoma humano SH-SY5Y en condiciones basales.....	155
Figura 60. Efectos inhibitorios en la producción de ROS (superóxido) de QNs 1-6, PBN y NAC en las células SH-SY5Y expuestas a 3 h de OGD y 3 h de reperusión	157

Figura 61. Efecto antioxidante de QNs 1-6, PBN y NAC tras el tratamiento con OGD e IR en células SH-SY5Y.....	158
Figura 62. Estudio MRI de QN6 tras 48 h de la cirugía pMCAO.....	159
Figura 63. Efectos neuroprotectores de ChN2, QN23, HBN6, PBN y NAC frente a la pérdida de capacidad metabólica inducida por oligomicina-rotenona (O/R) (A) y privación de oxígeno y glucosa (OGD) de 3 h seguida de 24 h de reperfusión (IR) (B) en células de neuroblastoma humano SH-SY5Y.....	163
Figura 64. Efecto neuroprotector, dosis efectiva 50 (EC50) y actividad máxima de ChN2, QN23, HBN6, PBN y NAC frente a la pérdida de capacidad metabólica inducida por O/R (A, C) e IR (B y D) en células de neuroblastoma humano SH-SY5Y	165
Figura 65. Efectos anti-necróticos de ChN2, QN23, HBN6, PBN y NAC tras la exposición de células SH-SY5Y a 3 h de OGD y 24 h de IR	166
Figura 66. Efecto anti-necrótico de ChN2, QN23, HBN6, PBN y NAC tras exposición a IR en células de neuroblastoma humano SH-SY5Y	167
Figura 67. Efectos anti-apoptóticos de ChN2, QN23, HBN6, PBN y NAC tras la inducción de 3 h de OGD y 24 h de IR a células SH-SY5Y.....	168
Figura 68. Efecto anti-apoptótico de ChN2, QN23, HBN6, PBN y NAC tras exposición a IR en células de neuroblastoma humano SH-SY5Y	169
Figura 69. Efecto de ChN2, QN23, HBN6, PBN y NAC en la viabilidad de células de neuroblastoma humano SH-SY5Y en condiciones basales.....	170
Figura 70. Efectos antioxidantes de ChN2, QN23, HBN6, PBN y NAC en células SH-SY5Y tras la exposición a OGD-IR.....	171
Figura 71. Efecto antioxidante de ChN2, QN23, HBN6, PBN y NAC tras exposición a IR en células de neuroblastoma humano SH-SY5Y	172
Figura 72. Análisis de correlación entre valores de EC50 (μ M) para las propiedades neuroprotectoras (NP), antioxidantes (AO), anti-necróticas (AN) y	

anti-apoptóticas (AA) para los compuestos ChN2, QN23, HBN6, PBN y NAC173

Figura 73. Efecto del tratamiento con oligomicina-rotenona (O/R) durante 24 h sobre la expresión de proteínas autofágicas LC3 y p62 en cultivos de células SH-SY5Y.....177

Figura 74. Efecto del tratamiento con OGD durante 3 h (OGD) y reperusión durante 24 h (IR) sobre la expresión de proteínas autofágicas LC3 y p62 en células SH-SY5Y178

Figura 75. Efecto de los moduladores de autofagia CQ, 3-MA y Rapa en condiciones basales y con los tratamientos tóxicos de O/R y OGD sobre la viabilidad de las células SH-SY5Y.....179

Figura 76. Efecto de los compuestos neuroprotectores ChN2, QN23, HBN6, HBN5, PBN y NAC sobre la expresión de las proteínas autofágicas LC3 y p62 en el modelo de O/R.....181

Figura 77. Efecto de los compuestos neuroprotectores ChN2, QN23, HBN6, HBN5, PBN y NAC sobre la expresión de las proteínas autofágicas LC3 y p62 en el modelo de OGD-IR182

Figura 78. Efecto de los compuestos neuroprotectores ChN2, QN23, HBN6, PBN y NAC sobre la viabilidad celular de las SH-SY5Y tras los tratamientos de O/R y OGD, en ausencia o presencia de CQ183

DISCUSIÓN

Figura 79. Diagrama gráfico que muestra las conclusiones más importantes de este trabajo.....191

Figura 80. QN6 como agente único y multivalente para la terapia de la demencia vascular y la isquemia cerebral198

Figura 81. Diagrama gráfico que muestra las conclusiones más importantes de este trabajo sobre el efecto neuroprotector de ChN2 y QN23201

ÍNDICE DE TABLAS

INTRODUCCIÓN

Tabla 1. Principales especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno (RONS)..... 19

MATERIALES Y MÉTODOS

Tabla 2. Colección de anticuerpos primarios y secundarios utilizados en los experimentos de Western Blot..... 88

RESULTADOS

Tabla 3. Efecto neuroprotector de las HBNs 1-9 y NAC después del tratamiento con O/R en células de neuroblastoma humano SH-SY5Y 97

Tabla 4. Efecto neuroprotector de las HBNs 1-9, PBN y NAC tras OGD e IR en células de neuroblastoma humano SH-SY5Y..... 99

Tabla 5. Efecto antioxidante de las HBNs 1-9, PBN y NAC tras OGD e IR en células de neuroblastoma humano SH-SY5Y..... 105

Tabla 6. Efecto neuroprotector de HTNs 1-3, HBNs 4-6, PBN y NAC frente a neurotoxicidad inducida por oligomicina A y rotenona en células de neuroblastoma humano SH-SY5Y..... 112

Tabla 7. Efecto neuroprotector de las HTNs 1-3, HBNs 4-6, PBN y NAC tras la privación de oxígeno y glucosa y reperfusión (IR) en células de neuroblastoma humano SH-SY5Y 114

Tabla 8. Efecto de las HTNs 1-3, PBN y NAC en la liberación de lactato deshidrogenasa tras privación de oxígeno y glucosa y reperfusión en células de neuroblastoma humano SH-SY5Y; cálculo de las IC₅₀ y actividades inhibitorias máximas..... 116

Tabla 9. Efecto antioxidante de las HTNs 1-3, PBN y NAC tras privación de oxígeno y glucosa, con reperfusión, en células de neuroblastoma humano SH-SY5Y 120

RESUMEN

El ictus es la segunda causa de muerte a nivel mundial, y consiste en la alteración de las funciones cerebrales por la ausencia o reducción del flujo sanguíneo cerebral, sin otra causa aparente que un origen vascular. Los únicos tratamientos actualmente aprobados para el ictus isquémico son la retirada mecánica del coágulo y el fármaco fibrinolítico rtPA (activador tisular del plasminógeno recombinante), pero éste no se puede administrar en todos los casos y además su ventana terapéutica es muy reducida. Por ello, es de vital importancia la investigación de nuevas terapias para el tratamiento de esta patología, entre ellas, posibles moléculas que sean capaces de recuperar, o al menos de proteger, a las células de la penumbra para evitar la expansión de la muerte neuronal. Dentro de esas moléculas neuroprotectoras, nuestro grupo de investigación lleva años estudiando las nitronas, compuestos orgánicos capaces de atrapar radicales libres de oxígeno (ROS) – que son los principales responsables del estrés oxidativo – y, por tanto, con un gran potencial neuroprotector para el tratamiento de la isquemia cerebral (CI).

En este trabajo de tesis doctoral se ha estudiado la capacidad neuroprotectora y antioxidante de cinco familias nuevas de nitronas de síntesis, tres de ellas derivadas de la α -fenil-N-tert-butil nitrona (PBN): 1) **9 homo-bis-nitronas** con dos grupos nitrona en posición *para*-, *meta*- y *orto*-, y con sustituyentes *N*-Me, *N*-*t*-Bu o *N*-Bn (HBNs 1-9) idénticos en cada una de ellas; 2) **3 homo-tris-nitronas** con tres grupos nitrona y sustituyentes *N*-Me, *N*-*t*-Bu o *N*-Bn (HTNs 1-3) y 3) **5 bi-fenil-nitronas** con doble anillo bencénico como estructura base, con 3 compuestos con un grupo nitrona (BPMNs 1-3) y 2 con dos grupos nitrona (BPHBNs 4 y 5) idénticos en cada una de ellas. Además se han estudiado 4) **9 nitronas derivadas de nucleobases** (NDNs), 2 de tipo purina (9f, 9g), y 7 de tipo pirimidina, entre las que se pueden distinguir 5 *mono*-nitronas con un grupo nitrona y distinto sustituyente (9a-9e) y 2 *bis*-nitronas con 2 grupos nitrona y distinto sustituyente (9h, 9i); 5) **6 quinolil-nitronas** (QNs), con estructura quinolina como base; y 6) 2 nitronas (colesteronitrona ChN2 y quinolil-nitrona QN23) cuyo efecto neuroprotector se había estudiado anteriormente en distintos modelos experimentales de isquemia, *in vitro* e *in vivo*. Nuestras hipótesis principales han sido: 1) “A mayor número de grupos nitrona conjugados con el anillo bencénico, mayor neuroprotección” y 2) “Las nitronas

que incorporan nucleobases heterocíclicas en sus estructuras, o las conjugadas con anillos de 8-OH quinolina, deben ser mucho más potentes como agentes neuroprotectores que las conjugadas con anillos bencénicos". El estudio de la neuroprotección se llevó a cabo en modelos *in vitro* empleando cultivos celulares de la línea de neuroblastoma humano SH-SY5Y, sometidos a un modelo de isquemia experimental con privación de oxígeno y glucosa (OGD) y posterior re-oxigenación y re-suministro de glucosa (OGDR o IR), y a un modelo de estrés oxidativo con inhibidores de la cadena respiratoria celular (O/R). En algunos casos se utilizaron también modelos *in vivo*, mediante la oclusión permanente de la arteria cerebral media (pMCAO). Los ensayos utilizados fueron la medida de la viabilidad celular o capacidad metabólica mitocondrial, y la evaluación de distintos tipos de muerte celular subyacentes a la isquemia cerebral: necrosis, apoptosis y autofagia. Además, se estudió la capacidad antioxidante de estos compuestos mediante la medida del radical anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$), estableciéndose en todos los casos las EC_{50} 's y actividades máximas efectoras. Los resultados demostraron que casi todas las nitronas ensayadas presentan una capacidad neuroprotectora y antioxidante significativa, similar o en algunos casos bastante superior a la de PBN, utilizada como nitrona de referencia, y similar a la de N-acetil cisteína (NAC), un conocido compuesto antioxidante. Entre los 3 grupos de nitronas estudiadas derivadas de PBN, los resultados muestran que, en general, la presencia de dos grupos nitrona (BPHBNs, HBNs) mejora los efectos neuroprotectores y antioxidantes de los compuestos respecto a aquellos que contienen un único grupo nitrona. Sin embargo, la presencia de un tercer grupo nitrona (HTNs) no induce una mejora en estas propiedades. Por otro lado, los compuestos con grupos nitrona en posición *meta-* (HBN5 y HBN6) y *orto-* (HBN8 y HBN9) poseen mejores capacidades neuroprotectoras que los compuestos *para-*. Igualmente, las nitronas con sustituyentes *N-t*-Bu (HBN5, HTN2, BPHBN5) y *N-Bn* (HBN6, HTN3, BPMN3, QN6) presentan mejores propiedades neuroprotectoras que los compuestos con sustituyente *N-Me* (HBN4, HTN1, BPMN1, BPHBN4). Además, en un modelo de pMCAO en ratón, HBN6 reduce muy significativamente el volumen del infarto ($\approx 90\%$), por lo que, en conjunto, la consideramos como la mejor de nitrona de estas series.

Respecto a las nitronas derivadas de nucleobases (NDNs), los resultados muestran que éstas tienen mejores propiedades neuroprotectoras y antioxidantes *in vitro* que PBN,

destacando especialmente las nitronas derivadas de purina (9f, 9g), seguidas de las de pirimidina con sustituyentes H o F (9a, 9c). Sin embargo, la introducción de un sustituyente metilo o de sustituyentes halógenos como Br o Cl empeora su potencial neuroprotector.

Por otro lado, QN6, una 8-hidroxiquinolil-nitrona con un sustituyente *N*-bencilo, es la más equilibrada de todas las QNs estudiadas *in vitro*, revirtiendo significativamente la disminución de la actividad metabólica neuronal, protegiendo frente a necrosis y apoptosis, y demostrando la mayor capacidad antioxidante. Asimismo, el tratamiento con QN6 en un modelo de pMCAO en ratón disminuye notablemente el volumen de la lesión cerebral ($\approx 75\%$).

Por último, ChN2 y QN23 muestran efectos neuroprotectores significativos, comparables a los de HBN6 y NAC, y superiores a los de PBN. Su actividad neuroprotectora parece derivar de su poder anti-necrótico a bajas concentraciones y de sus efectos anti-apoptóticos y antioxidantes a más altas concentraciones. Sin embargo, ni la activación ni la inhibición de la autofagia parecen estar implicadas en su capacidad neuroprotectora, a diferencia de lo que ocurre con HBN6, cuyo papel modulador de la autofagia subyace a sus mecanismos neuroprotectores y podría explicar su elevada eficacia en modelos *in vivo* de isquemia cerebral.

Todos estos resultados han servido para identificar dos nuevas “nitronas hit”, HBN6 y QN6, como candidatos muy prometedores para su empleo en el tratamiento no solo de la CI, sino, por estudios paralelos, de otras enfermedades asociadas a la edad (ARDs). Así, estas dos nitronas, junto con ChN2 y QN23, ya estudiadas previamente, se proponen como compuestos neuroprotectores para ensayos pre-clínicos más completos, en la terapia de estas enfermedades.

Palabras clave: antioxidantes, apoptosis, autofagia, enfermedades asociadas a la edad, estrés oxidativo, ictus, isquemia cerebral, necrosis, neuroprotección, nitronas.

ABSTRACT

Stroke, the second leading cause of death worldwide, results from alterations in brain functions due to the absence or reduction of cerebral blood flow, with no apparent cause other than a vascular origin. The only treatments currently approved for ischemic stroke are mechanical clot removal and the fibrinolytic drug rtPA (recombinant tissue plasminogen activator), that cannot be administered in all cases due to its very narrow therapeutic window. Therefore, research into new therapies for this pathology is of vital importance, including potential molecules capable of recovering or, at least, protecting the cells in the penumbra to prevent the spreading of neuronal death. Within these neuroprotective molecules, our research group has been studying nitrones, organic compounds capable of trapping reactive oxygen species (ROS), which are the main responsible for oxidative stress, and therefore may have widely applicable neuroprotective effects for the treatment of cerebral ischemia (CI).

Thus, in this doctoral thesis, we have investigated the neuroprotective and antioxidant capacity of five new families of synthetic nitrones, three of which derive from α -phenyl-*N*-tert-butyl nitron (PBN): 1) **9 homo-bis-nitrones** with two nitron groups in *para*-, *meta*- and *ortho*- position, bearing *N*-Me, *N*-*t*-Bu or *N*-Bn substituents (**HBNs 1-9**); 2) **3 homo-tris-nitrones** with 3 nitron motifs, bearing *N*-Me, *N*-*t*-Bu or *N*-Bn substituents (**HTNs 1-3**); and 3) **5 biphenyl-nitrones**, with a double benzene ring as the core, 3 of them with one nitron group (**BPMNs 1-3**) and 2 with two nitron groups (**BPHBNs 4** and **5**), each of them identical to one another. Other nitrones that have been studied are: 4) **9 nucleobase-derived nitrones** (NDNs), including 2 of purine type (**9f**, **9g**), and 7 of pyrimidine type, where 5 are *mono*-nitrones with one nitron group and different *N*-alkyl substituents (**9a-9e**), and 2 are *bis*-nitrones with two nitron groups bearing different *N*-alkyl substituents (**9h**, **9i**); 5) **6 quinolyl-nitrones** (QNs), with a quinoline structure as the base; and 6) 2 nitrones (cholesteronitron **ChN2** and quinolyl-nitron **QN23**) whose neuroprotective effects were previously described in different experimental *in vivo* and *in vitro* models of ischemia. Our main hypotheses have been: 1) "The greater the number of nitron groups conjugated to the benzene ring, the greater the neuroprotection" and 2) "Nitrones incorporating heterocyclic nucleobases in their structures or those conjugated

with 8-OH-quinoline rings, should be much more potent as neuroprotective agents than those conjugated with benzene rings”.

The neuroprotection study was conducted in *in vitro* models using cell cultures of the human neuroblastoma line SH-SY5Y, subjected to a model of experimental ischemia with oxygen and glucose deprivation (OGD) and subsequent re-oxygenation and glucose resupply (OGDR or IR), and to a model of oxidative stress with inhibitors of the cellular respiratory chain (O/R). In some cases, *in vivo* models were also employed, using permanent middle cerebral artery occlusion (pMCAO). We conducted assays to measure cell viability or mitochondrial metabolic capacity, assess various types of cell death underlying cerebral ischemia (necrosis, apoptosis and autophagy) and evaluate the antioxidant capacity of the compounds by measuring the release of superoxide anion radical ($O_2^{\bullet-}$), establishing in all cases the EC_{50} 's and maximal effector activities. The results demonstrated that almost all of the tested nitrones exhibit significant neuroprotective and antioxidant capacity, similar or in some cases significantly superior to that of **PBN**, used as a reference nitrone, and similar to that of N-acetyl cysteine (**NAC**), a well-known antioxidant compound. Among the 3 groups of **PBN**-derived nitrones studied, the results show that, in general, the presence of two nitrone groups (**BPHBNs**, **HBNs**) improves the neuroprotective and antioxidant effects of the compounds compared to those containing a single nitrone group. However, the presence of a third nitrone group (**HTNs**) does not induce an improvement in these properties. On the other hand, compounds with nitrone groups in *meta*- (**HBN5** and **HBN6**) and *ortho*- position (**HBN8** and **HBN9**) possess better neuroprotective capabilities than *para*- compounds. Similarly, nitrones with *N-t*-Bu (**HBN5**, **HTN2**, **BPHBN5**) and *N*-Bn (**HBN6**, **HTN3**, **BPMN3**, **QN6**) substituents exhibit better neuroprotective properties than compounds with *N*-Me substituents (**HBN4**, **HTN1**, **BPMN1**, **BPHBN4**). Moreover, in a mouse model of pMCAO, **HBN6** very significantly reduces infarct volume ($\approx 90\%$), making it the best nitrone of this series overall.

Regarding the nucleobase-derived nitrones (**NDNs**), the results show that they have better *in vitro* neuroprotective and antioxidant properties than **PBN**, with purine-derived nitrones standing out (**9f**, **9g**), followed by pyrimidine nitrones with H or F substituents

(9a, 9c). However, the introduction of a methyl substituent or halogen substituents such as Br or Cl diminishes their neuroprotective potential.

On the other hand, QN6, an 8-hydroxyquinolyl-nitrone with an *N*-benzyl substituent, is the most balanced of all the QNs studied *in vitro*, significantly reversing the decrease in neuronal metabolic activity, protecting cells against necrosis and apoptosis, and demonstrating the highest antioxidant capacity. Likewise, treatment with QN6 in a mouse model of pMCAO markedly decreased brain injury volume ($\approx 75\%$).

Finally, ChN2 and QN23 exhibit significant neuroprotective effects, comparable to those of HBN6 and NAC, and superior to those of PBN. Their neuroprotective activity seems to derive from their anti-necrotic properties at low concentrations and their anti-apoptotic and antioxidant effects at higher concentrations. However, neither activation nor inhibition of autophagy appear to be involved in their neuroprotective capacity, unlike HBN6, whose role in modulating autophagy underlies its neuroprotective mechanisms and could explain its high efficacy in *in vivo* models of cerebral ischemia.

All these results led to the identification of two new "hit nitrones", HBN6 and QN6, as very promising candidates for use in the treatment not only of CI, but also, through parallel studies, of other age-related diseases (ARDs). Thus, these two nitrones, together with ChN2 and QN23, already studied previously, are proposed as neuroprotective compounds for more complete pre-clinical trials for the therapy of these diseases.

Keywords: age-related diseases, antioxidant, apoptosis, autophagy, brain ischemia, necrosis, neuroprotection, nitrones, oxidative stress, stroke.

ABREVIATURAS

3-MA: 3-metil adenina.

6-OHDA: 6-hidroxi-dopamina.

Ac-DEVD-AMC: N-acetil-L- α -aspartil-L- α -glutamil-L-valil-N-(4-metil-2-oxo-2H-1-benzopirán-7-il)-L- α -asparagina.

AChE: Acetilcolinesterasa.

AChEI: Inhibidor de AChE.

AD: Enfermedad de Alzheimer.

AFU: Unidades arbitrarias de fluorescencia.

AIF: Factor inducción de la apoptosis.

AKT: Proteína quinasa B.

AMC: Amino-4-metilcumarina.

AMP: Adenosín monofosfato.

AMPA: Receptor del ácido α -amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazolpropiónico.

AMPK: Proteína quinasa activada por AMP.

Apaf-1: Factor-1 activador de la proteasa apoptótica.

APT: Teoría de la pleiotropía antagonista.

ARD: Enfermedades asociadas a la edad.

ARRIVE: Investigación animal = Informando de los experimentos *in vivo*.

ATP: Adenosín trifosfato.

A β : Péptido β -amiloide.

BACE: β -secretasa.

BBB: Barrera hematoencefálica.

Bcl-2: Proteína anti-apoptótica de linfoma de células B2.

BNIP3: Proteína 3 de 19 kDa que interacciona con la proteína Bcl-2/Adenovirus E1B.

BPHBN: Bi-fenil-homo-*bis*-nitrona.

BPMN: Bi-fenil-*mono*-nitrona.

BPN: Bi-fenil-nitrona.

C: Control.

CAMKK: Quinasa de la proteína quinasa dependiente de calmodulina.

ChE: Colinesterasa.

ChN: Colesteronitrona.

CI: Isquemia cerebral.

CNS: Sistema nervioso central.

CO₂: Dióxido de carbono.

COX: Ciclooxygenasa.

CQ: Cloroquina.

CSF: Líquido cefalorraquídeo.

CytC: Citocromo C.

DALY: Años de vida perdidos por discapacidad.

DAMP: Patrón molecular asociado a daño.

DHET: Dihidroetidina.

DISC: Complejo de señalización de inducción de muerte.

DMEM: Dulbecco's modified eagle medium.

DMSO: Dimetil-sulfóxido.

DNA: Ácido desoxirribonucleico.

DNAsa: Desoxirribonucleasa.

DST: Teoría del soma dispensable.

EC₅₀: Concentración/Dosis efectiva media.

ECL: Quimioluminiscencia mejorada de luminol.

ECM: Proteína de matriz extracelular.

EDTA: Ácido etilendiaminotetracético.

EMM: Membrana mitocondrial externa.

ER: Retículo endoplasmático.

ETC: Cadena de transporte de electrones.

FADD: Dominio de muerte asociado a Fas.

FADH₂: Flavín adenín dinucleótido reducido.

Fas: Antígeno-1 de la apoptosis.

FasL: Ligando de Fas.

FBS: Suero fetal bovino.

FDA: Food and Drugs Administration (US).

FOV: Campo de visión.

FRT: Teoría de los radicales libres.

G-CSF: Factor estimulador de colonias de granulocitos.

GPCRs: Receptores acoplados a proteínas G.

GR: Glutación reductasa.

GSH: Glutación reducido.

GSH-Px: Glutación peroxidasa.

GSSG: Glutación disulfuro.

GTP: Guanosín trifosfato.

H₂DCFDA: 2',7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato.

H₂O₂: Peróxido de hidrógeno o agua oxigenada.

HBN: Homo-*bis*-Nitrona.

HCl: Ácido clorhídrico.

HCIO: Ácido hipocloroso.

HEPES: Ácido 4-(2-hidroxietyl)-1-piperazina etano sulfónico.

HIF: Factor inducible por hipoxia.

HRP: Peroxidasa de rábano.

HTN: Homo-*tris*-nitrona.

IC₅₀: Concentración/Dosis inhibitoria media.

IL: Interleuquina.

IR: Isquemia-reperusión.

LC3: Proteína de cadena ligera asociada a microtúbulos 3.

LDH: Lactato deshidrogenasa.

LP: Peroxidación lipídica.

M1/2: Rama principal (1) o secundaria (2) de la arteria cerebral media.

MAA: Actividad antioxidante máxima.

MAO: Monoamina oxidasa.

MAT: Teoría de la acumulación de mutaciones.

MCA: Arteria cerebral media.

MCAO: Oclusión de la arteria cerebral media.

MCI: Deterioro cognitivo leve.

MNA: Actividad neuroprotectora máxima.

mPTP: Poro de transición de permeabilización mitocondrial.

MRC: Cadena respiratoria mitocondrial.

MRI: Imagen de resonancia magnética.

mTOR/mTORC1: Complejo 1 de la diana mamífera de la rapamicina.

MyoCD: Miocardina.

NAC: N-acetil cisteína.

NaCl: Cloruro sódico.

NAD⁺: Nicotinamida adenina dinucleótido.

NADH: Nicotinamida adenina dinucleótido reducido.

NADPH: Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido.

NDN: Nitrona derivada de nucleótidos.

NFT: Ovillo neurofibrilar de proteína Tau hiperfosforilada.

NF-κB: Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas.

NMDA: Receptor del N-metil-D-aspartato.

NO: Óxido nítrico.

NOS: Óxido nítrico sintasa.

NOXA: Proteína 1 inducida por forbol-12-miristato-13-acetato.

LRP-1: Proteína 1 relacionada con el receptor de lipoproteínas de baja densidad.

O/R: Oligomicina 10 μM y rotenona 30 μM.

O₂^{•-}: Anión superóxido.

O₂: Oxígeno molecular.

OGD: Privación de oxígeno y glucosa.

OGD-IR: Privación de O₂ y glucosa y re-suministro de ambos.

OH: Hidroxilo (ion).

ONOO: Peroxinitrito.

OST: Teoría del estrés oxidativo.

PAGE-SDS: Gel de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico.

PARP: Poli-ADP ribosa polimerasa.

PBN: α-fenil-N-tert-butil nitrona.

PBS: Solución salina tamponada con fosfato.

PD: Enfermedad de Parkinson.

PET: Tomografía por emisión de positrones.

PI3K: Fosfatidilinositol 3-quinasa.

PI(3)P: Fosfatidilinositol 3-fosfato.

pMCAO: Oclusión permanente de la arteria cerebral media.

PMSF: Fenilmetilsulfonilo.

PPARγ: Receptor gamma activado por el proliferador de peroxisomas.

PUMA: Modulador de la apoptosis regulada por p53.

PVDF: Fluoruro de polivinidileno.

QN: Quinolil-nitrona.

Rapa: Rapamicina.

RARE: Adquisición rápida con realce de la imagen.

RIPA: tampón del ensayo de radioinmunoprecipitación.

RNA: Ácido ribonucleico.

RNS: Especies reactivas de nitrógeno.

RONs: Especies reactivas de oxígeno y nitrógeno.

ROS: Especies reactivas de oxígeno.

RTK: Receptores tirosina quinasa.

rtPA: Activador tisular del plasminógeno recombinante.

SAR: Relación estructura-actividad.

SASP: Fenotipo secretor asociado a senescencia.

SEM: Error estándar de la media.

SNP: Nitroprusiato sódico.

SOD: Superóxido dismutasa.

SRF: Factor de respuesta a suero.

T2WI: Imagen ponderada por difusión adquirida en T2.

TA: Temperatura ambiente.

TE: Tiempo efectivo.

TEMED: Tetrametiletildiamina.

TLR4: Receptor tipo Toll 4 (Toll-like receptor 4).

tMCAO: Oclusión transitoria de la arteria cerebral media.

TNF: Factor de necrosis tumoral.

TNFR1: Receptor 1 del TNF α .

TR: Tiempo de repetición.

TRAIL: Ligando inductor de la apoptosis relacionado con TNF.

TRAILR: Receptor de TRAIL.

TTC: 2,3,5-trifeniltetrazolium.

ULK1: Quinasa 1 similar a unc-51.

UPR: Respuesta a proteínas desplegadas.

USA: Estados Unidos (de América).

UTP: Uridín trifosfato.

VEGF: Factor de crecimiento endotelial vascular.

WI: Imagen ponderada por difusión.

XO: Xantina oxidasa.

XTT: sal sódica de 2,3-bis (2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-2H-tetrazolio-5-carboxanilida.



Introducción

I. INTRODUCCIÓN

Desde la aparición del *Homo sapiens*, la esperanza de vida de los humanos, es decir, la edad media a la que se produce la muerte de los individuos de una población, ha sido, durante milenios y en todas las regiones del mundo, de alrededor de 30 años (Finch, 2010). Sin embargo, en la Ilustración, durante los siglos XVII y XVIII, la esperanza de vida global experimentó un aumento muy significativo, de los 30 a los 67 años (Riley, 2001). Este incremento tuvo lugar de forma mucho más rápida en los países industrializados, al acompañarse de una clara mejora en los sistemas sanitarios. Durante las últimas décadas del siglo XIX, la desigualdad en la esperanza de vida de la población de los distintos países fue disminuyendo y, durante los siglos XX y XXI, la media de la esperanza de vida global ha superado los 70 años (Liou et al., 2020). Aun así, la diferencia en esperanza de vida entre las distintas áreas geográficas del mundo es todavía bastante amplia, como se puede apreciar en la Figura 1.

Life expectancy, 2019

Our World
in Data

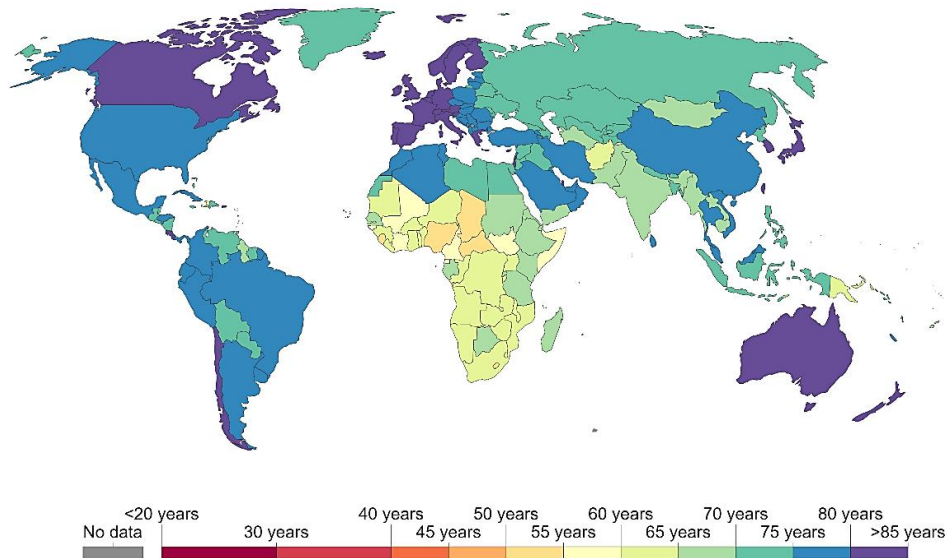


Figura 1. Esperanza de vida mundial en 2019. Se muestra la esperanza de vida al momento del nacimiento, es decir, el número promedio de años que un recién nacido viviría si el patrón de mortalidad en el año mostrado se mantuviera igual durante toda su vida. (Roser et al., 2019).

Como se ha indicado anteriormente, cuanto mejor es la salud de las personas de un país, mayor es su esperanza de vida. En la Figura 1, por ejemplo, se observa que las poblaciones

de los países más ricos, caracterizados por poseer un mejor sistema sanitario, tienen esperanzas de vida superiores a los 80 años. Por el contrario, en los países con sistemas de asistencia sanitaria menos desarrollados, la población tiene una esperanza de vida de entre 50 y 60 años (Roser et al., 2019). Detrás de esta amplia diferencia hay diversos factores, desde las desigualdades en cuanto a avances médicos (Kirkwood, 2017), las condiciones de higiene (Greene, 2001) o el nivel socioeconómico (Mackenbach, 2012).

A lo largo de la historia, las enfermedades infecciosas han constituido uno de los principales problemas de salud, causa de la mayor parte de la mortalidad, sobre todo en los primeros tramos de la vida. Entre ellas, destacan la viruela, el cólera, la tuberculosis, la sífilis o el tifus (Mercer, 2021). Por el contrario, acompañando a los avances terapéuticos y sanitarios, las condiciones de salud con las que las personas llegan a edades avanzadas son en la actualidad significativamente mejores que aquéllas en las que llegaban un par de siglos antes (Kirkwood, 2017). Es decir, hoy en día, las personas mayores gozan de una mejor salud que las de 1800. No obstante, esto no significa que no sufran patologías, sino que se ha producido un cambio en el tipo de las afecciones que padecen.

Este aumento en el número de años que una persona puede vivir está íntima e irremediabilmente vinculado al concepto de envejecimiento, que podría definirse como una disfunción en distintos procesos biológicos relacionada con la edad, y cuyos consiguientes daños, principalmente celulares o moleculares, pero también a nivel del organismo, no pueden ser reparados completamente (Kyriazis, 2019).

1. Teorías del envejecimiento

El envejecimiento ha sido objeto de estudio a lo largo de los años, y aunque aún hoy en día no se sabe completamente su origen, existen algunas teorías que buscan explicar este fenómeno.

Una de las primeras teorías, si no la primera, que pretendía explicar el envejecimiento fue la teoría del desgaste (“Wear and tear”), propuesta por Weismann en 1882, según la cual el cuerpo humano es visto como una máquina, y tanto los órganos como las células se van desgastando con el tiempo, acumulando daños debido a factores como el excesivo

consumo de grasas y azúcares o la exposición a rayos ultravioleta (UV). Esta teoría no tiene en cuenta la habilidad reparadora del cuerpo. Por eso surgió una segunda teoría muy similar, la teoría estocástica, que postulaba que la acumulación de daños también se debía al fallo en los mecanismos de reparación, las infecciones, o incluso al estrés ambiental (Peng et al., 2014).

Sin embargo, las teorías sobre del envejecimiento que más relevancia tienen actualmente, son las que presentamos a continuación, relacionadas con principios de la evolución.

1.1. Teoría de la acumulación de mutaciones (MAT)

Esta teoría, descrita por Medawar en 1952, propone que, conforme la población envejece, una serie de mutaciones genéticas deletéreas se van acumulando en su genoma debido a la deriva genética y a que se transmiten de generación en generación. Después de la etapa reproductiva de los individuos, la fuerza de la selección natural disminuye y, por lo tanto, ya no es suficiente para eliminar esas variantes genéticas perjudiciales asociadas a ciertas enfermedades, o al mero deterioro fisiológico asociado a la edad. Es por ello que los efectos de estas mutaciones se manifiestan en etapas tardías de la vida (Medawar, 1952).

1.2. Teoría de la pleiotropía antagonista (APT)

La teoría de la pleiotropía antagonista, propuesta por Williams en 1957, añade un aspecto adaptativo al principio de la MAT. Según Williams, el envejecimiento ocurre porque hay ciertos genes con mutaciones que se conservan en la población porque tienen efectos positivos en las primeras etapas de la vida (juventud o periodo fértil), pero esos mismos genes resultan nocivos en estadios más avanzados de la vida. Sería como si el gen perdiera su función protectora tras la juventud, y posteriormente detonara un fenotipo pro-envejecimiento (Williams, 1957).

1.3. Teoría del soma dispensable (DST)

Esta teoría, formulada por Kirkwood en 1977, considera al cuerpo (soma) simplemente como una estructura protectora del material genético, de manera que, después de que haya ocurrido la reproducción, el cuerpo se deshecha, mientras que el material genético que contiene, sobrevive. Según Kirkwood, esto ocurriría porque en el organismo debe

haber un compromiso o balance entre el crecimiento, la reproducción y la reparación efectiva del cuerpo, y dado que un organismo tiene una cantidad limitada de recursos que puede asignar a los diversos procesos celulares, la energía corporal se destina a la reproducción como prioridad. Así, el daño celular asociado al tiempo no se repara de forma efectiva, y eso hace que el cuerpo se deteriore produciendo una degeneración crónica y la aparición de enfermedades asociadas a la edad (Kirkwood, 1977).

1.4. Teoría de los radicales libres (FRT) o del estrés oxidativo (OST)

Propuesta por primera vez por Harman en 1956, esta teoría propone que las pérdidas funcionales asociadas a la edad tienen su origen en el daño a las macromoléculas ejercido por un tipo de radicales libres, las especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (RONS).

Los radicales libres son átomos o moléculas altamente reactivas, habitualmente de vida media muy corta, que tienen un electrón desapareado en su capa externa, y que pueden generarse cuando el oxígeno reacciona con determinadas moléculas, aceptando o donando un electrón, es decir, actuando como oxidantes o reductores. Así, los términos ROS (Especies reactivas de oxígeno) y RNS (Especies reactivas de nitrógeno), se refieren mayoritariamente a radicales libres que portan átomos de O y N, respectivamente (Phaniendra et al., 2014).

Los RONS se pueden generar en multitud de procesos biológicos y tienen efectos tanto positivos (la generación de energía a partir de moléculas orgánicas o los procesos de señalización celular) como negativos (están asociados al envejecimiento y las enfermedades de la edad) sobre los organismos aerobios (Venkataraman et al., 2013).

Tabla 1. Principales especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno (RONS). (Carvajal, 2019).

Especies reactivas del oxígeno (ROS)			
Radicales			
Superóxido:	$O_2^{\bullet -}$	Radical alcoxilo:	RO^{\bullet}
Hidroxilo:	$^{\bullet}OH$	Radical peroxilo:	ROO^{\bullet}
No radicales			
Peróxido de hidrógeno:	H_2O_2	Ozono:	O_3
oxígeno singlete:	1O_2	Peróxido orgánico:	$ROOH$
Acido hipocloroso:	$HOCl$	Ácido hipobromoso:	$HOBr$
Especies reactivas del nitrógeno (RNS)			
Radicales			
Óxido nítrico:	NO^{\bullet}	Dióxido de nitrógeno:	NO_2^{\bullet}
No radicales			
Peroxinitrito	$ONOO^-$	Catión nitrosilo:	NO^+
Trióxido de dinitrógeno	N_2O_3	Anión nitroxilo:	NO^-
Tetraóxido de dinitrógeno	N_2O_4	Ácido peroxinitroso:	$ONOOH$
Ácido nitroso	HNO_2	Peroxinitritos alquílicos:	$ROONO$

Los principales RONS que se producen en el cuerpo, en concreto la mayoría de ellos se producen a nivel mitocondrial, están recogidos en la Tabla 1, y son los siguientes:

- **Anión superóxido ($O_2^{\bullet -}$).** Es el ROS primario y más abundante, generado a partir del oxígeno molecular en la respiración celular por electrones donados por el NADPH, mediante la enzima NADPH oxidasa (Fridovich, 1978).
- **Peróxido de hidrógeno o agua oxigenada (H_2O_2).** No es un radical libre, pero sí una especie altamente inestable, generada por la superóxido dismutasa (SOD) a partir del $O_2^{\bullet -}$ y el agua (Fukai & Ushio-Fukai, 2011), o incluso por dismutación espontánea a pH bajo. En los neutrófilos, el H_2O_2 se puede combinar con cloruro (Cl^-) mediante la enzima mieloperoxidasa para generar $HOCl$, otro ROS que daña especialmente las proteínas celulares, y tiene una clara acción citotóxica en el sistema inmune (Winterbourn et al., 2016).

- **Radical hidroxilo (OH \cdot).** Es el ROS primario más potente y agresivo, responsable del daño oxidativo a las bases del DNA, con una corta vida media. Se puede generar rápidamente a partir de H $_2$ O $_2$ y O $_2^{\cdot-}$ mediante la reacción de Haber-Weiss (Haber & Weiss, 1932), o de Fenton con Fe $^{2+}$ (Fenton, 1894). Incluso se puede generar por descomposición de H $_2$ O $_2$ por radiación ionizante, o por descomposición fotolítica de hidroperóxidos de alquilo (Valko et al., 2004).
- **Óxido nítrico (NO).** Es un RNS generado por las tres isoformas de la enzima NO sintasa (NOS). La NOS endotelial (eNOS) está relacionada con el efecto vasodilatador y de regulación vascular de esta molécula; la NOS neuronal (nNOS) está ligada al efecto neurotransmisor y de señalización intracelular de esta molécula; y la NOS inducible (iNOS) se activa en respuesta a varias señales de endotoxinas o citoquinas (Adams et al., 2015). Además, el O $_2^{\cdot-}$ puede reaccionar con NO para formar el peroxinitrito (ONOO \cdot), otro RNS altamente reactivo (Figura 2).

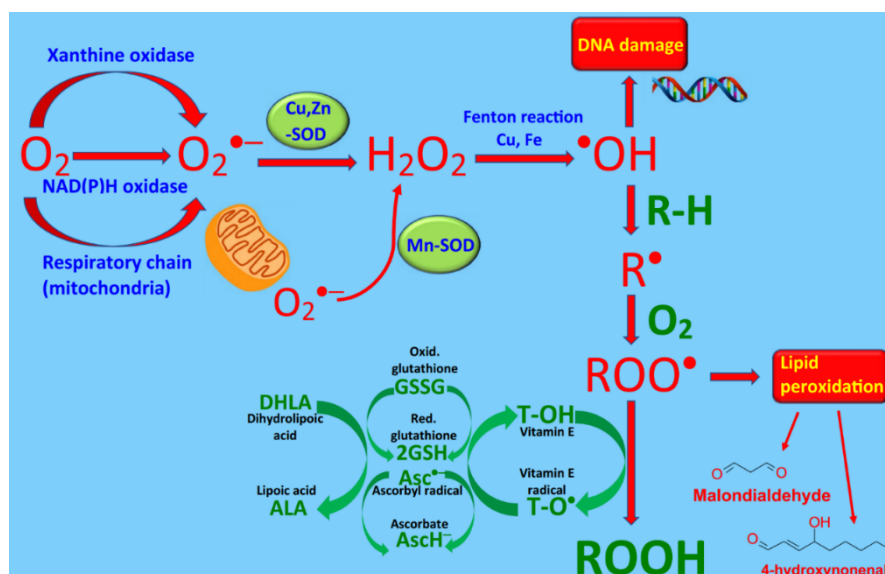


Figura 2. Rutas de formación y eliminación de ROS. (Simunkova et al., 2019).

Sin embargo, al igual que existen las RONS, deben existir mecanismos antioxidantes que defiendan los sistemas biológicos de la toxicidad de los radicales libres, y ello incluye antioxidantes endógenos y exógenos (Figura 2). Como principales antioxidantes endógenos destacan las enzimas SOD, que como ya hemos visto transforma el superóxido en peróxido de hidrógeno; la catalasa, que descompone el H $_2$ O $_2$ en oxígeno y agua, evitando la formación de los nocivos radicales hidroxilo; y la glutatión peroxidasa (GSH-

Px), que convierte peróxidos y radicales OH^- en formas no tóxicas mediante la oxidación del glutatión reducido (GSH) a glutatión disulfuro (GSSG), y luego es reducido de nuevo a GSH por la glutatión reductasa (GR) (Birben et al., 2012). Hay otras moléculas antioxidantes endógenas que no son enzimas, que lo que hacen es interaccionar con RONS y terminar las cadenas de reacción de los radicales libres, tales como la bilirrubina, la vitamina E, el α -tocoferol (protegiendo de la peroxidación lipídica de las membranas), el β -caroteno, que están en sangre, así como la albúmina y el ácido úrico que componen el 85% de la capacidad antioxidante del plasma (Wu et al., 2013). Exógenamente podemos encontrar más cantidad de las vitaminas E y C, o ácido ascórbico (que elimina radicales OH^- y $\text{O}_2^{\cdot-}$), antioxidantes fenólicos (como el resveratrol o los flavonoides), metales como el Se o el Zn, y la acetilcisteína (Pisoschi & Pop, 2015).

El estrés oxidativo es un fenómeno que se produce cuando hay un desequilibrio entre la formación y la eliminación de RONS debido a una sobreproducción y/o a una capacidad deficiente para neutralizarlos o para reparar el daño resultante (Salisbury & Bronas, 2015). En esas condiciones, las RONS se acumulan y pueden dañar las moléculas de ácido desoxirribonucleico (DNA) o a los hidratos de carbono, la peroxidación de lípidos o la oxidación de proteínas (Peng et al., 2014), por lo que los productos de estos procesos también se pueden emplear como marcadores de estrés oxidativo.

Según la teoría del envejecimiento OST (Harman, 1956), es la acumulación de daños ocasionados por estrés oxidativo, tales como el fallo en el mantenimiento de las defensas antioxidantes, la integridad mitocondrial, la proteostasis, la reparación del DNA y los telómeros, la funcionalidad del sistema inmune, la regulación metabólica y la capacidad regeneradora (Chandrasekaran et al., 2017), la que causa el envejecimiento.

En la actualidad no queda totalmente claro, pero parece que niveles altos de RONS pueden llevar a la senescencia celular, condición en la que generalmente se paraliza la proliferación celular en respuesta a daños ocurridos durante la replicación. Así, estas células senescentes adquieren de forma irreversible el “fenotipo secretor asociado a senescencia” (SASP), por el que se liberan multitud de moléculas como factores solubles (interleuquinas (IL)), factores de crecimiento o quimioquinas, metaloproteasas de matriz extracelular (MMPs) y proteínas de la matriz extracelular (ECMs) (Liguori et al., 2018). El

SASP no solo se relaciona con el estrés oxidativo, sino que también está íntimamente asociado a la inflamación, ya que induce una cascada inflamatoria de bajo grado, que mantenida en el tiempo contribuye al daño celular, activando la ruta de NF- κ B, IL-1 α , e IL-6 (Rea et al., 2018).

Es, pues, por la estrecha relación entre estrés oxidativo, inflamación y envejecimiento, que se propuso la teoría del envejecimiento inflamatorio-oxidativo, aunando ambos conceptos y afectando sobre todo a los sistemas regulatorios del cuerpo, es decir, al sistema nervioso, endocrino e inmune, principalmente. La activación del sistema inmune sería la generadora de un estado inflamatorio que a su vez produce un círculo vicioso en el que el estrés oxidativo y la inflamación se retroalimentan, aumentando la morbilidad y mortalidad relacionada con la edad (Fuente & Miquel, 2009).

2. Enfermedades asociadas a la edad

Existen una serie de patologías que, si bien pueden surgir en cualquier etapa de la vida y afectar a personas de distintos rangos de edad, suelen padecer con mucha más frecuencia las personas de edad avanzada que los jóvenes. Este conjunto de patologías (Figura 3) se conoce como “enfermedades asociadas a la edad” (ARD), y comprenden distintas afecciones en las que el estrés oxidativo, la senescencia celular y, por tanto, los factores SASP, están muy involucrados (Chandrasekaran et al., 2017).

Estas enfermedades pueden ser tanto agudas como crónicas, y afectar a distintos órganos y sistemas, destacando entre ellos el sistema cardiovascular, con riesgo de aparición de aterosclerosis, hipertensión y enfermedades cardiovasculares; el sistema ocular, con aparición de cataratas o degeneración macular; las articulaciones y el sistema óseo, con manifestación de artritis u osteoporosis; el riñón o el pulmón; la posibilidad de padecer diabetes mellitus de tipo II, enfermedades biliares o algunos tipos de cáncer, sin olvidarnos del sistema nervioso, donde predominan enfermedades neurodegenerativas tanto agudas, como el ictus, como crónicas, como la enfermedad de Alzheimer (AD).

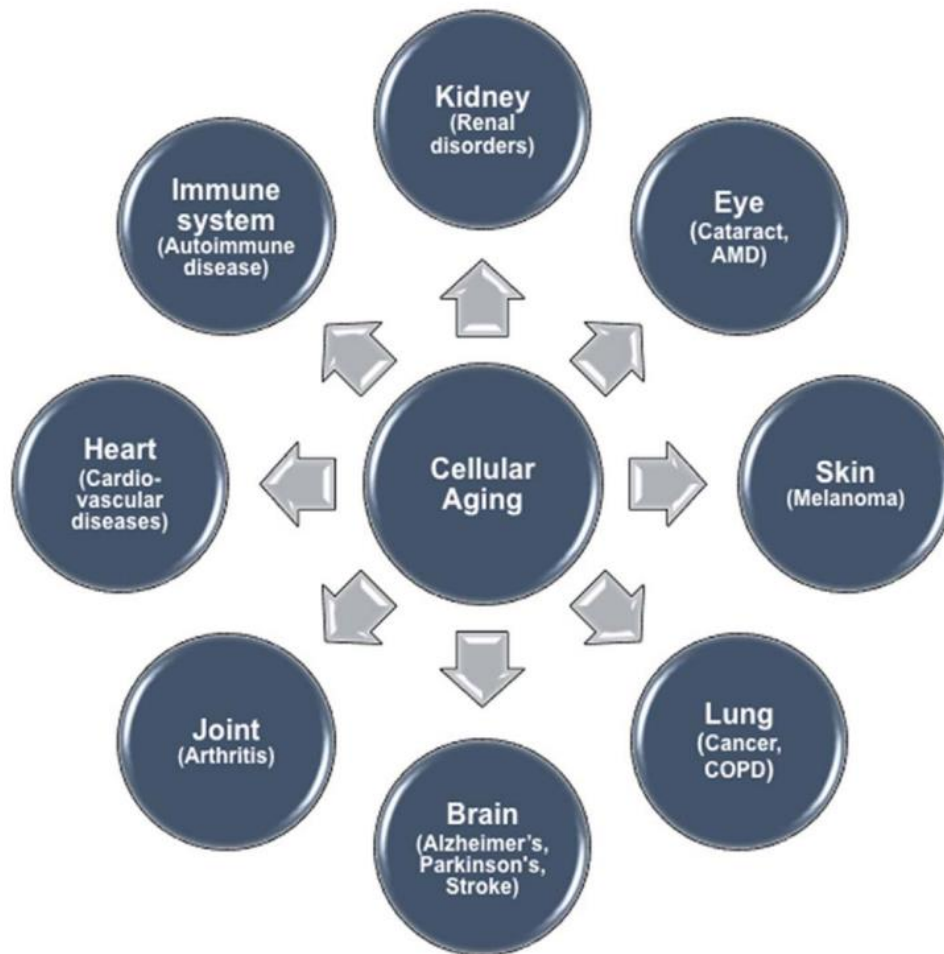


Figura 3. Representación esquemática de enfermedades asociadas a la edad. Éstas incluyen numerosas afecciones agudas y crónicas íntimamente relacionadas con la inflamación y el daño producido por estrés oxidativo. (Chandrasekaran et al., 2017).

Las ARDs se inician por pequeñas alteraciones que se van amplificando mediante bucles de retroalimentación positiva (círculos viciosos), y que finalmente llevan a la desestabilización del estado fisiológico normal del organismo (Belikov, 2018). De hecho, un ejemplo de ello lo tenemos en que la aterosclerosis y la hipertensión, patologías que afectan al sistema cardiovascular, son los factores más importantes responsables del ictus.

2.1. Ictus e isquemia cerebral

El ictus, o accidente cerebrovascular, es una de las principales causas de muerte a nivel mundial, de especial importancia por su alta incidencia, es decir, el número de casos nuevos por región y por un tiempo determinado, especialmente en países de alto nivel

socioeconómico (World Health Organization, 2022). En concreto, en 2019 el ictus seguía siendo la segunda causa de muerte, y la tercera causa de muerte y discapacidad combinada, a nivel mundial (Feigin et al., 2022). Como consecuencia, entre 1990 y 2019 han experimentado un crecimiento sin precedentes su incidencia (70%), el número de muertes (43%), la prevalencia, o lo que es lo mismo, la cantidad total de personas que han sufrido un ictus (102%), y el número de años vividos con discapacidad, o DALYs (143%), debidos a esta enfermedad. Este aumento en los parámetros ha sido especialmente marcado en los países de ingresos bajos o medio-bajos, donde se ha producido un incremento de las muertes por ictus de un 86% y de DALYs en un 89%. Además, el coste total del ictus a nivel mundial, incluyendo no solo el coste sanitario, sino también el socioeconómico, se encuentra alrededor de los 891.000 millones de dólares. De ahí el amplio interés que ha despertado esta patología en el ámbito de la investigación farmacológica.

La definición más actual y completa de lo que es un ictus, o accidente cerebrovascular, involucra un déficit en algunas funciones neurológicas, debido a una lesión aguda solamente de naturaleza vascular en el sistema nervioso central (CNS), incluidas la retina y la médula espinal, con síntomas que duran al menos 24 h o que llevan a la muerte antes de ello, o bien de cualquier duración, pero con una evidencia de infarto local o hemorragia cerebral por técnicas de neuroimagen o por autopsia (Sacco et al., 2013). Esta definición incluye diferentes tipos de procesos, que a su vez se pueden agrupar patológicamente en lo que conocemos como ictus de tipo isquémico e ictus de tipo hemorrágico, este último incluyendo la hemorragia subaracnoidea (Hankey, 2016). El accidente cerebrovascular de tipo hemorrágico consiste en la disminución del flujo sanguíneo a nivel local por extravasación de sangre debido a la ruptura de un vaso sanguíneo, descartando los traumatismos. Este tipo de ictus es con diferencia mucho menos frecuente que el isquémico, suponiendo en torno al 5% de todos los casos (Lovelock et al., 2009). Sin embargo, es importante destacar que tiene una mayor tasa de mortalidad y de morbilidad asociada (p.ej., la hemorragia intracerebral tiene un 40% de índice de fatalidad a los 30 días) (Sacco et al., 2013).

Por su parte, el ictus isquémico se produce cuando se dan procesos de muerte celular, tanto neuronal como glial, a causa de un proceso de isquemia, es decir, de una

disminución en el flujo sanguíneo del CNS, debido a una obstrucción vascular. Dicha obstrucción puede ser de tipo embólico, si la oclusión del vaso sanguíneo se produce por un coágulo en una localización externa al CNS, o de tipo trombótico, cuando el coágulo se produce en un vaso cerebral (Maida et al., 2020). Este subtipo de accidente cerebrovascular supone el 87% de todos los casos de ictus, siendo por tanto el mayoritario con diferencia. Además, existen multitud de factores de riesgo bastante bien establecidos para el ictus isquémico, tales como la hipertensión, hipercolesterolemia e hiperlipidemia (Xie et al., 2016; Collins et al., 2016), así como la fibrilación auricular (Hart et al., 2007). Estos son los principales factores de riesgo que, si se tratan a tiempo, permiten reducir significativamente la incidencia del ictus. Otros factores de riesgo incluyen la diabetes (Peters et al., 2014), el tabaco (Mons et al., 2015), el alcohol (Zhang et al., 2014), la contaminación ambiental, las dietas poco saludables y la obesidad (O'Donnell et al., 2016).

Los síntomas del ictus isquémico agudo incluyen debilidad muscular, déficits sensitivos, parálisis facial (habitualmente de una parte de la cara), ataxia o alteración en la coordinación de los movimientos, disfagia o dificultad para tragar, problemas en el habla del tipo afasia, y anormalidades visuales (Broussalis et al., 2012).

2.1.1. FISIOPATOLOGÍA DE LA ISQUEMIA CEREBRAL

El tejido nervioso consume grandes cantidades de oxígeno y glucosa, y depende de manera casi exclusiva de la fosforilación oxidativa para la producción de energía (Baltan, 2006; Kunz et al., 2010). Es por ello que, durante la isquemia cerebral (CI), la disminución del flujo sanguíneo hace imposible mantener el metabolismo celular, llevando a la muerte neuronal y glial por diversos mecanismos. Existen dos zonas diferenciadas en cuanto a la afectación isquémica: el núcleo o *core*, y la penumbra.

- Núcleo o *core*:

La zona infartada que rodea inmediatamente el coágulo se denomina núcleo de déficit de perfusión o *core*, y se caracteriza porque el flujo sanguíneo cerebral en esta zona está por debajo del 20% respecto al flujo normal (Hossmann, 1994), el cual es de aproximadamente 50-60 mL/100 g de tejido cerebral/min (Jones et al., 1981). En concreto, algunos autores han localizado este núcleo al observar mediante tomografía por emisión de positrones (PET)

una región cerebral con disminución del flujo sanguíneo por debajo de 12 mL/100 g/min (Heiss, 2015). Esta zona está caracterizada por un daño isquémico inmediato e irreversible, que se traduce en una muerte celular debida a un intenso proceso de necrosis, acompañado de lipólisis, proteólisis, desensamblaje de microtúbulos (que ocurre tras el colapso bioenergético total) y la consiguiente descomposición de la homeostasis iónica (Orellana-Urzúa et al., 2020). La alteración de las corrientes iónicas, entre ellas una excesiva salida de ion potasio y una excesiva entrada de ion sodio, cloruro y agua, genera una despolarización de la membrana permanente, seguida de la liberación excesiva de neurotransmisores aminoácidos excitatorios, sobre todo el glutamato (Glu). Cuando ésta persiste durante más de 5-10 min, se produce el daño celular irreversible propio de esta isquemia (Astrup et al., 1981).

- Penumbra:

La zona de penumbra se encuentra entre el núcleo dañado irreversiblemente y el tejido nervioso normal, envolviendo al primero, con un flujo sanguíneo cerebral entre 12 y 22 mL/100 g/min, observado mediante PET (Heiss, 2015). En esta área, el flujo sanguíneo está bastante limitado, pero garantizado gracias a la existencia de circulación colateral, lo que permite conservar parcialmente el metabolismo energético celular (Hossmann, 1994; Astrup et al., 1981). En ausencia de tratamiento y transcurrido un tiempo, la penumbra puede sufrir una evolución hacia zona infartada (es decir, que se vaya transformando en *core*) debido a la excitotoxicidad continua, de la que hablaremos más en profundidad posteriormente, o a una serie de procesos nocivos secundarios, como la propagación de la despolarización, la inflamación post-isquémica y mecanismos de muerte celular programada como la apoptosis (Deb et al., 2010). Además, otro evento molecular que causa la expansión del volumen de infarto cerebral son las despolarizaciones peri-infarto: despolarizaciones de las neuronas y la glía isquémicas debidas a la depleción energética y a la liberación de K^+ y Glu, que cuando tienen lugar en la zona de la penumbra, dichas células excitables son capaces de volver a repolarizarse y volver a sufrir una nueva despolarización intermitente (Taş et al., 2019). La conversión gradual de zona de penumbra en zona isquémica, a nivel molecular, recibe el nombre de cascada isquémica, de la que hablaremos más detenidamente a continuación.

2.1.2. CASCADA ISQUÉMICA

La cascada isquémica comprende un conjunto de eventos moleculares que ocurren en cadena, y que van a extender la lesión isquémica más allá del *core* por la zona de penumbra en caso de que no se reciba tratamiento farmacológico a tiempo (Xing et al., 2012). La Figura 4 resume las etapas más importantes de la cascada isquémica que llevan a distintos tipos de muerte celular.

Como ya hemos comentado, durante la isquemia cerebral se genera una situación de anoxia o falta de oxígeno, aparte de escasez de glucosa, que produce una depleción energética, ya que se consume ATP a pesar de que haya una síntesis insuficiente del mismo, haciendo que los niveles totales de ATP disminuyan drásticamente y se produzca acidosis láctica (ya que hay un cambio en el metabolismo de la glucosa, que pasa de aerobio a anaerobio). Todo lo enunciado anteriormente impide el correcto mantenimiento de los gradientes de iones en las células del CNS, produciéndose alteraciones en el funcionamiento de numerosos canales y bombas iónicas (Kunz et al., 2010). Con ello se produce una pérdida del potencial de membrana, induciendo la despolarización de las células excitables, es decir, no solo las neuronas, sino también las células de la glía. Así, los canales de calcio (Ca^{2+}) dependientes de voltaje presinápticos se activan y conducen a la liberación de neurotransmisores excitatorios (especialmente de Glu, el principal neurotransmisor excitador) al espacio extracelular en cantidades tóxicas, fenómeno que produce eventos de excitotoxicidad (Deb et al., 2010).

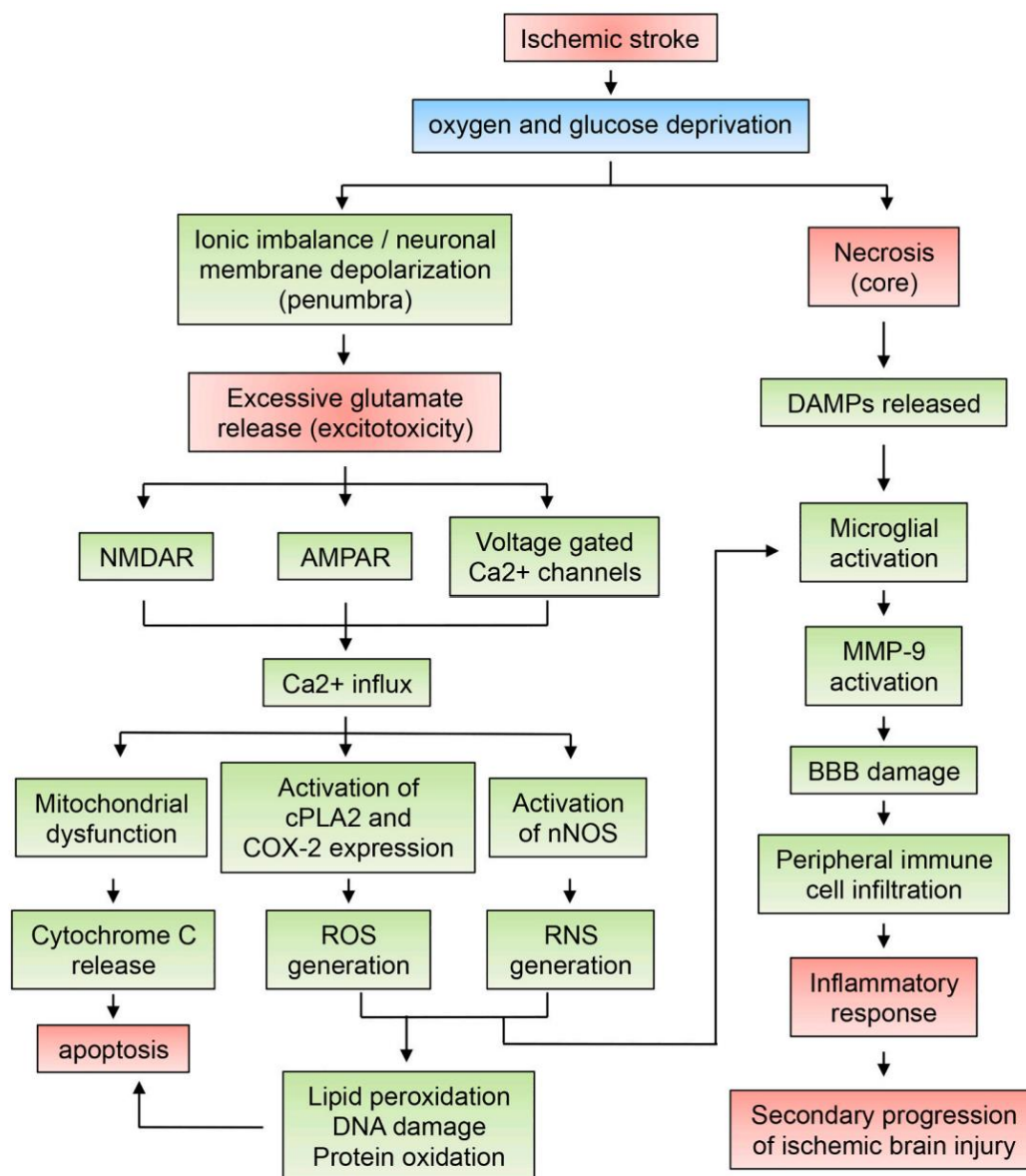


Figura 4. Representación esquemática de la cascada de señalización celular que conduce a necrosis, neurotoxicidad e inflamación, y contribuye a la progresión del daño cerebral (Paul & Candelario-Jalil, 2021).

Al mismo tiempo, los procesos que requieren energía, como la síntesis de macromoléculas, o la recaptación de neurotransmisores excitatorios, están impedidos, lo que incrementa aun más la acumulación extracelular de Glu. Esto provoca una sobreactivación de receptores de Glu, principalmente los receptores AMPA y NMDA, contribuyendo al incremento dentro de la neurona de ion Ca^{2+} (Kunz et al., 2013). Este aumento de Ca^{2+} , segundo mensajero intracelular universal, inicia una serie de eventos citoplasmáticos y nucleares que generan un profundo daño celular. Entre ellos se encuentra la activación de

numerosas enzimas, como distintas proteasas, la fosfolipasa A citosólica y las ciclooxigenasas, que generan ROS que saturan los mecanismos antioxidantes endógenos, induciendo fenómenos de peroxidación lipídica y daño en la membrana plasmática. El estrés oxidativo y nitrosativo es aún más intenso cuando se reestablece el aporte de oxígeno debido a la reperfusión, ya que también se incrementan los daños directos e indirectos sobre las proteínas (como las alteraciones en las cadenas laterales o la reducción de los puentes disulfuro) y sobre el DNA (como los cortes de cadena simple) (Sun et al., 2018). De hecho, uno de los ROS más reactivos que conducen al daño molecular es el peroxinitrito, generado por la reacción entre el anión superóxido y el NO sintetizado por la NO sintasa neuronal dependiente de Ca^{2+} (Pacher et al., 2007). En cambio, el aumento en la producción de NO por células endoteliales puede proteger al tejido aumentando la microcirculación (Zhu et al., 2023).

Las mitocondrias, una de las mayores fuentes de ROS, son dañadas por la alteración de la membrana interna mitocondrial y la oxidación de proteínas que median el transporte de electrones, la salida de protones y la producción de ATP (Dugan & Choi, 1994). La membrana mitocondrial se vuelve más permeable, en parte porque se genera un poro de transición, lo que genera el hinchamiento de la mitocondria, que la producción de ATP se detenga y un incremento muy marcado en la producción de ROS (Kroemer & Reed, 2000). El citocromo C que se libera de la mitocondria también tiene un papel fundamental en el daño isquémico (Rastogi et al., 2015), ya que desencadena la apoptosis gracias a que induce la proteólisis de la procaspasa y la consiguiente activación de la caspasa-3, directamente implicada en el mecanismo apoptótico, tan importante en la expansión del daño isquémico sobre la penumbra.

Las ROS también sirven para inducir inflamación, un daño secundario muy importante, especialmente durante la reperfusión de oxígeno y glucosa: la inflamación. El estrés oxidativo y la consiguiente muerte celular conducen a la liberación de patrones moleculares asociados a daño (DAMPs) provenientes de células críticamente dañadas o restos celulares (Mishra & Hedna, 2013), que accionan una respuesta inflamatoria que implica la activación de microglía residente en el CNS, un aumento en la permeabilidad de la barrera hematoencefálica (BBB) y una infiltración de células del sistema inmune periféricas en el parénquima cerebral, como linfocitos T o neutrófilos (Tuttolomondo et

al., 2015). A partir de estos acontecimientos, la microglía se activa debido al ATP extracelular procedente de la despolarización de células excitables y de células que están atravesando un proceso de muerte celular. Su activación induce la secreción de agentes proinflamatorios como citoquinas o quimioquinas, que generan mayor cantidad de RONS. Por otro lado, estas células son capaces de presentar antígenos (Ransohoff & Cardona, 2010). Es tan importante este componente inflamatorio que la severidad del ictus, referida en cuanto a comorbilidades posteriores, depende del nivel de la respuesta inflamatoria (Paul & Candelario-Jalil, 2021).

2.1.3. TIPOS DE MUERTE CELULAR EN LA ISQUEMIA CEREBRAL

La muerte neuronal debida a la isquemia puede ser debida a necrosis y apoptosis, pero también puede jugar un importante papel la autofagia. A continuación, se explicarán las características más importantes de cada uno de estos procesos.

2.1.3.1. Apoptosis

La apoptosis es la forma de muerte celular programada más común en los organismos multicelulares. Está caracterizada especialmente por la activación de caspasas, destacando la caspasa-3. Este tipo de muerte celular ocurre de forma natural en muchos procesos del desarrollo del organismo, tanto en determinadas condiciones fisiológicas como patológicas (Gottlieb, 2011).

Las células que experimentan apoptosis muestran un aspecto típico, ya que ésta conlleva una serie de cambios morfológicos en la célula bastante significativos, como el encogimiento del citoplasma celular, y la condensación de la cromatina y migración hacia la membrana nuclear, la cual se fragmenta y forma los “cuerpos apoptóticos”, lo que ocurre sin activación de la respuesta inmune. Otros procesos bioquímicos que ocurren son cambios en la permeabilidad de la membrana mitocondrial, con la formación de los llamados poros de transición de permeabilidad (mPTPs) que dejan pasar moléculas de menos de 15 kDa, y la translocación y activación dependiente de caspasa de una DNAsa que elimina el DNA intranucleosomal (Krysko et al., 2008).

Se diferencia principalmente de la necrosis porque la membrana celular no se debilita hasta las últimas etapas de muerte, evitando la liberación de productos intracelulares

potencialmente dañinos para el resto de las células (Cascales, 2003), aunque es cierto que en muchas ocasiones y en los estadios más tardíos de la apoptosis, se produce entre otros la exposición de fosfatidilserina en la capa externa de la membrana celular, señal para que dicha célula en proceso de muerte sea fagocitada por parte de la microglía y leucocitos (Park & Kim, 2017). Estos procesos de muerte celular programada ocurren principalmente en la zona de penumbra isquémica, ya que es en esta área donde las células mantienen cierta energía para poder llevar a cabo la apoptosis, y la integridad de su membrana. Muchas veces, la apoptosis sigue ocurriendo incluso aunque se reestablezca el flujo sanguíneo cerebral, o si los mecanismos neuroprotectores no resultan suficientes (Radak et al., 2017).

La señalización que lleva hacia la apoptosis puede ser positiva (señales que inhiben la apoptosis), o negativa (señales que favorecen la apoptosis). Así, la apoptosis se desencadena por la eliminación de las señales positivas, implicadas en supervivencia celular, y por aumento de señales negativas. Las señales pro-apoptóticas pueden ser externas o internas. Ejemplos de señales externas son agentes físicos, químicos o patógenos, mientras que las señales internas pueden ser el daño oxidativo o en el material genético, o bien la generación de moléculas que directamente promueven la apoptosis (Gottlieb, 2011).

Existen dos vías apoptóticas: la vía intrínseca, o vía mitocondrial, y la vía extrínseca o de los receptores de muerte. Ambos tipos de apoptosis tienen confluencia en las etapas más tardías del proceso, como pueden ser la activación de las caspasas 3 y 7, y la consecuente proteólisis de múltiples sustratos intracelulares (Estaquier et al., 2011).

- Vía intrínseca o mitocondrial

La sobrecarga de Ca^{2+} desencadena la activación de la calpaína (Curcio et al., 2016). Uno de los sustratos esenciales de la calpaína es la proteína anti-apoptótica de linfoma de células B 2 (Bcl-2), a la cual activa. Ésta se une a Bax en la membrana mitocondrial formando un dímero y promoviendo la formación de poros (mPTP) en la membrana mitocondrial externa (EMM) (Kist & Vucic, 2021). Esto provoca la liberación de varios factores pro-apoptóticos, como el citocromo C (CytC) y el factor inductor de apoptosis

(AIF). En el citosol, CytC forma un apoptosoma con el factor activador de proteínas apoptóticas y la procaspasa-9, activando así las caspasas efectoras como la caspasa-3 (Ferrer & Planas, 2003). Por otro lado, AIF se transloca al núcleo y es el responsable de la fragmentación del DNA, que lleva a la muerte celular independiente de caspasas (Figura 5).

La vía nuclear de muerte celular ocurre a través de la fosforilación de p53 o la translocación de la nucleofosmina (Culmsee & Krieglstein, 2007). En las neuronas, la nucleofosmina puede activar a Bax e inducir la apoptosis a través de la vía mitocondrial. Por otra parte, p53 se regula al alza rápidamente en el tejido cerebral isquémico y, a su vez, regula la transcripción de genes pro-apoptóticos como Bax, el modulador de la apoptosis regulado por p53 (PUMA), y la proteína 1, inducida por forbol-12-miristato-13-acetato (NOXA), mediando así la muerte celular neuronal (Balaganapathy et al., 2018; Uzdensky, 2019).

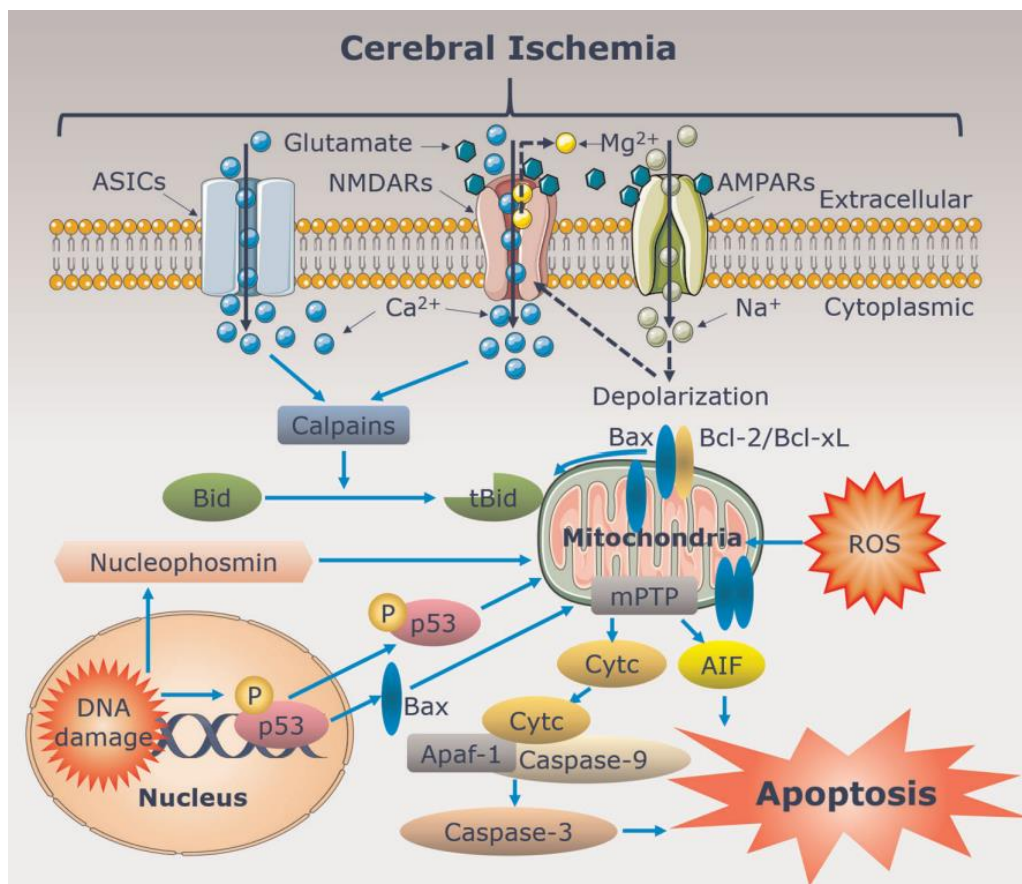


Figura 5. Cascada de señalización de la vía intrínseca de la apoptosis. El aumento del Ca^{2+} intracelular post-isquémico (mediado por los receptores de Glu NMDA y AMPA) y la acumulación de ROS provocan la activación de las calpaínas y median la escisión de Bid en tBid, que integra las diferentes vías de

muerte en el punto de control mitocondrial de la apoptosis. En la membrana mitocondrial, tBid interactúa con Bax, que suele ser neutralizado por las proteínas anti-apoptóticas de la familia Bcl-2 (Bcl-2 o Bcl-xL). Los dímeros de tBid y Bax forman poros en la EMM (mPTP), liberando así CytC y AIF, que ejecutan la muerte celular dependiente o independiente de caspasas, respectivamente. Tras liberarse al citosol, CytC forma complejos con Apaf-1 y la procaspasa-9 para formar el apoptosoma, que activa a su vez las caspasas ejecutoras, como la caspasa-3. Por el contrario, AIF se transloca rápidamente al núcleo, donde media la fragmentación a gran escala del DNA y la muerte celular independiente de caspasas. Además, las vías nucleares de la muerte neuronal se activan en respuesta al daño del DNA a través de la fosforilación (P) y la activación de p53 o la translocación mitocondrial de nucleofosmina. (Tuo et al., 2021).

Además de ese mecanismo, p53 también puede inducir la apoptosis actuando directamente sobre las mitocondrias. La p53 citoplasmática se transfiere rápidamente a la superficie de la EMM en situaciones de estrés y se combina con proteínas de la familia Bcl-2 para promover la permeabilización de la EMM mediada por Bax/Bak, que como ya hemos dicho termina activando la cascada de caspasas (Datta et al., 2020). Por otro lado, cuando se restablece el flujo sanguíneo tras una isquemia cerebral, se produce una gran cantidad de ROS que generan lesión neuronal por isquemia/reperfusión (IR), y este daño por ROS puede producirse en asociación con la apoptosis. Por ejemplo, las ROS pueden dañar la membrana plasmática, provocando la pérdida de la integridad de la membrana (Wang et al., 2017); deteriorar el DNA, lo que puede provocar roturas de hebra (Li et al., 2011); o afectar a la liberación de CytC de las mitocondrias al citosol neuronal (Zhou et al, 2022).

- Vía extrínseca

Durante la isquemia cerebral, el escape de moléculas de la barrera hematoencefálica y las moléculas de señalización (p. ej., citoquinas) liberadas por los astrocitos, la microglía y los oligodendrocitos pueden causar inflamación (Jiang et al, 2018), que se activa inmediatamente después de la obstrucción del vaso sanguíneo (De Meyer et al., 2016). Primeramente, se activa la microglía y se inicia la respuesta inflamatoria, causando una afluencia masiva de macrófagos, neutrófilos y linfocitos en el parénquima cerebral (Chamorro et al., 2016). En las primeras fases del ictus isquémico, la acumulación de neutrófilos se produce en el núcleo isquémico, mientras que la activación y proliferación

microglial se produce en la penumbra (Ma et al, 2017; Wimmer et al, 2018). Este proceso libera factores que desencadenan la muerte neuronal a través de la vía apoptótica extrínseca, incluidas citoquinas proinflamatorias como la interleuquina 1 β (IL-1 β) (Ma et al., 2017), quimioquinas (Grosse et al, 2016; He et al., 2018), factores de necrosis tumoral (TNF) como el TNF- α/β , o el ligando Fas (FasL), entre otros (Wu et al., 2015).

La vía extrínseca de la apoptosis se desencadena mediante la activación de los llamados "receptores de muerte" de la membrana plasmática, entre los que se encuentran el receptor 1 del TNF α (TNFR1) y el antígeno-1 de la apoptosis (Fas) (Qin et al., 2022), cuando son activados por sus respectivos ligandos, TNF α y FAS-L, respectivamente, mediante el mecanismo descrito en la Figura 6.

Esta vía de apoptosis se puede producir de forma independiente o sinérgica con la vía mitocondrial. Durante un ictus isquémico, uno de los receptores mencionados anteriormente se une a un dominio de muerte asociado a Fas (FADD) para crear un complejo de señalización inductor de muerte con procaspasa-8, que permite la activación de la caspasa (Muhammad et al., 2018). La caspasa-8 activa las caspasas efectoras posteriores (como la caspasa-3) por escisión proteolítica directa (Qin et al., 2022), o escisión indirecta que conecta con la vía dependiente de las mitocondrias (Plesnila et al., 2001; Wu et al., 2016). De hecho, se piensa que la activación de la caspasa-8 podría ser uno de los activadores más tempranos y eficaces de la apoptosis mitocondrial (Yin et al., 2002).

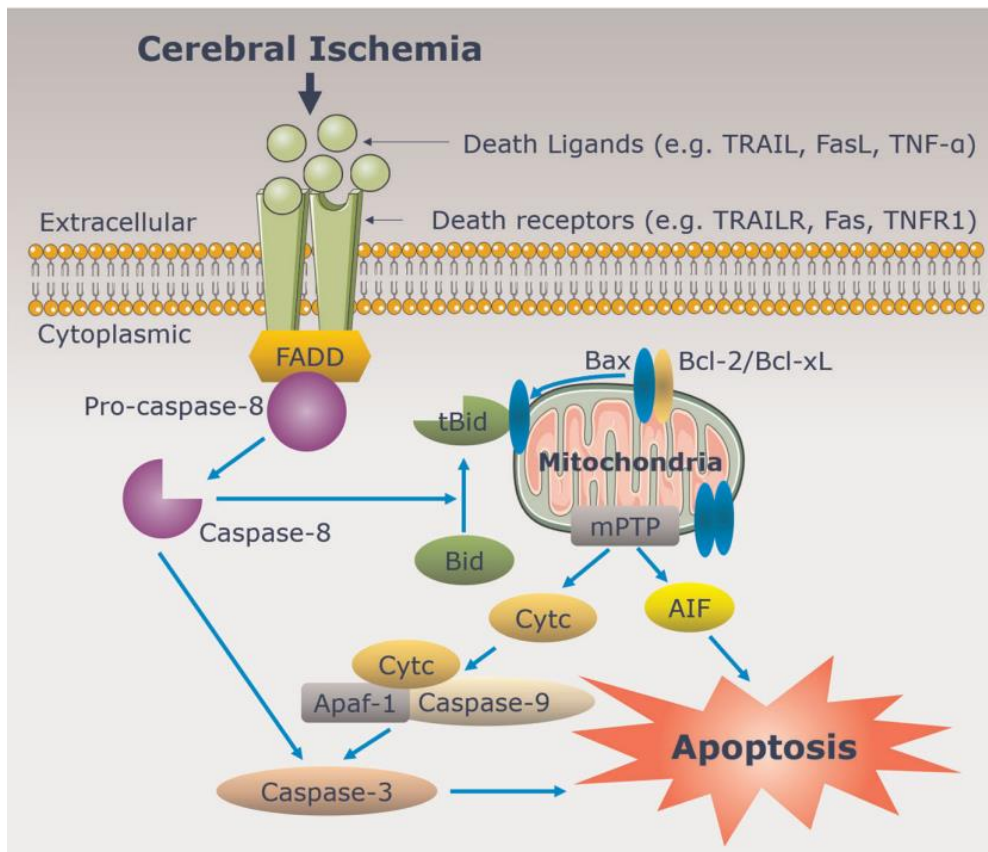


Figura 6. Esquema de la cascada de señalización de la vía extrínseca de la apoptosis. Los ligandos de muerte extracelulares (p.ej., TRAIL, FasL, TNF- α) se unen a receptores de muerte (p.ej., TRAILR, Fas, TNFR1), lo que desencadena el reclutamiento del FADD. El FADD se une a la procaspasa-8 para crear un complejo de señalización de inducción de muerte (DISC), que activa la caspasa-8. La caspasa-8 activada media la escisión de Bid a tBid o activa directamente la caspasa-3. En la membrana mitocondrial, tBid interactúa con Bax, que suele ser neutralizado por las proteínas anti-apoptóticas de la familia Bcl-2, Bcl-2 o Bcl-xL. Los dímeros de tBid y Bax forman mPTP en la MME, liberando así CytC o AIF, que ejecutan la muerte celular dependiente o independiente de caspasas, respectivamente. (Tuo et al., 2021).

2.1.3.2. Necrosis

La necrosis es un mecanismo pasivo, es decir, se trata de un tipo de muerte celular que no necesita de energía para llevarse a cabo. Es por eso por lo que ocurre principalmente en la zona del *core* o núcleo isquémico, en la que hay una ausencia total de flujo sanguíneo. En concreto, suele afectar sobre todo a las neuronas del *core*, que mueren mediante este mecanismo (Edinger & Thommpson, 2004; Deb et al., 2010), mientras que los astrocitos de la región mueren mediante una necrosis retardada (Gürer et al., 2009). Además, en el área de la penumbra, los astrocitos resisten las condiciones isquémicas mejor que las neuronas y muestran menos señales apoptóticas que necróticas.

Este mecanismo de muerte celular se diferencia de la apoptosis principalmente por la ausencia de activación de caspasas, de liberación de CytC y de formación de DNA oligonucleosomal (Kist et al., 2021).

Además, las células que sufren necrosis no presentan las características morfológicas observadas en la apoptosis, pero puede llegar a suponer un problema el hecho de que, si no ocurre la fagocitosis de las células apoptóticas, éstas pueden convertirse en células necróticas secundarias, que tienen muchas características morfológicas indistinguibles respecto de la necrosis primaria (Krysko et al., 2008).

La falta de ATP como consecuencia de la isquemia cerebral hace que la bomba de Na^+/K^+ , responsable del mantenimiento del potencial de membrana, provoque su malfuncionamiento y el consiguiente aumento de permeabilidad de la membrana plasmática. Esto lleva a su vez a una acumulación dentro de la célula de Na^+ y de agua, provocando el hinchamiento de la misma o edema, también llamado oncosis. La formación continua de edema acaba formando vesículas dentro de la célula, también llamadas *blebs*, que van a fusionarse entre sí y englobar a los orgánulos celulares, provocando su propio hinchamiento asociado. El aumento de Ca^{2+} , así como el exceso de ROS y RNS, provocan hinchazón de la mitocondria especialmente, lo que contribuye a este tipo de muerte celular (Edinger & Thommpson, 2004). Finalmente, las vesículas estallan, al igual que lo acaba haciendo la membrana plasmática celular, y el contenido de la célula se esparce por el espacio extracelular circundante, lo que puede llevar a una inflamación local debido a la liberación de factores intracelulares de las células muertas (los llamados patrones moleculares asociados a daño o DAMPs), que alertan y activan al sistema inmune (Kroemer et al., 2009).

Parece que este tipo de muerte celular no se activa a la vez que la autofagia o que la apoptosis, de modo que son independientes, ya que se ha visto que la inhibición de proteínas específicas implicadas en apoptosis o autofagia conduce a necrosis (Cui et al., 2021).

Este tipo de muerte celular se ha descrito tradicionalmente como consecuencia de condiciones extremas estresantes, como puedan ser calor, shock osmótico, estrés mecánico, procesos de congelación-descongelación, y una alta concentración de agua

oxigenada, lo que se asocia a la pérdida indeseada de células en muchas patologías (Green & Llambi, 2015). En estas situaciones, la muerte celular se produce por la acción directa del estrés sobre la célula. Por eso, la necrosis habitualmente se ha definido como un proceso “descontrolado” o no programado. Sin embargo, otros muchos estímulos son capaces de inducir un proceso necrótico, como el TNF, la depleción de ATP, o la isquemia. En esos casos, se produce una comunicación entre procesos bioquímicos y moleculares a diferentes niveles, y entonces la necrosis resultante está controlada y programada, como ocurre con la apoptosis. Esta forma regulada de necrosis se denomina “necroptosis” (Golstein & Kroemer, 2007; Festjens et al., 2006).

2.1.3.3. Autofagia

La autofagia es un proceso por el cual los componentes celulares, como macromoléculas citosólicas o incluso orgánulos enteros, son embebidos por membranas para formar los denominados autofagosomas, en los que los materiales incluidos se transportan al lisosoma para su digestión y reciclaje (Kaur & Debnath, 2015). Todas las células eucariotas utilizan la autofagia para proporcionar sustratos de los procesos anabólicos, entre otros para crear nuevas estructuras celulares, o incluso para obtener energía de dichos sustratos (Shintani & Klionsky, 2004; Mizushima et al., 2008; D'Arcy, 2019). Estas características hacen que, en condiciones fisiológicas, la autofagia esté vinculada a la prevención de la muerte celular, manteniendo unos niveles basales. Sin embargo, sus niveles pueden regularse al alza en distintas condiciones patológicas y, si superan un determinado umbral, pueden causar la muerte de la célula (He & Klionsky, 2009). Sin embargo, el fallo en los mecanismos de la autofagia también es perjudicial, ya que está asociado al desarrollo de enfermedades, como el cáncer o enfermedades neurodegenerativas, como la AD (Nixon & Yang, 2011).

Por lo general, podemos distinguir tres tipos de autofagia: macroautofagia, microautofagia y autofagia inducida por chaperonas (Glick et al., 2010).

- Macroautofagia es la forma más ampliamente descrita, en la que regiones celulares enteras se encierran en vesículas de doble membrana denominadas autofagosomas. Éstos se fusionan con lisosomas para generar autofagolisosomas,

donde sus contenidos se degradan por las proteasas presentes en los antiguos lisosomas.

- Microautofagia es una forma más específica que la macroautofagia, y puede inducirse por señales moleculares presentes en la superficie de orgánulos dañados como la mitocondria o los peroxisomas, generando la fusión de los lisosomas específicamente con estos orgánulos (Li et al., 2012; D'Arcy, 2019).
- Autofagia inducida por chaperonas, también llamada “autofagia selectiva”, es aquella en la que las proteínas del citoplasma son marcadas para su fusión lisosomal por chaperonas citosólicas, mediante la interacción de la chaperona con un pentapéptido presente en la secuencia aminoacídica del sustrato. Las proteínas sustrato se unen al receptor lisosomal LAMP-2A y se introducen en el lisosoma para su degradación (Dice, 2007).

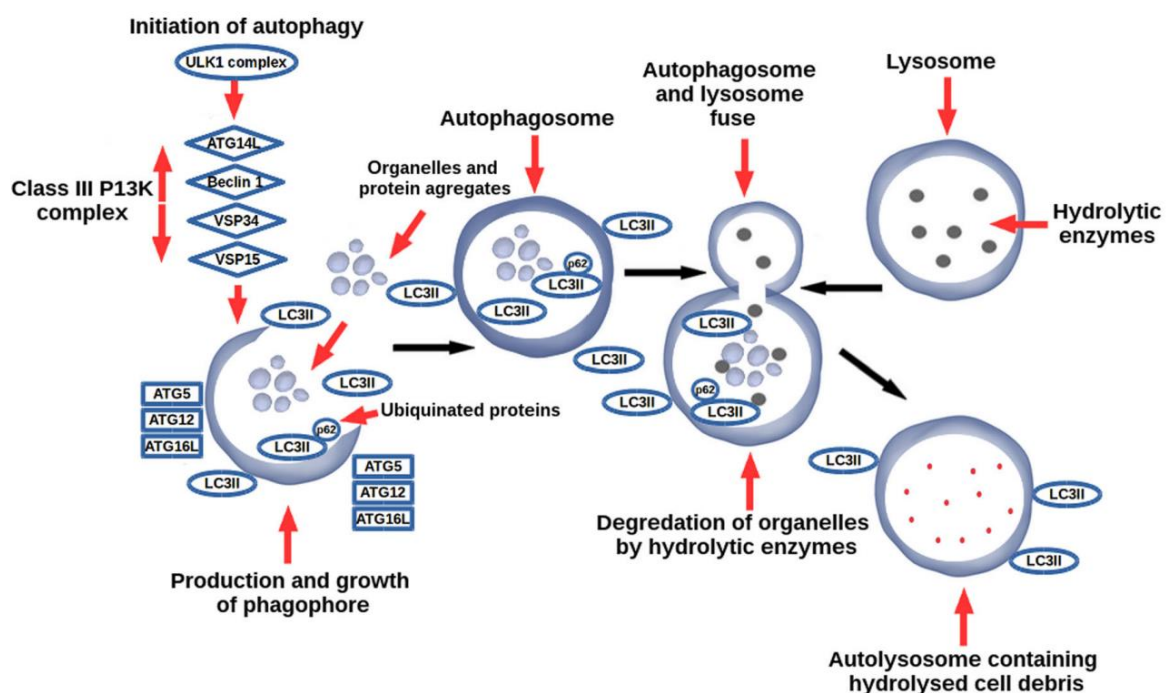


Figura 7. Esquema representativo de los pasos iniciales de la autofagia. La autofagia comienza con la formación del fagóforo, iniciado por los complejos ULK1 y ATG5-ATG12-ATG16L. Éste se cierra alrededor de proteínas ubiquitinadas unidas a p62 y a LC3-II. Entonces, el fagóforo se cierra para generar el autofagosoma, que se fusiona con un lisosoma, induciendo la degradación de sus componentes (D'Arcy, 2019).

Los pasos específicos de la autofagia se representan en la Figura 7. El inicio de la autofagia está mediado por el complejo ULK1 y, para generar un fagóforo, una membrana de

aislamiento que marca el comienzo de la formación del autofagosoma, se necesita la unión de otro complejo, una fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K) de clase III, cuya subunidad catalítica, VPS34, es modulada por Beclina-1, que a través de la generación de fosfatidilinositol 3-fosfato (PI(3)P) permite el reclutamiento de una serie de proteínas de autofagia implicadas en la nucleación del autofagosoma (McKnight & Yue, 2013). En concreto, Beclina-1 parece funcionar como adaptador para el reclutamiento de múltiples proteínas que modulan a VPS34. Por otro lado, otro complejo proteico, junto con la proteína ligada a la cadena ligera 3 de los microtúbulos 1A/1B (LC3) en su forma lipidada (LC3-II), estimula la elongación del fagóforo, lo que después dará lugar al autofagosoma. A su vez, la proteína p62 se une a las proteínas ubiquitinadas y las marca para su degradación, de forma que cuando se está formando el autofagosoma, p62 se une a LC3-II, cerrando la membrana y generando el autofagosoma final, que se fusiona con el lisosoma y su contenido es degradado (Ndoye & Weeraratna, 2016).

Este mecanismo celular puede ser inducido por varios factores de estrés como la falta de nutrientes (o restricción calórica), o por señales presentes durante la diferenciación y embriogénesis y en la superficie de orgánulos dañados (Mizushima et al., 2008). Entre algunos de esos factores de estrés que inducen la autofagia destacan ciertas condiciones patológicas, entre ellas, la hipoxia y la isquemia, los eventos más importantes del ictus isquémico. De hecho, se ha visto que los autofagosomas se acumulan en el cerebro poco después de la isquemia-anoxia (Adhami et al., 2006; Koike et al., 2008), y también hay evidencias de que la autofagia podría estar muy incrementada en situaciones isquémicas, ya que esto se ha observado en un modelo de rata de hipoxia-isquemia cerebral neonatal (Ginet et al., 2014), además de que se observó que en una línea celular neuronal sometida a privación de suero se producía autofagia antes que la apoptosis en ese modelo celular de IR (Uchiyama, 2001). Todo ello evidencia que la autofagia tiene un papel en la isquemia cerebral.

Durante la isquemia cerebral, se inducen muchos mecanismos distintos para la activación de la autofagia pro-muerte celular, tales como:

- El déficit de insulina y nutrientes impide la activación del inhibidor primario de la autofagia, que es el complejo 1 de la diana mamífera de la rapamicina (mTOR) o

también llamado mTORC1 (Menon et al., 2014; Hwang et al., 2017). En condiciones normales, mTORC1 promueve el crecimiento y la proliferación celular, induciendo el anabolismo celular con la consiguiente síntesis de macromoléculas e inhibiendo los procesos catabólicos, como la autofagia (Shimobayashi & Hall, 2014). Sin embargo, en condiciones isquémicas, la disminución de O₂, glucosa y factores de crecimiento reducen la actividad de mTORC1, lo que disminuye la actividad de la vía PI3K/AKT, y eso permite que aumenten los niveles de autofagia celulares (Dutta et al., 2015; Chen et al., 2011).

- El déficit energético hace que la ratio entre la adenosina monofosfato (AMP) y el ATP se vea incrementada, estimulando la proteína quinasa activada por AMP (AMPK), que actúa como sensor bioenergético (Hardie, 2011) y cuando está activa, fosforila a mTORC1 y lo inhibe, potenciando así la autofagia (Liang et al., 2007).
- Durante la isquemia cerebral puede producirse disfunción mitocondrial, acumulación de ROS y el consiguiente daño del ADN, lo que induce la autofagia, mediada por el HIF-1 α (Yamashima & Oikawa, 2009). Una de las principales dianas de HIF-1 α es el gen de la proteína 3 de 19 kDa que interactúa con la proteína Bcl-2/adenovirus E1B (BNIP3), un miembro de la familia de Bcl-2, que es capaz de inhibir de forma indirecta la activación de mTORC1 (Li et al., 2007) y de actuar como sustrato competitivo de Beclina-1 en la unión de ésta y Bcl-2, por lo que induce la liberación de Beclina-1 y activa así la autofagia (He & Klionsky, 2009; Glick et al., 2010).
- La hipoxia y la isquemia cerebral provocan el déficit de nutrientes y la alteración en la homeostasis del Ca²⁺, que inducen el estrés del retículo endoplásmico (ER), que no solo es capaz de activar la autofagia por el aumento en niveles de proteínas mal plegadas (Yin et al., 2017; Feng et al., 2017), sino que también promueve la liberación de Ca²⁺ desde el ER al citoplasma (Høyer-Hansen & Jäättelä, 2007), lo que a su vez activa la vía de la quinasa de la proteína quinasa dependiente de calmodulina (CAMKK)/mTORC1, activando a AMPK que a su vez inhibe a mTORC1, como ya hemos visto anteriormente (McCullough et al., 2013).

Un resumen de las principales vías de señalización que inducen autofagia en la isquemia cerebral, se presenta en la Figura 8.

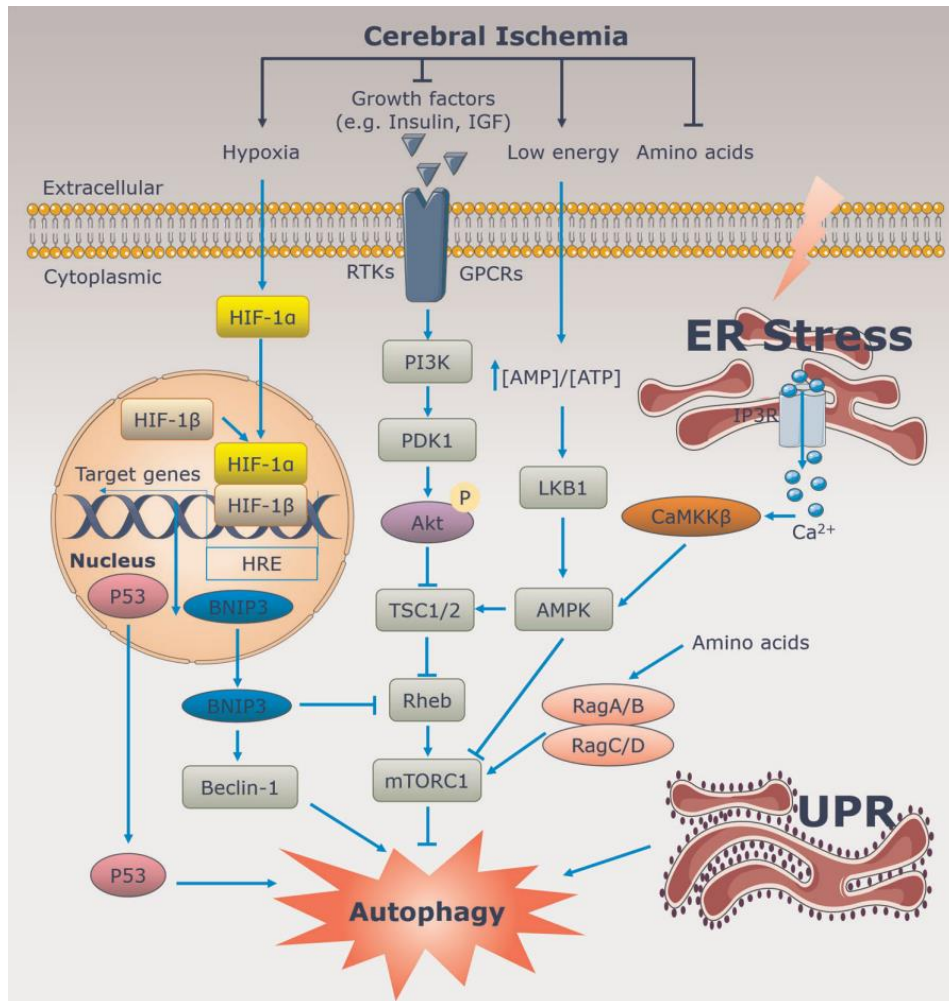


Figura 8. Esquema de las posibles vías de señalización de la autofagia en la isquemia cerebral. Los factores de crecimiento pueden activar PI3K uniéndose a dos tipos de receptores, RTKs o GPCRs. PI3K activa a Akt mediante fosforilación, y Akt fosforila e inhibe TSC1/2, que se disocian del lisosoma, promoviendo la activación de Rheb. Rheb-GTP es un potente activador de mTORC1, quien a su vez inhibe la autofagia. Además, los aminoácidos pueden activar RagGTPasas y reclutar mTORC1 a la superficie del lisosoma, donde se encuentra con Rheb y es activado. Sin embargo, bajo condiciones de escasez de nutrientes durante la isquemia, la actividad de mTORC1 se reduce y aumenta la autofagia. Por otro lado, la hipoxia causada por isquemia cerebral activa HIF-1α, que induce la autofagia mediante BNIP3 y p53. Durante la isquemia, el aumento en la ratio AMP/ATP activa la quinasa LKB1, que a su vez fosforila y activa a AMPK, que inhibe a mTORC1 y así induce la autofagia. Este proceso está regulado por la acumulación y liberación de Ca²⁺ por el ER y por la vía de señalización de proteínas mal plegadas (UPR). El aumento de Ca²⁺ activa CAMKK, que a su vez fosforila y activa a la AMPK (Tuo et al., 2021).

2.2. Enfermedades neurodegenerativas: la enfermedad de Alzheimer

Otro tipo de enfermedades asociadas a la edad distintas al ictus son las enfermedades neurodegenerativas (NDs). Estas patologías tienen un alto impacto en la sociedad de edad

avanzada, ya que constituyen una de las principales causas de discapacidad y morbilidad a nivel mundial, y se caracterizan por la pérdida en el número y en la función de las neuronas, ocasionando atrofia cerebral (Teleanu et al., 2022).

A pesar de tratarse de un conjunto heterogéneo de enfermedades complejas, que se desarrollan en distintas áreas del CNS y por tanto tienen etiología e incluso patologías diferentes (Agnello & Ciaccio, 2022), poseen algunos mecanismos fisiopatológicos en común, como la alteración de las dinámicas proteicas, el daño del DNA, la disfunción de factores de crecimiento como neurotrofinas, los procesos neuroinflamatorios, la disfunción mitocondrial y el estrés oxidativo por superproducción de ROS (Kwon & Koh, 2020). Este estrés oxidativo es de especial importancia dentro del estudio de las NDs, ya que suele aparecer en todas ellas y es uno de los principales factores que agravan la progresión de la enfermedad, debido al daño oxidativo que generan los ROS y a su interacción con la mitocondria. Así, en este tipo de enfermedades también podemos encontrar oxidación de macromoléculas como lípidos, proteínas, RNA y DNA, mecanismos que incrementan la citotoxicidad en las NDs (Teleanu et al., 2022).

Algunas de las NDs más importantes, frecuentes y conocidas son la esclerosis lateral amiotrófica, la enfermedad de Parkinson y la enfermedad de Alzheimer (AD). La prevalencia de esta última aumenta de forma prácticamente exponencial cada cinco años, especialmente a partir de los 65 (Hou et al., 2019) y es por esta razón, y, especialmente por la importancia que ha adquirido recientemente el componente vascular en su neuropatología, que en este trabajo nos referimos siempre a dicha enfermedad como prototipo de enfermedad neurodegenerativa y de la edad.

La AD es la enfermedad neurodegenerativa más frecuente, diagnosticándose más de 1000 casos al año en mayores de 65 años por cada 100.000 habitantes (Hirtz et al., 2007). Es un tipo de demencia o, como se prefiere llamar actualmente, trastorno neurocognitivo mayor, caracterizado por la pérdida progresiva de niveles cognitivos, que afectan a las funciones ejecutivas como la memoria, la atención o el lenguaje, y que acaba interfiriendo con las actividades diarias de los pacientes (Prince et al., 2013). La neurodegeneración en la AD es un proceso que pasa por distintas etapas, algunas de ellas incluso a nivel pre-clínico, y que, tras 5-12 años del inicio de los síntomas, lleva a la muerte (Vermunt et al., 2019). Sin

embargo, las manifestaciones clínicas de la AD son muy conocidas y comprenden la amnesia, la agnosia, la apraxia y la afasia, entre otros síntomas (McKhann et al., 2011). La fisiopatología de la AD comprende numerosas alteraciones tisulares, celulares y moleculares, pero la principal es la acumulación de proteínas aberrantes, que generan daño oxidativo y neuroinflamación por activación de la microglía, fallo energético y disfunción y muerte neuronal. Los principales acúmulos proteicos de esta enfermedad, que a su vez son sus principales biomarcadores, son las placas seniles de péptido β -amiloide ($A\beta$), extracelulares, y los ovillos neurofibrilares de proteína Tau hiperfosforilada (NFTs), intraneuronales (Roy et al., 2023).

La importancia de estos biomarcadores radica en la estrecha relación que mantienen con el estrés oxidativo y la neuroinflamación. De hecho, parece que el estrés oxidativo interviene tanto en la progresión de la AD, como en el inicio de la misma, lo que indica que es uno de los eventos primarios en la neuropatología de la AD (Butterfield, 2018). Así, $A\beta$ es un potente generador de ROS, ya que induce la alteración de las mitocondrias, y un activador temprano del daño oxidativo a nivel neuronal, microglial y cerebrovascular (Abubakar et al., 2022), alterando rutas de señalización redox como uno de los eventos bioquímicos más tempranos de la AD. De esa forma, $A\beta$ mantiene una estrecha relación con la estructura y los lípidos que componen la membrana plasmática de las neuronas, ya que tanto la composición lipídica de la membrana es capaz de inducir la formación de oligómeros $A\beta$ (Roy et al., 2023), como el propio péptido $A\beta$ altera la fluidez de la membrana, aumentando su permeabilidad al Ca^{2+} , alteraciones que junto a la activación de receptores NMDA de Glu extrasinápticos, los desequilibrios iónicos y la alteración en el transporte de glucosa, provocan una sobrecarga de Ca^{2+} citosólico y mitocondrial, lo que lleva a un desequilibrio energético y a la activación de rutas de muerte celular (Zuroff et al., 2017). Además, los niveles elevados de iones metálicos como Fe, Cu y Zn contribuyen al daño por ROS y a la neurodegeneración, ya que pueden formar oligómeros de $A\beta$ y precipitar la formación de fibras (Roy et al., 2023) y catalizar la reacción de formación de $OH\cdot$ en el citosol y favorecer la peroxidación lipídica (Peters et al., 2015). Por su parte, la agregación de Tau, así como los cambios en su conformación o en su nivel de fosforilación, pueden estar inducidos por niveles elevados de iones metálicos (Yamamoto

et al., 2004), y el estrés oxidativo producido puede a su vez provocar la dimerización de Tau, lo que conduce a la generación de NFTs (Roy et al., 2023).

La terapia actual de la AD comprende tres inhibidores de acetilcolinesterasa (AChEIs) distintos (donepezilo, rivastigmina y galantamina), debido a que la disminución de acetilcolina es una de las alteraciones de neurotransmisores más conocidas de esta enfermedad; y un antagonista de los receptores NMDA de Glu, la memantina. Estos tratamientos solo mejoran las funciones cognitivas durante un tiempo, ralentizando el progreso de la enfermedad, por lo que sigue siendo de vital importancia la búsqueda de nuevos fármacos para el tratamiento de esta enfermedad (Passeri et al., 2022).

2.3. Relación entre la isquemia y la demencia: la demencia vascular

Existe una estrecha relación, cada vez mejor documentada, entre la isquemia cerebral y la demencia. Este síndrome, denominado genéricamente como “demencia vascular”, incluye un conjunto de trastornos cerebrales de origen cardio o cerebrovascular que disminuyen considerablemente las funciones cognitivas de los pacientes. De hecho, esta patología es la forma de demencia más frecuente después de la AD, ya que supone en torno al 15% de todos los casos diagnosticados de demencias (Qiu et al., 2007) (Figura 9).

Actualmente, se prefiere utilizar la terminología de “deterioro cognitivo vascular”, entre otros motivos porque, a diferencia de la mayor parte de demencias que tienen como eje central la pérdida de memoria, este tipo de trastornos vasculares con mucha frecuencia puede no afectar a la memoria y, sin embargo, alterar otras funciones cognitivas, como las funciones ejecutivas o la atención (Román et al., 2004). Por otro lado, hasta el 64% de las personas que han padecido un ictus tienen algún tipo de alteración cognitiva (Jin et al., 2006) y hasta un tercio de ellas desarrollan demencia posteriormente, lo que puede aumentar la mortalidad a largo plazo tras el ictus (Barba et al., 2000). Por último, factores de riesgo cerebrovascular tan ampliamente estudiados como la obesidad, la diabetes, el tabaco, la hipertensión o la hipercolesterolemia también forman parte de los factores de riesgo de deterioro cognitivo leve (MCI) y de la demencia vascular (Rost et al., 2022; Kivipelto et al., 2005).

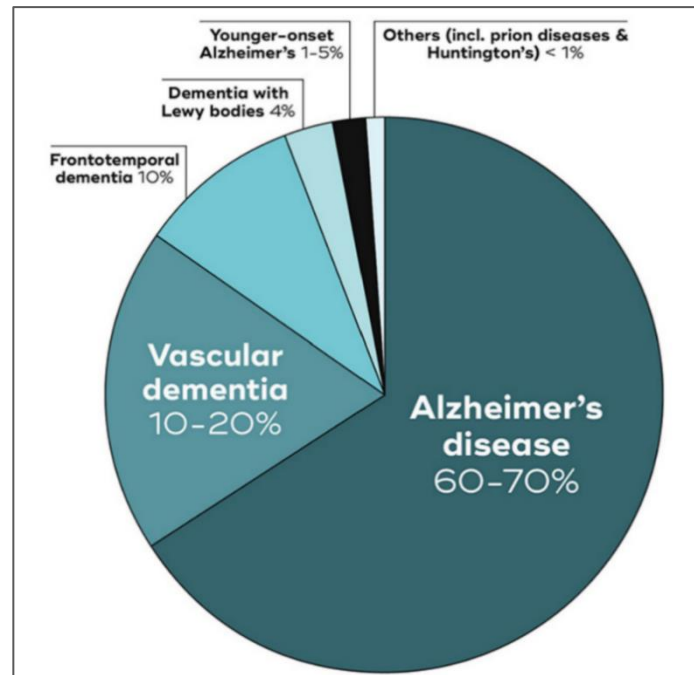


Figura 9. Tipos de demencia y porcentaje de casos en función de cada uno de ellos. Fuente: Universidad de Queensland (Queensland Brain Institute, 2019).

Como ya hemos mencionado, la forma más frecuente y conocida de demencia es la AD. Sin embargo, hay ciertos estudios que demuestran que la CI es uno de los procesos adyuvantes de la AD, ya que por ejemplo el daño vascular y la inflamación del parénquima que tienen lugar en la AD perpetúan el ciclo de agregación proteica de A β , tan característico de esa enfermedad, y se ha visto que los procesos oxidativos dañinos que se producen en el ictus contribuyen muy ampliamente a la pérdida cognitiva en estos pacientes (Querfurth & LaFerla, 2010). Aunque se conocen formas “puras” de demencia vascular, como la angiopatía amiloide cerebral (Greenberg et al., 2019), actualmente se piensa que las formas mixtas de la AD y demencia vascular son más comunes que las formas puras de la AD, ya que hay estudios que apuntan a la coexistencia de ambas patologías en al menos un 40% de los casos de AD (Rundek et al., 2022).

La aterosclerosis en las grandes arterias, la vasoconstricción inducida por A β de las arteriolas más pequeñas y las anomalías de los capilares endoteliales, pueden perjudicar la perfusión y causar hipoxia, la cual, a través de la regulación negativa de LRP-1 y la vasoconstricción en respuesta a la regulación positiva de SRF y MyoCD pueden reducir el aclaramiento de A β , y a su vez la inducción de la enzima de escisión BACE puede

aumentar la producción del mismo (Quaegebeur et al., 2011). De esta forma, la hipoxia podría proporcionar un vínculo entre los defectos vasculares y la acumulación de A β , para crear un círculo vicioso auto-reforzante entre la agregación de A β , la hipoperfusión y la hipoxia (Figura 10).

De toda esta estrecha relación existente entre demencias y alteraciones vasculares surge la idea y la necesidad de evaluar compuestos con carácter multivalente y neuroprotector tanto frente a la CI como frente a modelos de demencias como la AD.

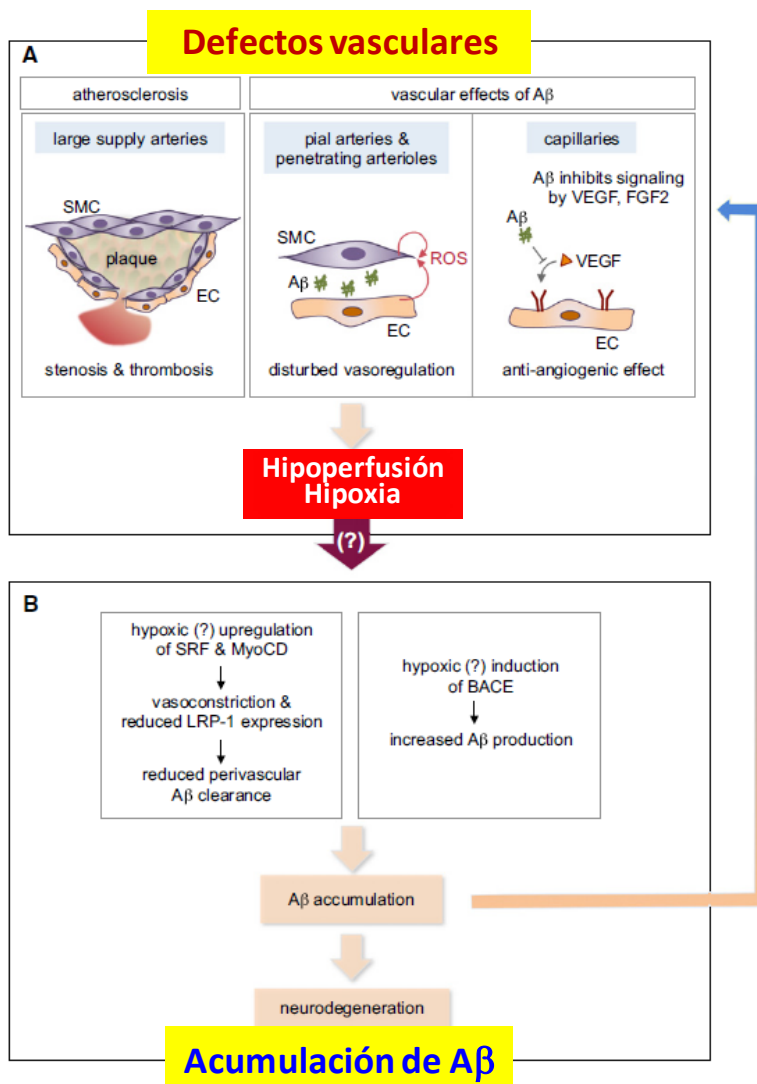


Figura 10. Modelo hipotético del papel de la disfunción de los vasos sanguíneos en la AD. Papel de VEGF (Factor de crecimiento endotelial vascular), SRF (Factor de respuesta al suero), MyoCD (Miocardina) y LRP-1 (proteína relacionada con el receptor de lipoproteínas de baja densidad) en la Angiopatía Amiloide Cerebral y la AD (Modificada de Quaegebeur et al., 2011).

3. Tratamientos actuales para el ictus isquémico

Los tratamientos del ictus isquémico que se pueden emplear en la actualidad son muy reducidos, y tienen como mayor inconveniente una serie de requerimientos para que sean efectivos.

3.1. Activador tisular del plasminógeno recombinante

La administración intravenosa del **activador tisular del plasminógeno recombinante (rtPA)** es el principal tratamiento aprobado para el ictus isquémico, porque mejora sustancialmente la clínica tras la isquemia cerebral por su acción trombolítica (Stemer & Lyden, 2010), reduciendo los efectos y la discapacidad permanente provocados por el ictus (Eastin et al., 2023).

Se trata de una de las primeras opciones de tratamiento del ictus isquémico que se implantaron, ya que los primeros tratamientos trombolíticos que deshacían los coágulos se comenzaron a emplear a principios del siglo pasado (Lees et al., 2010), pero no fue hasta 1996 que la Food and Drug Administration (FDA), USA, aprobó el empleo de este fármaco durante las tres primeras horas desde el comienzo de los síntomas del ictus (Eastin et al., 2023). Posteriormente, la ventana terapéutica de este fármaco fue aumentando, primero hasta 4,5 h tras el inicio de la sintomatología (Saver, 2006; Ahmed et al., 2010), y posteriormente ampliando ese tiempo de administración hasta 6 h (Wang et al., 2015). Es importante que la administración del fármaco no exceda de este tiempo, ya que el riesgo de mortalidad aumenta con ello, por las acciones secundarias hemorrágicas y neurotóxicas del rtPA (Wardlaw et al., 2014).

Este fármaco puede administrarse también de manera intra-arterial mediante un microcatéter, lo que aumenta la concentración del agente fibrinolítico y reduce el riesgo de trombólisis sistémica, sobre todo en el caso de oclusiones de vasos grandes (Molina & Saber, 2005).

3.2. Retirada mecánica del coágulo

Existen también instrumentos para la retirada mecánica del trombo cerebral y de esa manera eliminarlo de la circulación, así como ciertas técnicas que succionan el material

obstrutivo, que mejoran la recuperación de los pacientes y aumentan la velocidad de recanalización. Algunos de estos mecanismos se pueden emplear en la clínica, sobre todo cuando la trombólisis farmacológica intravascular no ha resultado efectiva, como el Microsnare (Fourie & Duncan, 2003), el Attractor-18 (Schumacher et al., 2003), el Neuronet (Versnick et al., 2005), el retirador Merci, probablemente uno de los más empleados y con mayores mejoras clínicas de los pacientes tras las intervenciones, y mayores tasas de recanalización (Starkmann et al., 2004; Shi et al., 2010), o el TREVO (Nogueira et al., 2012).

Una de las principales ventajas de estos métodos de retirada mecánica del coágulo es que se pueden emplear fuera de la ventana terapéutica del rtPA, o en aquellos casos en los que los pacientes no puedan ser sometidos a ese tratamiento farmacológico (Smith et al., 2008; Flint et al., 2007). Pero también es importante tener en cuenta que el diámetro del vaso obstruido influye en cuanto al nivel de recanalización y recuperación del paciente, ya que si la obstrucción tiene lugar en la rama principal de la arteria cerebral media o MCA (M1), el nivel de revascularización es significativamente menor que si la obstrucción se da en una rama secundaria de la MCA (M2), aunque el ratio de complicaciones de tipo hemorrágico y mortalidad no varía significativamente entre ambos grupos (Shi et al., 2010). Es decir, estos mecanismos de retirada mecánica de las obstrucciones vasculares tienen menor eficacia y, por lo tanto, su empleo es menos recomendado en las obstrucciones de arterias cerebrales grandes (The Penumbra Pivotal Stroke Trial investigators, 2009).

El riesgo de complicación más importante y mortal que existe es la aparición de hemorragias intracraneales, lo que podría ocurrir con mayor probabilidad si se administra el rtPA fuera de la ventana terapéutica (Iancu et al., 2023), pero la combinación del tratamiento farmacológico con el mecánico no parece aumentar ese riesgo. No obstante actualmente, uno de los objetivos a conseguir para el tratamiento del ictus isquémico, es el de aumentar la estrecha ventana terapéutica del rtPA en el ictus agudo.

3.3. Tratamientos neuroprotectores y neurorreparadores

Entre los objetivos a mejorar en los tratamientos actuales del ictus se incluyen el de extender la supervivencia de las células de la penumbra isquémica para que las terapias de reperfusión puedan aplicarse más tardíamente, para reducir el daño producido tras

haber logrado una reperfusión efectiva, o para poder emplear tratamientos que combinen efecto neuroprotector y de mejora de las condiciones clínicas (Broussalis et al., 2012).

Entre otras estrategias está la de **promover la autorreparación cerebral**, estimulando la formación de nuevas neuronas a partir de los nichos de precursores neurales. Para ello se puede emplear una medicina tradicional china, NeuroAid, que ha demostrado inducir la neurogénesis, además de proteger frente al daño isquémico global a varios niveles (Quintard et al., 2011). También se estudia actualmente la implantación de diferentes tipos de **células madre** para recuperar las neuronas perdidas tras el evento isquémico, siendo las células madre neurales, mesenquimales, embrionarias y las células madre pluripotentes inducidas, las preferidas, entre otras (Datta et al., 2020).

Además, es posible explorar **distintas modalidades de reperfusión**, o emplear fármacos que disminuyan el edema vasogénico que se genera alrededor de la zona infartada (Jha et al., 2021). En el primero de los casos, por ejemplo, se estudia la aplicación de la desmoteplasa, enzima con una mayor selectividad que el rtPA por la fibrina, que no parece mostrar neurotoxicidad y permite aumentar la ventana terapéutica hasta las 9 h después del inicio de los síntomas (Hacke et al., 2005). Este prometedor fármaco superó con éxito los ensayos clínicos de fase III, pero los ensayos de fase IV fueron paralizados por el momento (Piechowski-Jozwiak et al., 2022). En el mismo sentido se estudia la batroxobina, un veneno de serpiente capaz de deshacer los polímeros de fibrinógeno sin afectar a las plaquetas (You et al., 2004). Varios estudios clínicos avalan la eficacia fibrinolítica de este veneno, así como la mejora de la función motora (Gusev et al., 2006), la prevención de accidentes cerebrovasculares secundarios (Xu et al., 2007) y los efectos neuroprotectores, ya que reduce el estrés oxidativo y la respuesta inflamatoria post-isquémica (Lan et al., 2021). Además de estas terapias trombolíticas, es posible la **combinación** de las mismas con otros **agentes que prevengan la agregación plaquetaria**, como los inhibidores de receptores de glicoproteínas IIb/IIIa (Sacco et al., 2007), p. ej. la eptifibatida, que entró en ensayos de fase II (Pancioli et al., 2013), o como el anticuerpo monoclonal Abciximab (Cortese et al., 2009).

Otro de los aspectos que se estudian para el tratamiento del ictus isquémico es la **reducción del daño cerebral una vez conseguida la disolución o retirada del coágulo**.

Para ello, otra de las estrategias estudiadas ha sido la de acompañar la reperfusión sanguínea con una **hipotermia moderada**, de 32-34°C, seguida de una vuelta a la temperatura normal de forma lenta y muy progresiva (Daniele et al., 2021). La hipotermia moderada parece más efectiva cuando ocurre inmediatamente a la reperfusión, pero también hay estudios que apuntan a sus efectos protectores cuando se aplica varias horas después de la reperfusión y se mantiene más allá de un día (Kurisu & Yenari, 2018), y sus efectos beneficiosos se deben, principalmente, a la reducción del metabolismo y a la ruptura de fosfatos de alta energía como el ATP, pero también a la disminución de la excitotoxicidad, el daño mediado por Ca²⁺, el estrés oxidativo y la apoptosis (Kurisu & Yenari, 2018). Otra opción que se investiga para mejorar el efecto de la isquemia-reperfusión (IR) y disminuir el daño asociado a ella es la **hemodilución** con perfundidos sin células que tengan alta capacidad de transporte de oxígeno; esta estrategia sirve de suplemento sanguíneo, previniendo la anemia, y además puede garantizar una distribución vascular eficaz de la terapia molecular (Daniele et al., 2021). Los perfundidos empleados tienen que ser sensibles a la manipulación de la osmolaridad para evitar la formación de edemas (Daniele et al., 2021).

Sin embargo, la estrategia que más se está investigando es la de **neuroprotección farmacológica en combinación con las terapias de retirada del coágulo**, con el objetivo de interferir en los eventos de la cascada isquémica a varios niveles, para impedir que distintos mecanismos de daño celular produzcan la muerte de las células nerviosas vulnerables de la penumbra isquémica (O'Collins et al., 2009). Para ello, se propone el empleo racional de la **politerapia**, combinando el uso de distintos agentes farmacológicos que pueden mejorar simultáneamente diferentes mecanismos implicados en las lesiones y la muerte celular post-isquemia (Daniele et al., 2021). Esto incluiría inhibir los eventos patológicos que llevan al aumento de calcio intracelular, o a la sobrecarga de radicales libres, entre otros. En este contexto podemos encontrar a los quelantes de metales, como los de hierro, que lo secuestran, y previenen la formación de radicales hidroxilos, aparte de que estabilizan el factor de transcripción inducible por hipoxia 1α (HIF-1α), lo que aumenta la transcripción de genes pro-supervivencia (Weinreb et al., 2010). Otros, como la deferoxamina y el deferasirox, inhiben las prolil-hidroxilasas, reduciendo el volumen de infarto en animales si se administran en el momento del ictus. Deferasirox se emplea

ya en clínica y se puede tomar oralmente, con potencial para profilaxis de ictus en pacientes con alto riesgo (Zhao & Rempe, 2011).

En las últimas décadas, otra de las dianas que se persigue tratar en el ictus isquémico es la **inflamación** asociada a él. En este ámbito se ha descubierto que algunos **factores de crecimiento**, como el factor estimulador de colonias de granulocitos (G-CSF), pueden tener un papel neuroprotector y anti-inflamatorio, ya que éste previene la apoptosis, reduce el volumen de infarto y mejora los resultados clínicos (Strecker et al., 2010). Se ha visto que este factor se encuentra regulado al alza en el ictus isquémico agudo de animales, por lo que también podría ejercer un papel en la fisiopatología humana (Hasselblatt et al., 2006). Este fármaco superó una primera fase de ensayos (Schäbitz et al., 2010), pero se paró en una fase más avanzada con mayor cantidad de pacientes (Ringelstein et al., 2013). También se ha descrito ampliamente el papel anti-inflamatorio de la **aspirina** y de las **estatinas**, que logran reducir los volúmenes de infarto por activación de NF- κ B o por disminución en la producción de citoquinas y en la interacción de leucocitos con el endotelio vascular (Deb et al., 2010). Otras moléculas antiinflamatorias ampliamente estudiadas han sido el **receptor gamma activado por el proliferador de peroxisomas (PPAR γ)**, un factor de transcripción que controla el metabolismo de lípidos y glucosa que puede inhibir la expresión de genes durante la IR y potenciar procesos beneficiosos como la angiogénesis (Li et al., 2020); o los **inhibidores de la enzima nuclear poli-(ADP-ribosa) polimerasa I (PARP-1)**, la cual se activa en condiciones de daño al DNA e induce la reparación del mismo, lo que lleva a la depleción del NAD⁺, la interrupción del transporte de electrones y de la formación de ATP, además de la activación de rutas proinflamatorias. Así, los inhibidores de PARP-1 han demostrado aportar resultados positivos en ensayos clínicos para el tratamiento de enfermedades como el ictus (Tiwari et al., 2022). Además, recientemente se está estudiando el papel de **ApTOLL**, un **antagonista del receptor TLR4** (presente en células de la línea mieloide como granulocitos y macrófagos), que ha demostrado poseer efectos neuroprotectores con un buen perfil de bioseguridad administrándose hasta 6 horas después del inicio de los síntomas en combinación con tratamiento endovascular, y consiguiendo reducir la mortalidad y la discapacidad a los 90 días (Hernández-Jiménez et al., 2023). Este antagonista se encuentra actualmente en fase I-II de ensayos clínicos.

4. Tratamientos antioxidantes para el ictus y las enfermedades neurodegenerativas

Como ya se comentó anteriormente, el estrés oxidativo es uno de los mecanismos clave de las enfermedades asociadas a la edad. En efecto, juega un papel fundamental en la isquemia cerebral (y por ende, en el ictus isquémico), así como en otras muchas enfermedades neurodegenerativas, entre las que hemos destacado la AD, dado su importante componente vascular, que está cobrando interés en los últimos años (Quaegebeur et al., 2011), y el papel que ejercen los ROS en su fisiopatología (ver apartado 2.2. de “Introducción”).

Es por ello que, en las últimas décadas, se han analizado una serie estrategias terapéuticas que tienen como diana el estrés oxidativo, que aunque podrían tener una implicación directa en el tratamiento del ictus isquémico, también podrían servir para el tratamiento de distintas ARDs.

Existen tres tipos de abordajes frente al estrés oxidativo, que tienen especial relevancia en la investigación de tratamientos frente a la isquemia cerebral: la inhibición de la generación de RONS, la potenciación de la degradación de RONS, y la eliminación de los radicales libres.

4.1. Inhibición de la formación de RONS

Una de las principales estrategias para impedir de formación de RONS es la inhibición de la ciclooxigenasa-2 (COX-2). El aumento de calcio de la isquemia cerebral activa la fosfolipasa A2, generando ácido araquidónico (Moro et al., 2005), que es metabolizado por COX-2, enzima regulada al alza durante la isquemia cerebral (Kunz et al., 2010), y también por lipooxigenasas que generan $O_2^{\cdot-}$ y otros RONS. Basados en esta evidencia, NS-398, un inhibidor de COX-2, ha demostrado inducir neuroprotección significativa tras isquemia cerebral focal transitoria y permanente en roedores (Huang et al., 2016), siendo eficaz hasta 18 h tras la inducción del ictus. A pesar de estos avances, aun quedan por dilucidar muchos de los mecanismos de toxicidad en los que está involucrado COX-2 (Minuz, 2008).

Además de las principales vías de generación de RONS descritos anteriormente, la xantina oxidasa (XO) es otra posible fuente de $O_2^{\cdot-}$. Esta enzima en condiciones de IR cataliza la

oxidación de hipoxantina a xantina, que puede seguir oxidándose a ácido úrico, generando anión superóxido en el proceso. Sin embargo, en condiciones normales se convierte en xantina deshidrogenasa, que oxida xantina en presencia del cofactor NAD⁺ a ácido úrico sin generar ROS (Nishino et al., 2008). Por ello, una de las estrategias de inhibición de la formación de RONS es precisamente inhibir la acción de la XO en el tejido sometido a IR. Uno de los fármacos más prometedores es el alopurinol, que parece disminuir la formación de O₂^{•-} (Ono et al., 2009), y que en roedores produjo una neuroprotección dosis-dependiente (Rodrigo et al., 2013).

4.2. Potenciación de la degradación de RONS

De entre todas las enzimas antioxidantes, probablemente la modificación de la actividad de la catalasa y la SOD hayan sido las que más se hayan estudiado en el ámbito de la terapia frente a las RONS. Así, se han obtenido resultados muy prometedores en la neuroprotección al modificar SOD y catalasa para aumentar su permeabilidad por la BBB y las membranas celulares (Yang & Li, 2016); utilizando compuestos sintéticos con actividad similar a estas dos enzimas (Kato et al., 2003); empleando tamoxifen, un modulador selectivo del receptor de estrógenos que aumenta los niveles de SOD en un modelo de isquemia permanente (Wakade et al., 2008); o el compuesto SMND-309, para evitar la disminución en SOD y GSH-Px tras la isquemia, siendo ampliamente neuroprotector cuando se administra en las 6 h siguientes al evento isquémico y manteniendo la neuroprotección durante 7 días (Tian et al., 2009).

4.3. Eliminación de radicales libres

Esta estrategia es, con diferencia, la más ampliamente estudiada. Las moléculas que atrapan o eliminan RONS son muy heterogéneas, e incluyen tioles como el ácido lipoico, altamente hidrofóbico, por lo que atraviesa muy bien la BBB y regenera antioxidantes como las vitaminas C y E o el glutatión (Ding et al., 2021); o la **N-acetil cisteína (NAC)**, que disminuye significativamente el estrés oxidativo (Baker et al., 2009) y actúa como neuroprotector cuando se administra antes, pero sobre todo después del episodio isquémico (Khan et al., 2004). **NAC** también reduce marcadores de inflamación como TNF α , IL-1 β e IL-6 (Garg et al., 2018), y mejora las capacidades cognitivas de memoria y

aprendizaje en ratones, lo que podría tener a su vez importancia en el tratamiento de la AD (Farr et al, 2003). Esto evidencia que, durante la etapa de reperfusión, el estrés oxidativo suele ser más intenso que en el evento isquémico (Dringen, 2000), por lo que se puede emplear el éster monoetílico de glutatión para reducir el volumen de infarto (Anderson et al., 2004).

Otra molécula antioxidante que se ha estudiado en los últimos años ha sido la **edaravona**, que reduce el tamaño de la lesión isquémica de forma muy significativa, tanto *in vitro* como *in vivo*, y la generación de O_2^{\bullet} y H_2O_2 (Lee et al., 2010; Nakase et al., 2011). De hecho, la edaravona pasó a ensayos clínicos demostrando una alta eficacia neuroprotectora incluso cuando se administraba 72 h después del ictus (Edaravone Acute Brain Infarction Study Group, 2003) y una mejora en las funciones cognitivas de los pacientes tratados tras 3 meses de observación (Miyaji et al., 2015), por lo que fue aprobado para el tratamiento del ictus en Japón en 2001. Sin embargo, debido a la naturaleza contradictoria de los resultados de múltiples ensayos con edaravona (Lapchak, 2010), siguen siendo necesarios más estudios que confirmen su efecto neuroprotector. Otros compuestos estudiados son los lazaroides, derivados de glucocorticoides, pero sin la naturaleza gluco o mineralocorticoide, como el Tirilazad (Li & Yang, 2016).

Las **vitaminas E y C** son antioxidantes conocidos, por lo que se ha estudiado su utilización como terapia del ictus. Por un lado, se sabe que la vitamina E puede proteger las membranas celulares tras la isquemia (Mishima et al., 2003) y producir la transactivación de los genes HIF-1, que inducen adaptación a la hipoxia (Zhang et al., 2004). Por otro lado, la administración exógena de vitamina C puede proteger las zonas de riesgo tras la isquemia (Harrison & May, 2009), en roedores y en primates (Li & Yang, 2016). Sin embargo, parece que su forma permeable oxidada, el ácido dehidroascórbico (DHA) atraviesa mejor la BBB y ejerce un efecto neuroprotector más prolongado, tanto si se administra antes como después del evento isquémico. Cuando las vitaminas C y E se administraron en la dieta canina, permitieron una mejora en las tareas cognitivas, lo que indica que estas vitaminas también podrían emplearse para el tratamiento de la AD (Milgram et al., 2005). De hecho, tanto la vitamina E como los potenciadores mitocondriales MitoQ (análogo sintético de la enzima Q10) y Elamipretida (tetrapéptido

de unión a la cardiolipina) reducen el estrés oxidativo y la toxicidad por A β (Manczak et al., 2010).

La **melatonina**, capaz de aumentar las expresiones de SOD y otras enzimas antioxidantes, también es otra molécula prometedora, ya que se ha confirmado su eficacia neuroprotectora en distintos modelos experimentales, y que su déficit genera una especial sensibilidad a la isquemia cerebral, mientras que su administración antes de un evento isquémico aumenta la resistencia al daño cerebral (Reiter et al., 2005). Esta hormona también podría ser de utilidad en el tratamiento de la AD, ya que reduce los síntomas de comportamiento de los pacientes (Rosales-Corral et al., 2011), inhibe la β -secretasa para a su vez favorecer a la α , protege frente al estrés oxidativo ejercido por metales, y tiene muy buenas propiedades antiinflamatorias (Shukla et al., 2017). Todo ello ha resultado en que la conjugación de un AChEI clásico como tacrina con melatonina permita una significativa mejora cognitiva y reduzca el depósito de A β (Spuch et al., 2009), además de la inhibición de la AChE 40.000 veces mayor a la de la tacrina (Rodríguez-Franco et al., 2005).

Por último, otra de las estrategias más estudiadas en la última década frente al estrés oxidativo ha sido la de emplear compuestos capaces de atrapar a los radicales libres, como las **nitronas**.

5. Las nitronas como nuevos fármacos para el tratamiento de las Enfermedades de la Edad

5.1. Nitronas: estructura y mecanismos de acción

Las nitronas son compuestos orgánicos, con la estructura de un N-óxido de imina, que atrapan radicales libres. Originalmente se diseñaron para poder cuantificar y detectar radicales libres que normalmente son demasiado reactivos y de vida corta (Janzen & Blackburn, 1968). Las nitronas reaccionan con un radical libre para formar un compuesto denominado aducto de espín, más estable y menos reactivo, por lo que el radical queda inactivado, siendo incapaz de dañar los tejidos celulares o actuar en otros procesos bioquímicos.

Las nitronas, pues, tienen un gran número de aplicaciones para el tratamiento de enfermedades de la edad, ya que protegen de la muerte neuronal, la pérdida de homeostasis del Ca^{2+} y de la inactivación de la bomba Na^+/K^+ inducidas por el péptido $\text{A}\beta$ (Zuroff et al., 2017), con lo que podrían ser candidatos para la terapia de la AD. Sin embargo, una de sus aplicaciones más estudiadas, y donde el estrés oxidativo juega un papel clave, es en la isquemia cerebral.

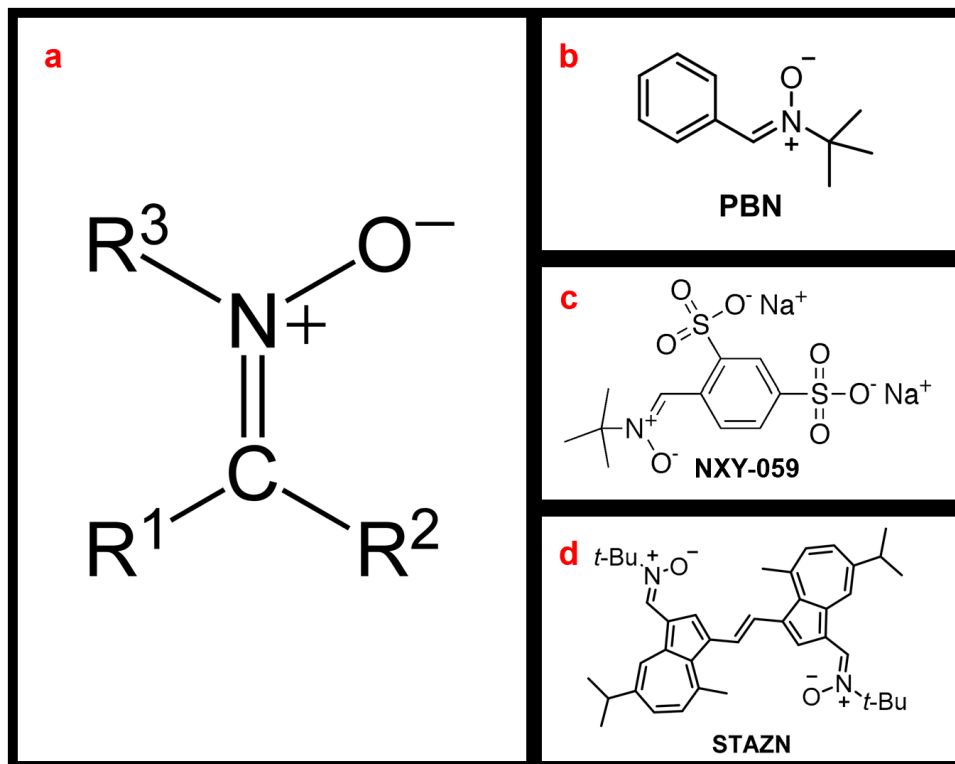


Figura 11. Estructura general de una nitrona (a) y principales nitronas ensayadas en investigación (b, c, d). La α -fenil-N-tert-butil nitrona o PBN (b) fue una de las primeras nitronas que se estudiaron en neuroprotección. La nitrona 2,4-disulfofenil-N-tert-butil nitrona o NXY-059 (c) fue la primera en alcanzar ensayos clínicos. Por su parte, STAZN (d) fue uno de los primeros compuestos bis-nitrona usado para ensayos de neuroprotección.

Una de las primeras nitronas que se empleó en ensayos de isquemia experimental fue la α -fenil-N-tert-butil nitrona (PBN) (Figura 11b). Esta nitrona fue capaz de atenuar el daño isquémico y mantener la actividad de la glutamina sintasa en un modelo de reperfusión en gerbos (Oliver et al., 1990), además de proteger frente a la mortalidad inducida por isquemia global prolongada en estos animales (Floyd, 1990), disminuir los efectos locomotores, así como el daño a neuronas piramidales hipocámpales (Phillis & Clough-Helfman, 1990). PBN también reduce el volumen de infarto de forma efectiva en modelos

de oclusión de la arteria cerebral media (MCAO) transitoria (Pazos et al., 1999; Li et al., 2001) y en modelos de oclusión de la MCA permanente, incluso cuando se administra 12 h después del inicio de la isquemia (Cao & Phillis, 1994).

Debido a estos prometedores resultados, la nitrona **PBN** se convirtió en el punto de partida para la síntesis de nuevos compuestos, dentro de los que destaca **NXY-059** (Figura 11c). Esta nitrona presenta una mayor capacidad neuroprotectora, significativa incluso si se administra hasta 8 h después de MCAO, y un perfil de bioseguridad favorable en diversos modelos (Kuroda et al., 1999; Sydserff et al., 2002; Han et al., 2003), lo que le permitió entrar a fase clínica, llegando a las fases I y II (Diener et al., 2008). De hecho, es posible que su efecto beneficioso en la isquemia experimental se deba más bien a que refuerza la integridad de la BBB, más que a un efecto neuroprotector directo (Culot et al., 2009).

Desde entonces, se han realizado numerosos esfuerzos para diseñar, sintetizar y probar la capacidad neuroprotectora de compuestos con supuestas mejores propiedades antioxidantes que sus antecesores. Por ejemplo, cabe destacar la *bis*-nitrona **STAZN** (Figura 11d), una azulenil nitrona de segunda generación con dos motivos nitrona, que demostró un elevado poder antioxidante (Becker et al., 2002) y elevada neuroprotección en isquemia focal (Ley et al., 2007).

5.2. Contribuciones del grupo de investigación al estudio del tratamiento con nitronas para el tratamiento de las enfermedades de la edad

En base a estos antecedentes, desde 2008, nuestro grupo de investigación, liderado por la Dra. Oset Gasque (Dpto. de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Farmacia, UCM), y en colaboración con el equipo del Dr. Marco-Contelles (Laboratorio de Química Médica, Instituto de Química Orgánica General, CSIC), desarrolla e investiga la actividad de nuevas nitronas de síntesis neuroprotectoras, como tratamiento para diversas enfermedades asociadas a la edad.

Unos de los primeros compuestos estudiados por nuestro grupo, y que demostraron tener características prometedoras para el tratamiento del ictus isquémico fueron las α -aril-*N*-alquil nitronas (Chioua et al., 2012), capaces de atrapar el radical OH \cdot e inhibir de forma

potente la lipoxigenasa *in vitro*, disminuyendo la peroxidación lipídica fruto del daño por IR, así como de reducir significativamente la muerte de tipo necrótico, aumentando la viabilidad celular tras IR, siendo además, capaces de atravesar la BBB. También se estudiaron otras nitronas derivadas de aldehídos aromáticos (Samadi et al., 2011), pero ninguna de ellas destacó especialmente en todos los ensayos antioxidantes *in vitro* para determinar su capacidad antioxidante y poder neuroprotector.

También se ha estudiado el papel neuroprotector y antioxidante de algunas *quinolil-nitronas*. De ellas, la nitrona más prometedora fue **RP19** por su perfil neuroprotector y antioxidante en modelos de isquemia experimental (Ayuso et al., 2017), observándose que este compuesto a 50 μM inducía neuroprotección a 5 días después de OGD, disminuía la formación de ROS y peroxidación lipídica, reducía el tamaño del volumen de infarto, disminuía la muerte neuronal por apoptosis y mejoraba los resultados de test neurológicos en los animales a las 48 h o 5 días tras la isquemia global o focal producida en animales.

En la misma línea, se desarrollaron y estudiaron nuevas **nitronas C-dialcoxi-fosforiladas** (Piotrowska et al., 2019), donde destacaron las que portaban el sustituyente *N-tert*-butilo por su capacidad anti-necrótica y neuroprotectora, su actividad antioxidante, capaz de revertir la producción de $\text{O}_2^{\cdot-}$ al 100% a 1000 μM , inhibir la peroxidación lipídica en un 62% y la actividad lipooxigenasa en un 45% a 100 μM .

Por otro lado, para seguir incrementando el potencial terapéutico a partir de **PBN**, se diseñaron y sintetizaron otras nitronas relacionadas, como las *indanonitronas* que incorporaban un segundo ciclo fusionado de cinco miembros (Jiménez-Almarza et al., 2019), entre las que destacó **IN4**, mostrando una neuroprotección celular muy elevada en condiciones de isquemia y muy buenas propiedades antioxidantes *in vitro*, superando las de **PBN**, ya que era capaz de inhibir completamente la lipooxigenasa a 100 μM .

Simultáneamente, también se han desarrollado e investigado nuevos derivados de tacrina para AD, como las *β -naftotacrin*as, inhibidores potentes y selectivos de AChE humana, menos tóxicas que la tacrina, y neuroprotectores frente a la mezcla oligomérica/rotenona (Esquivias-Pérez et al., 2013); la *cromenotacrina* **CT6**, menos tóxica que la tacrina, que disminuía la peroxidación lipídica y capaz de proteger las células frente al daño

mitocondrial, siendo un potente inhibidor no competitivo de AChE (Oset-Gasque et al., 2014); las *piranopirazolotacrinas*, que inhiben la agregación de A β , mostrando efectos neuroprotectores y poco hepatotóxicos (Chioua et al., 2015); o las *piranotacrinas*, que mostraron no solo ser potentes AChEI y anti-agregante de A β , sino que también eran capaces de inhibir la fosforilación de Tau (García-Font et al., 2016).



Objetivos e Hipótesis

II. OBJETIVOS E HIPÓTESIS

Este trabajo de tesis doctoral se enmarca en nuestro proyecto dirigido al **desarrollo e identificación de nuevas nitronas**, pequeñas y antioxidantes, con **capacidad neuroprotectora para la terapia de la CI** y, en general, de enfermedades neurodegenerativas, asociadas a la edad, que cursan con estrés oxidativo.

En particular, nos propusimos los siguientes objetivos:

- Evaluar la capacidad neuroprotectora *in vitro* de nuevas nitronas derivadas de **PBN**, en base a la incorporación de *dos motivos nitrona (HBNs)* (*N*-Me, *N*-*tert*-Bu o *N*-Bn) en posiciones relativas *para-*, *meta-* y *orto-*, o *tres motivos nitrona (HTNs)* (*N*-Me, *N*-*tert*-Bu o *N*-Bn) en posiciones relativas C1, C3, y C5, conjugados con el anillo bencénico, y comparar los resultados con los observados para **PBN**, siendo nuestra **hipótesis** que *“a mayor número de grupos nitrona conjugados con el anillo bencénico, mayor neuroprotección”*. Se analizará, por tanto, si el efecto aditivo de grupos nitrona podría resultar en una nueva nitrona derivada de **PBN** con poder neuroprotector superior al de ésta.
- Conocer la capacidad neuroprotectora *in vitro* de nuevas nitronas derivadas de **PBN**, incorporando un *anillo de fenilo en posición para-*, para rendir **bi-fenil nitronas (BPNs)**, con un motivo nitrona (**BPMNs**) o con dos (**BPHBNs**) (*N*-Me, *N*-*tert*-Bu o *N*-Bn), comparando los resultados con los observados para **PBN**, siendo nuestras **hipótesis** que *“la conjugación en un sistema de bi-fenilo debe resultar en nitronas más potentes que **PBN**”* y que *“un segundo motivo nitrona en posición para- las haría más potentes que las mono-nitronas relacionadas”*.
- Estudiar la capacidad neuroprotectora *in vitro* de nuevas nitronas insertadas en núcleos de purina y pirimidina, como *nucleobases (NDNs)*, y comparar su efecto con **PBN**, siendo nuestra **hipótesis** que *“las nitronas que incorporan nucleobases heterocíclicas en sus estructuras deben ser mucho más potentes como agentes neuroprotectores que las conjugadas con anillos bencénicos”*.
- Evaluar la capacidad neuroprotectora *in vitro* de nuevas **8-OH-QNs** para determinar el papel de la localización del motivo nitrona (*N*-*tert*-Bu o *N*-Bn) en C2 o en C3 del anillo heterocíclico, comparando su efecto con el de **PBN**, siendo

nuestra **hipótesis** que *“las nitronas conjugadas con anillos de 8-OH quinolina deben ser mucho más potentes como agentes neuroprotectores que las conjugadas con anillos bencénicos”*.

- Estudiar los mecanismos de muerte celular asociados a la neuroprotección que subyacen al potente efecto neuroprotector de la quinolil-nitrona **QN23**, y de la colesteronitrona **ChN2**, previamente identificadas y analizadas en nuestros laboratorios.
- Evaluar la capacidad de las nuevas “nitronas hit” encontradas, para reducir el volumen de infarto *in vivo* en ratones sometidos a pMCAO, con el fin de conocer si los resultados obtenidos en modelos celulares *in vitro* son trasladables a los modelos preclínicos en animales.



Materiales y Métodos

III. MATERIALES Y MÉTODOS

1. Materiales: compuestos de estudio

1.1. Homo-bis-nitronas (HBNs)

Se han evaluado nueve nuevas **homo-bis-nitronas** (HBNs) (Figura 12) análogas de PBN, que incorporan dos grupos nitrona en tres posiciones distintas del anillo aromático:

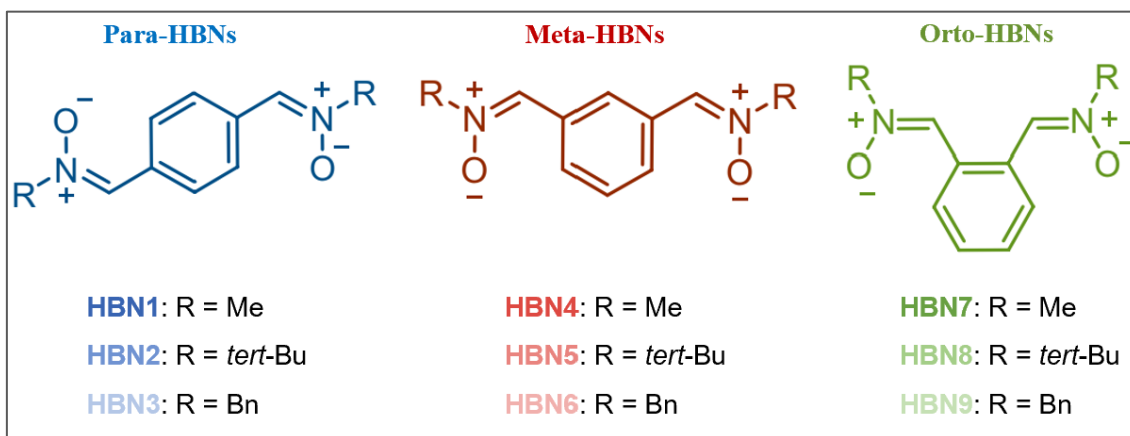


Figura 12. Estructura de las homo-bis-nitronas (HBNs) 1-9 ensayadas en esta tesis doctoral.

Grupos nitrona en posición *para*- (en los carbonos C1 y C4 del anillo bencénico):

- **HBN1:** R = Metilo (Me).
- **HBN2:** R = *tert*-Butilo (*tert*-Bu).
- **HBN3:** R = Bencilo (Bn).

Grupos nitrona en posición *meta*- (en los carbonos C1 y C3 del anillo bencénico):

- **HBN4:** R = Me.
- **HBN5:** R = *tert*-Bu.
- **HBN6:** R = Bn.

Grupos nitrona en posición *orto*- (en los carbonos C1 y C2 del anillo bencénico):

- **HBN7:** R = Me.
- **HBN8:** R = *tert*-Bu.

- **HBN9**: R = Bn.

1.2. Homo-tris-nitronas (HTNs)

Se han evaluado tres nuevas **homo-tris-nitronas (HTNs)** (Figura 13), diseñadas a partir de la estructura base de **PBN**, con tres grupos nitrona en cada una, en posiciones C1, 3 y 5 del anillo bencénico:

- **HTN1**: R = Me.
- **HTN2**: R = *tert*-Bu.
- **HTN3**: R = Bn.

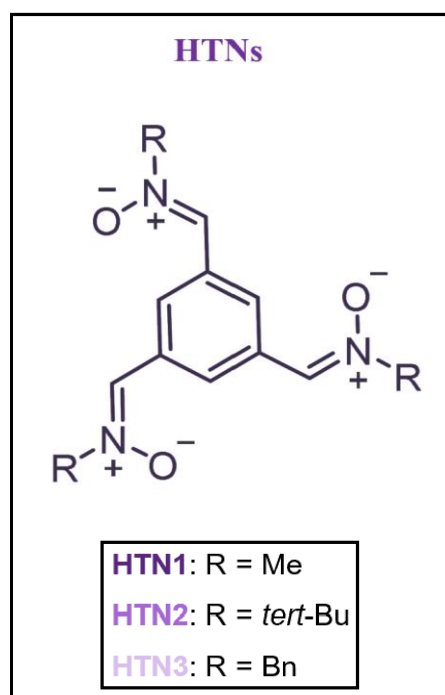


Figura 13. Estructura de las homo-tris-nitronas (HTNs) 1-3 ensayadas en esta tesis doctoral.

1.3. Bi-fenil-nitronas (BPNs)

Se han evaluado seis **1,10-bi-fenil-nitronas (BPNs)** como análogos de **PBN** (Figura 14). A su vez, estos compuestos BPN podrían tener uno o dos grupos nitrona:

- Bi-fenil-*mono*-nitronas (BPMN), que incorporan un solo grupo nitrona situado en posición del anillo de 1,4-bi-fenilo y un solo sustituyente (R):

- **BPMN1**: R = Me.
- **BPMN2**: R = *tert*-Bu.
- **BPMN3**: R = Bn.
- Bi-fenil-homo-*bis*-nitronas (BPHBN) que presentan dos grupos nitrona en posiciones C1, 1', en *para*-, con el mismo sustituyente (R):
 - **BPHBN4**: R = Me.
 - **BPHBN5**: R = *tert*-Bu.
 - **BPHBN6**: R = Bn.

Sin embargo, es necesario destacar que el compuesto **BPHBN6** resultó demasiado insoluble, lo que hizo imposible el análisis de sus propiedades neuroprotectoras y antioxidantes, por lo que el perfil neuroprotector de esta molécula no se ha podido determinar.

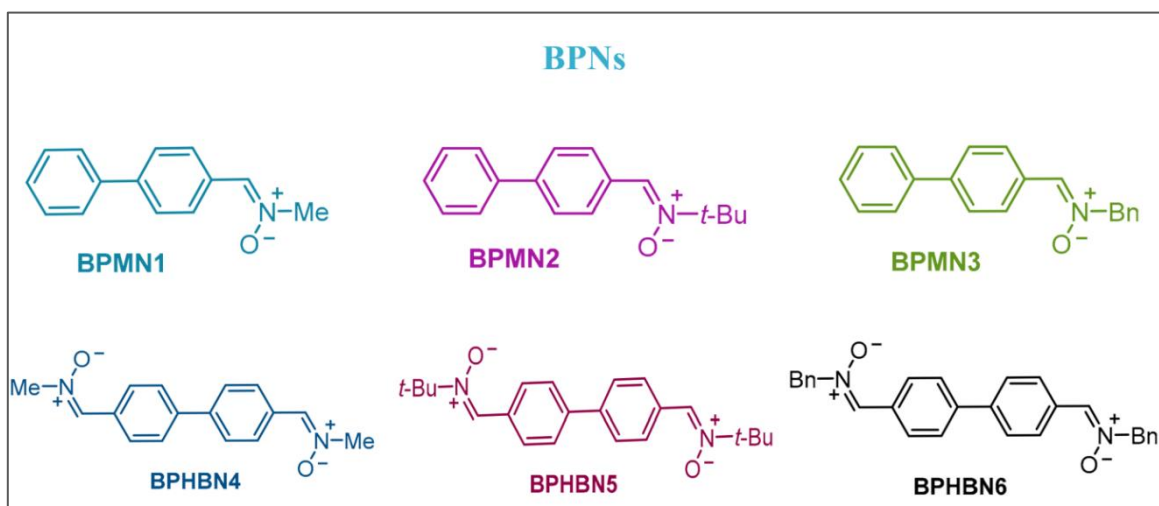


Figura 14. Estructuras de las 6 bi-fenil-nitronas (BPNs) sintetizadas. BPMNs 1-3 con 1 grupo nitrona y sustituyente Me, *t*-Bu o Bn (arriba); BPHBNs 4-6 con 2 grupos nitrona y sustituyentes Me, *t*-Bu y Bn (abajo).

1.4. Quinolil-nitronas (QNs)

Se han evaluado seis **quinolil-nitronas** (QNs) (Figura 15):

- Las **QNs 1-4** son 2-cloro QNs, con sustituyentes *N*-*t*-Bu o *N*-Bn en el motivo nitrona en C3, con un sustituyente distinto en la posición C8, que permite diferenciarlos en dos subgrupos:

- **QNs 1 y 2:** 2-cloro-8-metoxi QNs, que a su vez pueden tener distinto sustituyente unido al grupo nitrona:
 - **QN1:** R = *tert*-Bu.
 - **QN2:** R = Bn.
- **QNs 3 y 4:** 2-cloro-8-hidroxi QNs, que a su vez pueden tener distinto sustituyente unido al grupo nitrona.
 - **QN3:** R = *tert*-Bu.
 - **QN4:** R = Bn.
- Las **QNs 5-6** son 8-hidroxi QNs con sustituyentes *N-tert*-Bu o *N-Bn* en el motivo nitrona, en C2:
 - **QN5:** R = *tert*-Bu.
 - **QN6:** R = Bn.

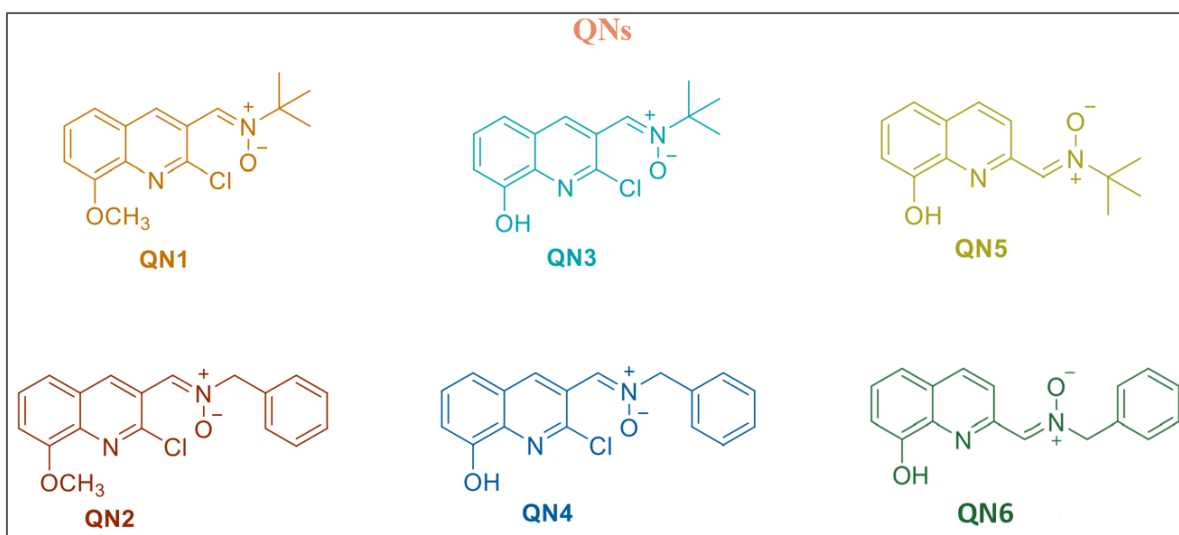


Figura 15. Estructura de las quinolil-nitronas (QNs) 1-6 ensayadas en este trabajo de investigación. Las QNs con sustituyente *N-t*-Bu son QN1, 3 y 5 (arriba), mientras que las QNs con sustituyente *N-Bn* son QN2, 4 y 6 (abajo).

1.5. QN23 y ChN2

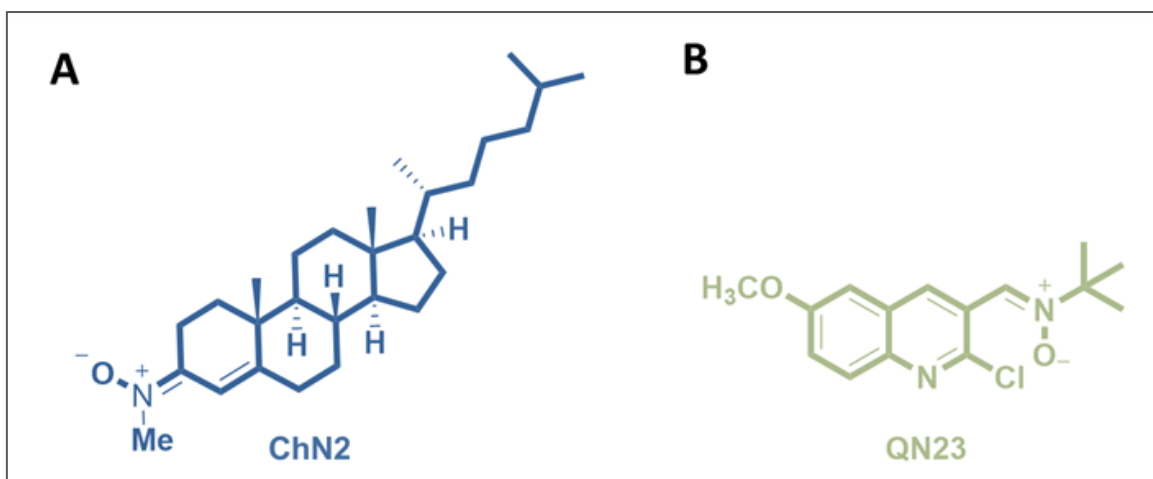


Figura 16. Estructura de la colesteronitrona ChN2 (A) y la quinolil-nitrona 23 (QN23) (B) ensayadas en este trabajo de investigación. ChN2 posee un sustituyente Me unido al grupo nitrona, mientras que la QN23 posee un *t*-Bu. Estas nitronas fueron las mejores de su grupo en estudios anteriores (referencia), pero se caracterizó su mecanismo neuroprotector.

Se han evaluado las nitronas que se muestran en la Figura 16:

- La **colesteronitrona 2 (ChN2)**, con sustituyente *N*-Me unido al grupo nitrona, fue diseñada y sintetizada previamente por el grupo de investigación (Ayuso et al., 2015) y, dadas sus prometedoras características neuroprotectoras, antioxidantes y de mejora de los déficits neurológicos en roedores debidos a esta nitrona, nos han movido, en este trabajo, al estudio de sus mecanismos neuroprotectores y antioxidantes.
- La **quinolil-nitrona 23 (QN23)**, con sustituyente R = *tert*-Bu unido al grupo nitrona, diseñada como un análogo de la **QN RP19** (cuyo sustituyente R es Bn). Igualmente, los prometedores resultados observados en los estudios *in vivo* e *in vitro* de neuroprotección en modelos de isquemia experimental con esta nitrona (Ayuso et al., 2017), han sido la razón para llevar a cabo un estudio detallado de sus mecanismos neuroprotectores y antioxidantes.

Todos los anteriores grupos de nitronas mencionados anteriormente en este estudio (HBNs, HTNs, BPNs y QNs) fueron sintetizados por el grupo de investigación dirigido

por el Dr. José Luis Marco-Contelles, en el Instituto de Química Orgánica General (IQOG) del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC).

1.6. Nitronas derivadas de nucleobases (NDNs)

Se han evaluado nueve **nitronas derivadas de nucleobases (NDNs)**, que incorporan en su estructura el motivo heterocíclico de purina o pirimidina (Figura 17), sintetizadas en el grupo de la Dra. Dorota G. Piotrowska (Facultad de Farmacia, Universidad Médica de Lodz, Polonia).

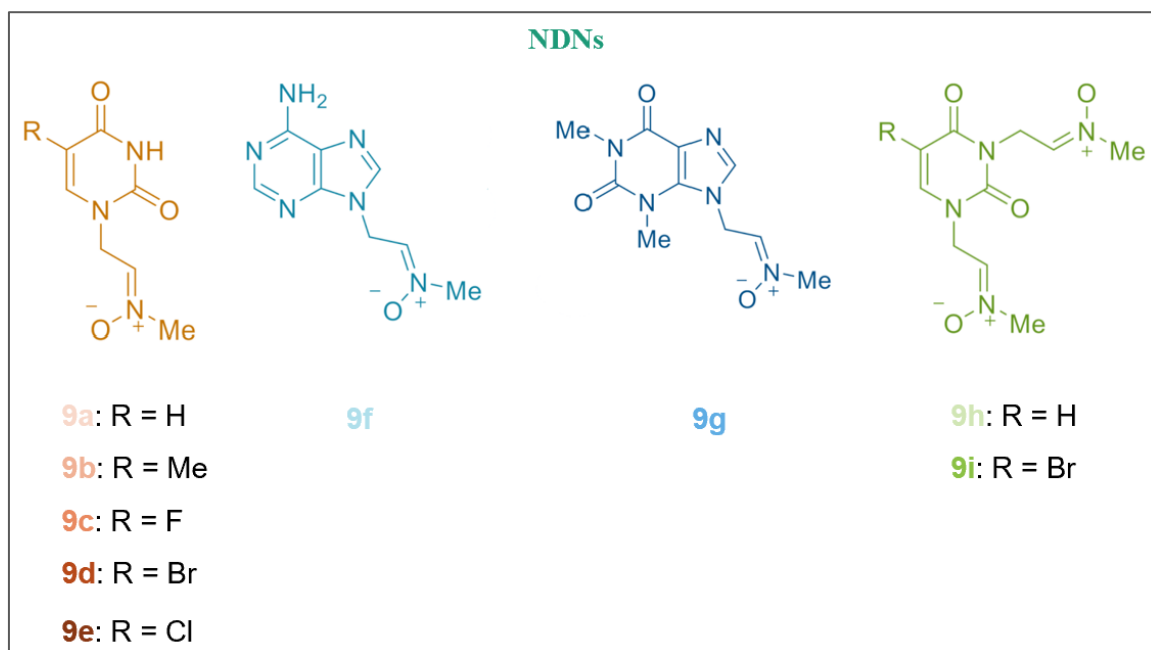


Figura 17. Estructura de las nueve nitronas derivadas de nucleobases (NDNs) ensayadas en este trabajo de investigación. Siete de ellas, las nitronas 9a-e, y 9h-i, poseen un núcleo de pirimidina, siendo la principal diferencia la presencia de uno (9a-e) o dos (9h-i) grupos nitrona. Por su parte, las nitronas 9f-g poseen núcleos de purina.

1.6.1. MONO-NITRONAS DERIVADAS DE NUCLEOBASES (NDNS)

Dentro de las NDNs 9 (Figura 17), distinguimos entre *mono*-nitronas, y *bis*-nitronas

- Las *mono*-NDNs 9a-e contienen estructura pirimidínica y solo poseen un grupo nitrona, y se diferencian en el sustituyente R asociado.
 - Nitrona 9a: R = H.
 - Nitrona 9b: R = Me.
 - Nitrona 9c: R = F.

- Nitrona **9d**: R = Br.
- Nitrona **9e**: R = Cl.
- Las *mono*-NDNs **9f-g** contienen el motivo de purina, y solo poseen un grupo nitrona, ambas con sustituyente *N*-Me en el grupo nitrona.
 - Nitrona **9f**: estructura de purina.
 - Nitrona **9g**: estructura de oxi-purina.

1.6.2. *BIS-NITRONAS DERIVADAS DE NUCLEOBASES (NDNS)*

Las *bis*-NDNs **9h, i** presentan estructura pirimidínica y poseen dos grupos nitrona, y se diferencian en el sustituyente que éste tiene asociado.

- Nitrona **9h**: R = H.
- Nitrona **9i**: R = Br.

2. Métodos

2.1. Cultivos celulares de neuroblastoma

La línea celular de neuroblastoma humano SH-SY5Y es una de las líneas más empleadas en neurociencia como modelo celular para el estudio de la neuroprotección (You et al., 2022) y neuroinflamación (Yang et al., 2022), por evaluación de la viabilidad celular inducida por estrés oxidativo (Xie et al., 2010). Una de las principales ventajas de este modelo es que siendo células humanas, la traslación de los resultados obtenidos sobre esta línea celular a la clínica es mucho rápida. Además, es mucho más fácil y rápido obtener las células necesarias para repetir los experimentos y conseguir una significación estadística adecuada, en comparación con los cultivos primarios de neuronas, para los que se necesita el sacrificio de numerosos animales si se quieren conseguir los mismos resultados. En suma, las SH-SY5Y constituyen un modelo reproducible, fácil de producir y mantener, siendo un método de screening de alto rendimiento para probar la eficacia terapéutica de distintos compuestos.

En esta tesis doctoral, se cultivaron células de la línea de neuroblastoma humano SH-SY5Y sobre “*flasks*” que contenían medio Dulbecco’s: Ham’s F12, 1:1 [v/v] compuesto de 0,5 mM de piruvato sódico, 2,5 mM de GlutaMAX™ [GIBCO, Life Technologies, Madrid (España)], 3,15 mg/mL de glucosa; un 1% de antibiótico-antimicótico (100 ui/mL de penicilina, 100 mg/mL de estreptomicina, y 0,25 mg de anfotericina B); 1% de gentamicina 15 mg/mL (Sigma-Aldrich, Madrid, España) y 10% de suero fetal bovino (FBS) (GIBCO, Life Technologies, Madrid (España)). Estas células se mantuvieron en crecimiento en una atmósfera de 5% CO₂ y 95% aire a 37 °C humidificada, en una cámara de cultivo (Thermo Scientific HERAcell 150i CO₂ Incubator), hasta que se alcanzó la cantidad de células necesarias para el ensayo.

Para cada experimento, las células de neuroblastoma fueron sometidas a digestión con 3 mL de tripsina-EDTA al 0,25%, y las células despegadas se sembraron en placas de 96 o 48 pocillos y una densidad de 0,5 o 1-1,5 x 10⁵ células/well (cells/well), respectivamente, dependiendo del ensayo. Cuando las células llegaron a un 80% de confluencia, esto es, al día siguiente de ser sembradas, se renovó el medio y se realizaron los ensayos pertinentes.

2.2. Tratamientos tóxicos

Para observar si las nitronas pueden tener efectos neuroprotectores, se han utilizado dos tipos de tratamientos tóxicos distintos que inducen la muerte de las células de neuroblastoma humano:

- El tratamiento de las células con **oligomicina A**, que bloquea el complejo V, y **rotenona**, que bloquea el complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial (MRC).
- El tratamiento en condiciones de **privación de oxígeno y glucosa (OGD)**, un método de isquemia experimental, que reproduce los dos principales eventos que ocurren a nivel molecular en la isquemia cerebral.

2.2.1. TRATAMIENTO CON OLIGOMICINA A Y ROTENONA

Las células de neuroblastoma humano de la línea SH-SY5Y se sembraron en placas de 96 pocillos a una densidad de 0,5 x 10⁵ cells/well (ver apartado 2.1. de “Materiales y métodos”). Tras 24 h para su crecimiento, se renovó el medio y las células se sometieron

al tratamiento simultáneo con dos inhibidores de la fosforilación oxidativa y la cadena de transporte de electrones mitocondrial (Figura 18):

- **Oligomicina A** es un inhibidor del complejo V de la MRC (ATP sintasa), que actúa específicamente bloqueando el canal de protones de este complejo enzimático, impidiendo así la fosforilación oxidativa y con ello, la formación de ATP.
- **Rotenona** es un conocido insecticida y tóxico ambiental que es capaz de inhibir el complejo I de la MRC (NADH deshidrogenasa), impidiendo el primer paso en la cadena de transporte de electrones de la mitocondria.

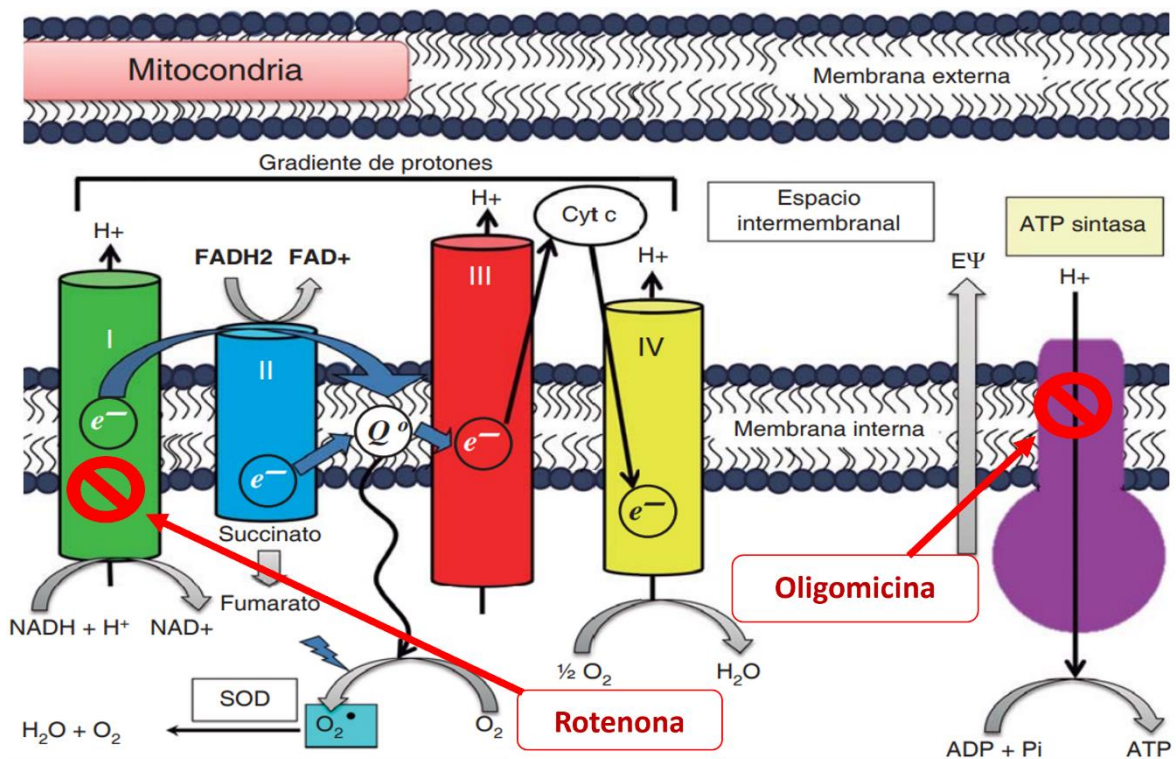


Figura 18. Representación esquemática de las dos partes de la respiración celular: la cadena de transporte de electrones mitocondrial (MRC) y la fosforilación oxidativa mitocondrial, y dianas de acción de los inhibidores oligomicina y rotenona. La MRC comprende cuatro complejos enzimáticos (complejos I, II, III y IV) presentes en la membrana mitocondrial interna. El complejo I es la NADH deshidrogenasa, que cataliza la oxidación del NADH en NAD^+ y aporta un electrón a la cadena. El complejo II es la succinato deshidrogenasa, que aporta otro electrón gracias a la oxidación de $FADH_2$. Los electrones de ambos complejos son transferidos por la coenzima Q al citocromo C o complejo III. Por último, los electrones pasan al complejo IV, que cede los electrones al oxígeno molecular, produciendo una molécula de agua. Por otro lado, la ATP sintasa, también denominado, complejo V de la MRC utiliza el flujo de protones producido por la misma para sintetizar ATP. Se indican las dianas de acción de los inhibidores rotenona (complejo I) y oligomicina (complejo V o ATP sintasa). Modificado de: Luna-Ortiz et al., 2015.

El bloqueo de la respiración celular como consecuencia de la adición de estos inhibidores produce un daño mitocondrial, que tiene como consecuencia principal la acumulación de ROS, uno de los primeros y principales eventos bioquímicos de la isquemia cerebral, así como de otras patologías. Finalmente, todo ello genera citotoxicidad inducida por estrés oxidativo, provocando la muerte celular, lo que permite determinar la capacidad neuroprotectora de los compuestos a ensayar (Li et al., 2017).

En esta tesis doctoral, las nitronas **HBNs**, **HTNs**, **BPNs**, y los compuestos de referencia **PBN** y **NAC**, se añadieron en un rango de concentraciones crecientes de 0,1 a 1000 μM a los pocillos, 10 min antes de la adición de los estímulos tóxicos. Posteriormente, una mezcla de oligomicina A a 10 μM y rotenona a 30 μM (O/R) se añadió a las células sembradas, manteniéndose en un incubador de cultivos a una atmósfera de 5% CO_2 y 95% aire a 37°C humidificada, durante 24 h. Como control (C), se ensayaron muestras sin tratar con O/R (C basal 24h) o tratadas con O/R en ausencia de los compuestos (O/R 24h).

Este procedimiento experimental se realizó a doble ciego, asignando un orden aleatorio a cada nitrona y compuesto de referencia ensayado. Cada compuesto se analizó de forma independiente de 3 a 5 veces en distintos “*batches*” de células en cultivo, y cada experimento se realizó por triplicado.

Transcurrido ese tiempo, se evaluó la viabilidad de las células en cada condición (ver apartado 2.3.1. de “Materiales y métodos”), o se analizó el efecto de la autofagia en este modelo experimental (ver apartado 2.5. de “Materiales y métodos”).

2.2.2. TRATAMIENTO DE ISQUEMIA EXPERIMENTAL

Las placas debidamente sembradas con células de neuroblastoma humano de la línea SH-SY5Y se sometieron a un procedimiento de **privación de oxígeno y glucosa (OGD)** para inducir daño celular, como método de inducción de isquemia experimental *in vitro*.

Las células que van a someterse a OGD se lavaron y se incubaron durante 3-4 h en un medio sin glucosa Dulbecco's (GIBCO, Life Technologies, Madrid, España), compuesto de 0,5 mM de piruvato sódico; 1% de antibiótico-antimicótico (100 ui/mL de penicilina, 100 mg/mL de estreptomina, y 0,25 mg de anfotericina B; de GIBCO, Life Technologies, Madrid (España)); 1% de gentamicina 15 mg/mL (Sigma-Aldrich, Madrid, España) y 10%

de suero fetal bovino (FBS) (GIBCO, Life Technologies, Madrid (España)), en una cámara de cultivo anaerobia (Incubador Memmert, Genesys Instrumentación SI, Madrid (España)) con atmósfera de 95% de N₂/5% de O₂ y humificada a 37 °C y una presión constante de 0,15 bar. Después de OGD, se sustituyó el medio sin glucosa por otro con glucosa y oxigenado (ver apartado 2.1. de “Materiales y métodos”), y se mantuvieron en un incubador de CO₂ (Thermo Scientific HERAcell 150i CO₂ Incubator), en condiciones de normoxia, durante 24 h para su recuperación (IR24h).

En los experimentos de neuroprotección, las nitronas **HBNs**, **HTNs**, **BPNs**, **NDNs**, **QNs**, **QN23** y **ChN2**, se añadieron al comienzo del periodo de isquemia-reperfusión, y se dejaron actuar durante 24 h, en un rango de concentraciones crecientes de 0,01 a 1000 µM.

De forma paralela a las células sometidas a isquemia, se realizaron controles no sometidos a ella, usando siempre un medio con glucosa y condiciones de normoxia durante las 3-4 h que dura la OGD (C4h), o tras cambiar el mismo medio a las 4 h e incubar 24 h adicionales en condiciones de normoxia (C24h) .

En cada experimento se realizaron una serie de controles conteniendo el mismo porcentaje final de dimetil-sulfóxido (DMSO) o etanol, según el disolvente empleado para solubilizar los compuestos inicialmente, y a las concentraciones finales de entre 0,00001% y 1% de disolvente para las muestras con concentraciones de los compuestos entre 0,01 y 1000 µM). DMSO fue el disolvente empleado para todas las nitronas estudiadas, salvo para la **ChN2**, que se disolvió en etanol absoluto. En cualquier caso, la viabilidad celular obtenida a las distintas concentraciones de disolventes osciló entre 100% y 93,5%, descenso que se tuvo en cuenta a la hora de realizar los cálculos de viabilidad celular y neuroprotección.

Este tratamiento se realizó a doble ciego, añadiendo las nitronas de ensayo y los compuestos de referencia en un orden aleatorio, y cada compuesto se analizó independientemente entre 3-5 veces en diferentes “*batches*” de células SH-SY5Y, cada experimento por triplicado.

2.3. Estudio de la capacidad neuroprotectora

2.3.1. MEDIDA DE LA VIABILIDAD CELULAR

Para evaluar la capacidad neuroprotectora de las nitronas estudiadas, se midió la recuperación en la viabilidad celular o capacidad metabólica, inducida por los distintos compuestos, de las células de neuroblastoma sometidas bien a isquemia experimental (OGD-IR) o a estrés oxidativo (O/R) para inducir la muerte celular.

La viabilidad celular se determinó mediante la medida de la actividad metabólica mitocondrial de las células vivas, utilizando el test XTT (Cell Proliferation Kit II de AppliChem, Panreac, Madrid, España), un ensayo colorimétrico cuantitativo basado en el empleo de la sonda mitocondrial XTT [sal sódica de 2,3-bis(2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-2H-tetrazolio-5-carboxanilida)]. Este ensayo se basa en la capacidad de las células vivas para realizar el metabolismo oxidativo mitocondrial, lo que se refleja en su capacidad de reducción en medio alcalino de la sal de tetrazolio XTT a formazán, un producto coloreado de color anaranjado, lo que produce un viraje de color que se puede medir mediante espectrofotometría y está directamente relacionado con la capacidad respiratoria celular.

Las células de neuroblastoma humano se sembraron en placas de 96 pocillos, a una densidad de $0,5 \times 10^5$ cells/well. Tanto las placas de controles (C4h y C24h) como las placas bajo tratamiento de IR u O/R se incubaron con la solución XTT, a una concentración final en el pocillo de 0.3 mg/mL, durante 2h en un incubador a 37 °C en condiciones de humedad con atmósfera de 5% CO₂ y 95% aire (v/v), y se cuantificó la producción de formazán soluble de color anaranjado en un espectrofotómetro de placas Biotek PowerWave XS a una $\lambda = 450$ nm (con respecto a una λ de referencia = 650 nm).

Este estudio de la viabilidad celular también se llevó a cabo en condiciones basales, es decir, mediante la adición de los compuestos a las concentraciones de ensayo, pero sin tratamientos tóxicos, para evaluar si los compuestos bajo estudio tenían algún efecto neurotóxico *per se*, es decir, en ausencia de la isquemia o de los inhibidores de la MRC.

Todos los ensayos de XTT se llevaron a cabo en triplicado en células de al menos 3 *batches* de células diferentes. La viabilidad celular de los controles tratados solo con el DMEM con glucosa fue considerada como el 100% y la capacidad neuroprotectora máxima la

diferencia entre la viabilidad del control y de la IR o O/R sola, en ausencia de los compuestos.

2.3.2. MEDIDA DE LA ACTIVIDAD ANTI-NECRÓTICA

Durante la isquemia, y sobre todo en el *core*, el área que experimenta necrosis celular, la membrana plasmática celular, especialmente importante y sensible en las neuronas, se rompe, liberándose al espacio extracelular parte del contenido soluble intracelular.

En concreto, una de las enzimas citosólicas más conocidas que es liberada al exterior cuando las células entran en estado necrótico, es el lactato deshidrogenasa (LDH), una enzima NAD⁺ dependiente, que cataliza la reacción que se muestra a continuación:



De esa manera, cuantificando la liberación de LDH en el espacio extracelular, en comparación con el contenido total (intra + extracelular) de LDH, se puede valorar el daño que ha sufrido la membrana celular y así, el grado de necrosis que se ha producido en dichas células. La actividad de LDH se determinó en un espectrofotómetro estudiando la velocidad de desaparición de NADH (sustrato), medida por disminución de la absorbancia a 340 nm (Decker & Lohmann-Matthes, 1988).

Para este tipo de ensayos, se cultivaron las células de neuroblastoma humano de la línea SH-SY5Y en placas de 48 pocillos a una densidad de $1-1,5 \times 10^5$ cells/well, se sometieron bien a IR u O/R, o a condiciones basales, en ausencia o presencia de los compuestos bajo ensayo. A continuación, se recogió el medio de cultivo (LDH extracelular), y se lisaron las células pegadas en la placa con tampón Tris-HCl 0,1M pH 7,4 con 0,1% de Triton X-100, recogándose el lisado (LDH intracelular). Ambas suspensiones celulares se sometieron a centrifugación a 13000 rpm durante 5 min, midiéndose posteriormente su actividad LDH total en cada fracción, como se ha descrito. Los datos se expresan como porcentaje de LDH liberado con respecto al total de contenido de LDH (LDH extracelular + intracelular), de forma que, cuanto mayor sea dicho porcentaje, mayor será el porcentaje de necrosis sufrido por las células (Figura 19).

$$\% \text{ Liberación de LDH} = 100 \times \frac{\Delta DO/\text{min Sob.}}{\Delta DO/\text{min Total}}$$

$$\Delta DO/\text{min Total} = \Delta DO/\text{min Cél.} + \Delta DO/\text{min Sob.}$$

Figura 19. Fórmula para el cálculo del porcentaje de liberación de LDH. ΔDO = diferencia de absorbancia de NADH (sustrato).

2.3.3. MEDIDA DE LA ACTIVIDAD ANTI-APOPTÓTICA

Como ya se ha mencionado en el apartado 2.1.3.1. de la Introducción, uno de los procesos de muerte celular programada más importantes que ocurren en las células de la penumbra isquémica es la apoptosis. Y una de las enzimas clave en la cascada de activación de la apoptosis es sin duda la caspasa-3, por lo que la actividad de esta enzima es directamente proporcional al grado de apoptosis sufrido por las células. Así, los compuestos de ensayo que sean neuroprotectores frente a apoptosis serán capaces de disminuir la actividad caspasa-3.

Para la medida de la actividad de la caspasa 3, se utilizó un método basado en la capacidad que presentan las caspasas para romper la secuencia peptídica DEVD (Asp-Glu-Val-Asp). La *N*-acetil-DEVD-7-amino-4-metilcumarina (Ac-DEVD-AMC) es un sustrato fluorogénico sintético para la caspasa-3 que contiene la misma secuencia de aminoácidos que uno de sus sustratos más importantes, la poli-ADP ribosa polimerasa (PARP) (Morales et al., 2014). El sustrato tetrapeptídico puede usarse para identificar y cuantificar la actividad de la caspasa-3 de células apoptóticas. Cuando el sustrato Ac-DEVD-AMC se trata con caspasa-3 pura activa o con lisados de células apoptóticas, la enzima fragmenta el tetrapéptido entre el Asp y la AMC, liberando, de este modo, la fluorogénica AMC (Poreba et al., 2013). La AMC liberada es monitorizada en un espectrofluorímetro con una λ de excitación de 380 nm y una λ de emisión de 430-460 nm. Los lisados de células apoptóticas que contienen caspasa-3 activa producen una emisión considerablemente mayor que los lisados de células no apoptóticas.

Las células SH-SY5Y se cultivaron en placas de 48 pocillos a una densidad de $1-1,5 \times 10^5$ cells/well, y se sometieron a IR, O/R o condiciones basales, como se ha descrito

anteriormente. Tras los tratamientos pertinentes se eliminó el medio de cultivo y las células adheridas a los pocillos se lavaron dos veces con PBS frío y después se lisaron a 4 °C con un tampón Tris/HCl pH 8.0, 20 mM EDTA y 0,5% Triton X-100. Una vez obtenidos los lisados, se sometieron a centrifugación a 13000 rpm durante 10 min.

Posteriormente se midió la actividad caspasa empleando el sustrato fluorogénico *N*-acetil-L- α -aspartil-L- α -glutamil-L-valil-N-(4-metil-2-oxo-2H-1-benzopiran-7-il)-L- α -asparagina (Ac-DEVD-AMC, BD Biosciences PharMingen™), empleando un mínimo de 50 μ g de proteína intracelular, cuantificada previamente mediante el método de Bradford (Vicente et al., 2006). Se añadieron 20 μ M del péptido fluorogénico en un volumen final de 150 μ L con tampón de ensayo (20 mM HEPES, 10% glicerol, 2 mM ditioneitol a pH 7,5) a cada una de las muestras, y se midió la producción de AMC fluorescente usando un espectrofluorímetro de placas FL600 de Biotek, con una $\lambda_{\text{excitación}} = 380$ nm, y una $\lambda_{\text{emisión}} = 460$ nm. En el ensayo se incluyeron, como controles, células no tratadas con los compuestos a estudiar (basal) y mezcla de reacción en ausencia de células (blanco). Tras restar la fluorescencia del blanco a la de cada muestra, los resultados se expresaron como unidades arbitrarias de fluorescencia (AFU)/h/ μ g proteína.

2.4. Medida de la actividad antioxidante

Las especies reactivas de oxígeno (ROS) son particularmente difíciles de detectar debido a sus vidas medias muy cortas. Los primeros estudios acerca del estrés oxidativo tropezaban con el inconveniente de tener que emplear medios de detección escasamente sensibles, por lo general, basados en el empleo de sondas inespecíficas. En la actualidad existe una amplia variedad de técnicas de detección de ROS y sondas que permiten su detección, tanto en células vivas, como en lisados.

La detección de la formación de ROS se puede llevar a cabo en mitocondrias aisladas o en células intactas. En la mayoría de los casos, la formación de ROS se refiere a la liberación de ROS a partir de mitocondrias aisladas, porque la mayoría de los métodos actuales detectan ROS en el medio de incubación (Adam-Vizi & Chinopoulos, 2006).

El ROS primario producido en la mitocondria es el radical anión (o anión) superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$), que tiene una permeabilidad limitada a la membrana mitocondrial interna. En la

matriz mitocondrial, la Mn^{2+} superóxido dismutasa (SOD-2) convierte $O_2^{\cdot-}$ en H_2O_2 , que difunde fuera del orgánulo. Para medir la generación de ROS en células intactas hay que tener en cuenta que una gran cantidad del H_2O_2 liberado por la mitocondria es eliminado por el sistema citosólico del glutatión (Adam-Vizi & Chinopoulos, 2006). Alternativamente, el H_2O_2 puede ser también eliminado por la catalasa y sólo la fracción de H_2O_2 que escapa a los mecanismos de eliminación se libera al medio y está disponible para los ensayos. Por ello, es recomendable una detección más directa de ROS usando sondas que son permeables a la membrana mitocondrial y reaccionan con el anión superóxido en el sitio mismo de su producción. Ejemplos de estas sondas son la 2',7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato (H_2DCFDA) y la dihidroetidina (DHET), que se vuelve fluorescente al reaccionar con ROS y emite radiación a 645 nm (Figura 20).

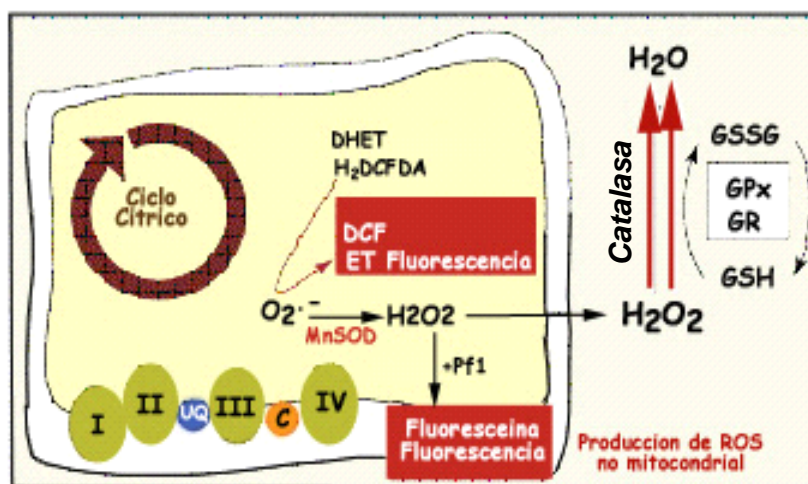


Figura 20. Detección de ROS en células intactas. El $O_2^{\cdot-}$ es transformado en la matriz mitocondrial en H_2O_2 por la Mn^{2+} SOD, que difunde fuera del orgánulo y puede ser detectado. Una gran proporción del H_2O_2 liberado es eliminado por la acción secuencial de la glutatión reductasa (GR) y la glutatión peroxidasa (GPX) que implica la conversión de glutatión reducido (GSH) a oxidado (GSSG); y otra proporción de H_2O_2 es eliminado por la catalasa, siendo la pequeña porción restante la única medible. Para la detección de $O_2^{\cdot-}$ se pueden emplear sondas como la dihidroetidina (DHET) que emite fluorescencia, o la sonda 2',7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato (H_2DCFDA), no fluorescente. Modificada de Adam-Vizi & Chinopoulos, 2006.

En nuestro caso, hemos utilizado como sonda la dihidroetidina (DHET; Molecular Probes), pues se mostró más específica para el anión superóxido que la H_2DCFDA (Piotrowska et al., 2019; Kim & Xue, 2020; Chung & Duchon, 2022).

Los ensayos se llevaron a cabo en placas de 48 pocillos sembradas con células de la línea SH-SY5Y a $1-1,5 \times 10^5$ cells/well. Tras someter las células a la isquemia experimental (OGD), o mantenidas como controles, se llevó a cabo el tratamiento de las mismas durante 3 h en condiciones de IR (IR3h) o de control (C-IR) con los compuestos de ensayo, mantenidas en un incubador a 37°C en condiciones de normoxia. Al finalizar ese tiempo, se añadió en cada pocillo la cantidad de sonda fluorescente DHET suficiente para llegar a una concentración final de $20 \mu\text{M}$ en el ensayo, e inmediatamente se procedió a la lectura de fluorescencia en espectrofluorímetro (FL600, Microplate Fluorescence Reader, Biotek). Las medidas se tomaron cada 30 segundos durante 15-20 min, utilizando una longitud de onda de excitación de 530 nm y seleccionando como longitud de onda de emisión 645 nm. Las rectas de regresión de fluorescencia (expresada como unidades arbitrarias de fluorescencia (AFU)) se calcularon para cada condición, y las pendientes (a) de las rectas más ajustadas ($y = ax$) se tomaron como índice de la velocidad de producción de $\text{O}_2^{\cdot-}$ (Piotrowska et al., 2019) (Figura 21). Se empleó el nitroprusiato sódico (SNP) a 1 y 2 mM como un control positivo de producción de ROS (Quan et al., 2016).

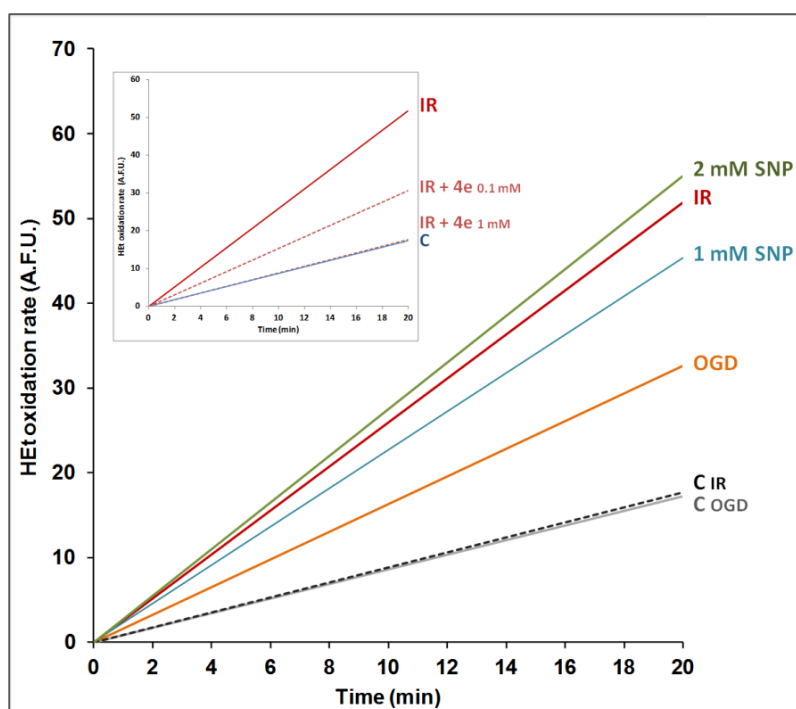


Figura 21. Medida de ROS ($\text{O}_2^{\cdot-}$) en células de neuroblastoma humano SH-SY5Y mediante la sonda fluorescente DHET. Tasa de producción de superóxido inducida por la isquemia y la reperusión experimentales. Las pendientes de las líneas que ajustan los fluorescencia (un índice de la tasa de producción de superóxido), se calcularon

individualmente. Los valores medios de las pendientes se utilizaron para generar una línea teórica mediante la siguiente ecuación: $y = ax$. La figura representa las líneas generadas para la producción de superóxido en células no tratadas y en presencia de OGD, IR y SNP como control positivo. El recuadro representa el efecto de 0,1 y 1 mM de nitrona 4e (no incluida en este trabajo) sobre la producción de superóxido inducida por isquemia experimental (OGD + reperfusión; IR) (Piotrowska et al., 2019).

2.5. Estudio de la autofagia: experimentos de Western Blot

El Western Blot es un importante inmunoensayo que permite la identificación específica y la caracterización de proteínas. El inicio de esta técnica comienza al separar las distintas proteínas, previamente cargadas negativamente, de mezclas complejas en función de su peso molecular mediante un gel de electroforesis y, después, transfiriendo las proteínas separadas a una membrana adsorbente. La membrana entonces se incuba en una solución con el anticuerpo específico que se une a la proteína de interés (anticuerpo primario), se elimina el exceso de anticuerpo que no se ha unido mediante lavado, y a continuación se añade un segundo anticuerpo (anticuerpo secundario), que tiene unida una enzima reportera como es la peroxidasa de rábano (HRP), que reconoce de forma específica una región concreta del anticuerpo primario, en función de la especie en la que se haya generado dicho anticuerpo. Así, se genera un complejo proteína-anticuerpo-anticuerpo-HRP que puede detectarse con quimioluminiscencia, catalizando la oxidación del luminol en presencia de H_2O_2 (Kim, 2017).

2.5.1. PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

Para este tipo de experimentos, se sembraron las células de neuroblastoma humano SH-SY5Y en placas de 6 pocillos, a una densidad de 1-1.5 millones de cells/well, a partir de una mezcla conteniendo 1 millón de células/mL, utilizando los medios descritos en el apartado 2.1. de “Materiales y métodos”. Tras 24 h de crecimiento, se llevaron a cabo los dos procedimientos inductores de daño celular (isquemia experimental o IR y estrés oxidativo u O/R) (ver apartado 2.2.2 de “Materiales y métodos”).

Al comienzo de la IR y/o 10 min antes de añadir la mezcla O/R, se añadieron las nitronas ensayadas (**HBN6**, **HBN5**, **QN6**, **ChN2** y **QN23**), a concentraciones de 10 μ M, dependiendo del experimento. Para probar la validez del protocolo también se realizaron

ensayos de Western Blot con tres compuestos moduladores de la autofagia: el bloqueante del flujo autofágico cloroquina (CQ), a 20 μ M (Merck, Madrid, España), el inhibidor de la autofagia 3-metiladenina (3-MA), a 5 mM (Merck, Madrid, España), y el activador de la autofagia rapamicina (Rapa), a 40 nM (Merck, Madrid, España). Para facilitar la interpretación de los resultados, también se realizaron, de forma paralela, ensayos de viabilidad celular (usando la sonda XTT, ver apartado 2.3.1. de “Materiales y métodos”) con estos tres compuestos moduladores de autofagia, empleando las mismas concentraciones de moduladores de autofagia y compuestos a testar que en los experimentos de Western Blot.

Después de 24 h de IR, o de adición de O/R, se procedió a la extracción de proteínas de las muestras. Para ello se eliminaron los medios de cultivo, se hizo un lavado rápido con PBS muy frío y se añadieron 100 μ L de tampón RIPA por pocillo, conteniendo: 1% Triton, 10 mM Tris, 5 mM EDTA, 50 mM NaCl, 30 mM pirofosfato sódico, 50 mM NaF, 100 μ M ortovanadato, 500 μ M fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) (Sigma-Aldrich, Madrid, España), 5 μ g/L aprotinina (Biochemica, AppliChem, Panreac, Madrid, España), y 0.025 μ g/L leupeptina (Sigma-Aldrich, Madrid, España), a pH 7,4. Posteriormente, se rasparon las células y se recogieron los lisados en tubos Eppendorf de 1 mL etiquetados. A continuación, se centrifugaron las muestras durante 5 min a 13000 rpm en una centrífuga Eppendorf a 4 °C (Centrifuge 5425, Eppendorf, Hamburgo, Alemania) y se desechó el sedimento. Posteriormente, se realizó la determinación de la concentración de proteínas mediante el método de Bradford (Vicente et al., 2006), en 4 μ L de las muestras diluidas a 1/10. Una vez calculadas las concentraciones de proteínas de las muestras, se seleccionó la muestra con menor contenido proteico en 20 μ L, y se calcularon los μ L del resto de muestras conteniendo esa misma cantidad de proteínas, completando su volumen a 20 μ L con el tampón RIPA para llegar a un Vf de 20 μ L. A dicho volumen se le añadieron 20 μ L de una solución con Laemmli 2x y β -mercaptoetanol (50 μ L β -ME cada 950 μ L Laemmli), y se hirvieron durante 5 min a 95 °C en un termobloque (Boeco Bio TDB-100 Dry Block, Heating Thermostat, Alemania), con lo que las muestras quedaron preparadas para su carga en la electroforesis. La cantidad total de proteínas cogida de cada muestra osciló, según los ensayos, entre 15 y 20 μ g de proteínas.

2.5.2. ELECTROFORESIS

Posteriormente se realizó la electroforesis en gel de poliacrilamida y con dodecilsulfato sódico (PAGE-SDS). En esta técnica, las proteínas son sometidas al efecto de agentes reductores que les hacen perder las estructuras secundaria y terciaria, y las mantienen en estado desnaturalizado y cargadas negativamente, para conseguir que se separen únicamente en función de su peso molecular. Así, se prepararon los geles separadores al porcentaje de interés según el peso molecular de las proteínas a detectar (12, 10 u 8% de poliacrilamida, con 1,5 M de Tris-HCl pH 8,8, SDS al 20% (w/v), acrilamida/bis-acrilamida (40%/0,8% w/v), persulfato amónico al 10% y TEMED) y se añadieron a los moldes y, cuando coagularon, se añadió el gel separador al 4% (H₂O, 0,5 M de Tris-HCl pH 6,8, SDS al 20% (w/v), acrilamida/bis-acrilamida (40%/0,8% w/v), persulfato amónico al 10% y TEMED), se posicionaron los peines en los geles y se dejaron gelificar. Una vez gelificados, se quitaron los peines, se cargaron las muestras y se corrió la electroforesis a un voltaje de 120 V, y una intensidad de 3 A, durante 1 h en Running Buffer (Tris 25 mM, Gly 192 mM, SDS 0,1%). En todas las electroforesis, además de las muestras, se corrió un estándar de pesos moleculares de rango ancho Precision Plus Protein Dual Color Standards (Bio-Rad Laboratories, Hércules, CA, USA), que incluye 10 proteínas recombinantes (10 - 250 kDa), 8 bandas teñidas de azul y 2 bandas de referencia rosas (25 y 75 kDa).

2.5.3. TRANSFERENCIA A MEMBRANAS, BLOQUEO E INCUBACIÓN CON ANTICUERPOS

Concluida la electroforesis, las proteínas separadas fueron transferidas a membranas de fluoruro de polivinilideno (PVDF) Hybond-P (Amersham Pharmacia Biotech., Uppsala, Suecia), a 110 V y 3 A, durante 60-70 min, a 4 °C, en tampón de transferencia Towbin (25 mM Tris, pH 8,3, 192 mM glicina, 20% metanol). Se empleó una Mini Trans-Blot® Electrophoretic Transfer Cell (Bio-Rad Laboratories, Hércules, CA, USA) y la fuente de alimentación PowerPac 300 (Bio-Rad Laboratories, Hércules, CA, USA).

A continuación, las proteínas transferidas a las membranas fueron lavadas tres veces, en períodos de 5 min, a temperatura ambiente (TA) y en constante agitación, con tampón TBS (10 mM Tris, pH 7,6, 150 mM NaCl). Seguidamente, las membranas fueron bloqueadas con tampón TTBS (10 mM Tris, pH 7,6, 150 mM NaCl, 0,1% Tween-20) que contenía 3%

de albúmina de suero bovino (BSA), durante 1 hora a TA. El bloqueo de la membrana tiene por objeto evitar posibles uniones no específicas del anticuerpo. El agente bloqueante se une a la membrana, salvo en aquellos sitios donde ya están unidas las proteínas transferidas, y de esta manera bloquea la unión inespecífica del anticuerpo a la membrana.

Una vez bloqueadas las membranas, se lavaron tres veces con abundante TTBS y se incubaron con el correspondiente anticuerpo primario disuelto en TBS con 3% BSA o 5% leche en polvo desnatada, según las instrucciones del fabricante, durante 1 hora a TA (β -actina), o durante una noche a 4 °C (resto de anticuerpos), en todos los casos en lenta y continua agitación.

Transcurrido el tiempo de incubación con el anticuerpo primario, las membranas se lavaron con abundante TTBS, durante 20-30 min (la solución de TTBS se renovaba cada 5 min), antes de incubar con el correspondiente anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa, disuelto en TBS, durante 1 h. Los anticuerpos secundarios fueron anti-ratón cuando el anticuerpo primario había sido monoclonal, o anti-conejo cuando el anticuerpo primario había sido policlonal.

Concluida la incubación con el anticuerpo secundario, las membranas se lavaron durante 30 min con abundante TTBS, y se procedió a la detección de las bandas reactivas al anticuerpo mediante quimioluminiscencia (ECL).

2.5.4. REVELADO DE LAS MEMBRANAS. QUIMIOLUMINISCENCIA (ECL)

El revelado de las membranas se llevó a cabo mediante quimioluminiscencia mejorada de luminol (ECL) mediante la incubación de las membranas con 4 ml del reactivo de revelado SuperSignal West Pico PLUS (Thermo Fisher Scientific, USA). El densitometrado de las señales se llevó a cabo mediante el aparato de documentación de geles VWR (VWR® Gel Documentation Imager Chemi Premium, US), que nos permitió la obtención de imágenes, las cuales fueron posteriormente cuantificadas mediante el software Image J.

Los anticuerpos utilizados para estos experimentos se muestran en la Tabla 2. La mayoría de ellos son de Cell Signaling Technology, y fueron suministrados por Werfen (Barcelona, España).

Todos los materiales mencionados en este apartado se compraron en Thermo Fisher Scientific, USA, salvo los recipientes y materiales para electroforesis que se obtuvieron de Bio-Rad Laboratories (Hércules, CA, USA).

Tabla 2. Colección de anticuerpos primarios y secundarios utilizados en los experimentos de Western Blot.

<i>Western Blot</i>						
<i>Anticuerpo primario</i>	Conc.	Productor	MW (kDa)	Anticuerpo secundario	Conc.	Productor
<i>Anti-β-actina de ratón</i>	1/6000	Cell Signalling	42	Anti-ratón de cabra conjugado con HRP	1/4000	Sigma-Aldrich
<i>Anti-LC3B de conejo</i>	1/1000	Cell Signalling	16, 14	Anti-conejo de cabra conjugado con HRP	1/5000	Sigma-Aldrich
<i>Anti-p62 de conejo</i>	1/1000	Cell Signalling	62	Anti-conejo de cabra conjugado con HRP	1/5000	Sigma-Aldrich

2.6. Experimentos *in vivo*: oclusión permanente de la arteria cerebral media (pMCAO)

Los experimentos *in vivo* de oclusión permanente de la arteria cerebral media (pMCAO) se realizaron en colaboración con el grupo de Investigación Neurovascular, bajo la supervisión del Dr. Ricardo Martínez Murillo (Departamento de Neurobiología Traslacional, Instituto Cajal, CSIC).

Para profundizar en los efectos de las nitronas **HBN6** y **QN6** en la recuperación de los ratones tras el ictus, se administraron 100 mg/kg de **HBN6** y 85 mg/kg de **QN6**, así como vehículo, mediante inyección intraperitoneal a ratones macho de 8 semanas de la cepa C57BL/6J (Harlan) que pesaban 25-30 g. Todos los procedimientos con animales se llevaron a cabo bajo un protocolo aprobado por el comité de ética del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), (Madrid, España, PROEX 116.6/21, Certificado 10/081517.9/21) y fueron realizados de acuerdo con las guías ARRIVE

(<https://arriveguidelines.org/>) y las recomendaciones del Consejo Europeo, para disminuir al mínimo el número de animales necesarios para conseguir significación estadística adecuada.

2.6.1. PREPARACIÓN DE LOS ANIMALES Y PROCEDIMIENTO QUIRÚRGICO DE PMCAO

Para la operación, se indujo anestesia general con 3% de isofluorano (70% N₂O, 30% O₂), seguido de 2% de isofluorano para su mantenimiento. La temperatura tomada por vía rectal se mantuvo a 36 °C con una almohadilla térmica. Tras la craneotomía, se expuso la rama frontal de la arteria cerebral media (MCA) y se procedió a la oclusión permanente por ligadura mediante sutura (Figura 22), como ya ha sido descrito previamente (Pozo-Rodrigálvarez et al., 2012) pero haciendo pequeñas modificaciones, es decir, ocluyendo sólo la rama frontal de la MCA. Este procedimiento generó un volumen de infarto menor que si se hubiera ligado toda la MCA desde el tronco, permitiendo una mejor evaluación del volumen de infarto final entre vehículo (control) y los grupos tratados con **HBN6** y **QN6**, y también reduciendo el tamaño muestral (n). Para asegurar la oclusión arterial completa durante la cirugía, se monitorizó el flujo sanguíneo cortical mediante laser Doppler no invasivo como control de calidad, con la ayuda de un equipo Perimed (PeriFlux System 5000 Stroke Model Monitor, Perimed, Järfälla, Suecia); y los experimentos se realizaron sólo en animales que mostraron al menos un 65% de caída del flujo sanguíneo después de la ligadura, tras una oclusión de la MCA por un tiempo no superior a 15 min.

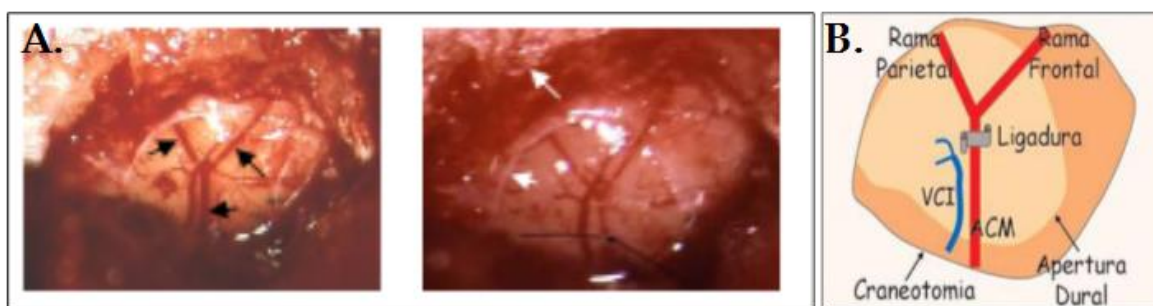


Figura 22. Arteria cerebral media y su bifurcación expuesta tras craneotomía. A. Izquierda: se observa el tronco de la MCA (flecha inferior) y la bifurcación en sus ramas parietal (flecha de la izquierda) y frontal (flecha de la derecha). Derecha: la MCA se ha ligado haciendo un nudo con una sutura. Se aprecia reducción del flujo sanguíneo. Se observa la ventana abierta en el cráneo (flecha blanca superior) y en las meninges (flecha blanca inferior). B. Dibujo esquemático realizado a partir de la imagen anterior para mostrar dónde

se coloca el punto de ligadura (nailon 9/0-10/0) de la MCA, inmediatamente proximal a su división en las ramas frontal y parietal bajo el área de duramadre abierta. Tomada de Prieto-Arribas et al., 2008.

Los experimentos se realizaron sobre cada uno de los siguientes grupos: (a) grupo de simulación de la operación (grupo *sham*, n = 6 animales); (b) grupo sometido a pMCAO e inyección de vehículo, consistente en tampón salino con 29% DMSO (grupo control, n = 6-7); y (c) grupo con pMCAO y **HBN6** o **QN6**, dependiendo del caso, a concentración de 100 mg/kg o 85 mg/kg, respectivamente, y disueltos en vehículo (Grupo tratado, n = 8). La administración de estos compuestos se llevó a cabo 15 min después de la ligadura.

2.6.2. MEDIDA DEL VOLUMEN DE INFARTO MEDIANTE TINCIÓN CON TTC

La determinación del volumen de infarto en los grupos con vehículo y **HBN6** se realizó mediante la tinción con cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolium (TTC) de secciones cerebrales coronales de 1 mm de grosor, obtenidas de los animales operados con ayuda de una *brain matrix* (WPI, Reino Unido), descrito previamente (Pozo-Rodrigálvarez et al., 2012).

Los experimentos compararon el volumen de infarto resultante entre los grupos b) y c), ya que el grupo a) mostraba claramente que el ictus no era debido al procedimiento antes de la oclusión quirúrgica. Los volúmenes de infarto se obtuvieron integrando las áreas infartadas contando los píxeles contenidos en las áreas de interés, y se muestran en mm³. Se tomaron muestras de las secciones coronales de cada lado, y se obtuvieron imágenes gracias a una cámara digital (Pentax Optio S7) con buena resolución para detectar los límites del infarto. Se empleó el software gratuito ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, USA) para el análisis de dichas imágenes. Se utilizó la prueba *t* de Student de dos colas o bilateral para determinar la significación estadística de la diferencia en los volúmenes de infarto entre los ratones tratados con vehículo y con **HBN6**; el valor $P < 0,05$ fue considerado como significativo.

2.6.3. MEDIDA DEL VOLUMEN DE INFARTO MEDIANTE MRI

Las imágenes de resonancia magnética nuclear (MRI) son una de las herramientas más empleadas para el diagnóstico del ictus. Las secuencias de imágenes ponderadas por difusión (WI) se adquirieron en T2 (T2WI) (del inglés, T2-weighted magnetic resonance images), como herramienta para obtener imágenes precisas del edema vascular, con un

límite de resolución de 0,8-1 mm³. Esta información es necesaria para delimitar los límites de la lesión para evaluar la ubicación del edema intracraneal y el patrón de crecimiento. En este estudio, la determinación del tamaño del infarto en ratones tratados con vehículo y QN6 se realizó mediante la toma de imágenes secuenciales de resonancia magnética en cortes cerebrales coronales de 0,8-1 mm de espesor, como ha sido descrito previamente (Pozo-Rodrigálvarez et al., 2012). Los estudios de MRI se realizaron en el centro de asistencia a la investigación (CAI) de imagen BioImaC (Universidad Complutense ICTS BioImagen, Madrid, España), nodo del ICTS ReDIB (<https://www.redib.net/>) utilizando un escáner de resonancia magnética de sobremesa ICON-1T, Bruker BioSpin (GmbH, Ettlingen, Alemania) (Figura 23). El experimento de MRI consistió en la utilización de T2W1 en tres dimensiones (3D) para evaluar el edema vascular, utilizando la técnica de “adquisición rápida con realce de la relajación” (RARE), con un tiempo de repetición (TR) = 2500 s, duración del tren de ecos = 12, intervalo intereco = 18 ms (resultando en un tiempo de eco efectivo (TE) = 90 ms), número de medias = 1, campo de visión (FOV) = 18×18×14 mm. El tamaño de la matriz adquirida fue de 120×120×28 (resolución 0,150×0,150×0,500 mm) y el tiempo total de adquisición fue de ~12 min. Todos los datos de MRI se analizaron con el software de Image J.



Figura 23. Equipo ICON-1T de bioimagen de la UCM. Es un equipo de Imagen de Resonancia Magnética (MRI) de bajo campo que permite la obtención de imágenes de resonancia magnética in vivo y ex vivo. El sistema ICON es un equipo de MRI compacto de alto rendimiento que permite al científico sin experiencia en imagen de resonancia acceder al potencial que tiene esta técnica y generar resultados de imagen cuantitativos para dar respuesta a cuestiones biológicas in vivo. La MRI es una técnica utilizada habitualmente en clínica, y por tanto, los resultados obtenidos con el mismo en rata y ratón son completamente escalables y traducibles al hombre ya que muchas aplicaciones clínicas, secuencias y enfoques de IRM-Clinico pueden realizarse en el ICON. Imagen tomada de

<https://cai.ucm.es/bioimagen/infraestructuras/2-bruker-icon-1t/113/>

Todos los métodos *in vivo* descritos se llevaron a cabo de acuerdo con guías y regulaciones relevantes ([Chamorro et al., 2020](#); [Chamorro et al., 2023](#)).

2.7. Análisis estadístico

Los datos de efecto neuroprotector y capacidad antioxidante se expresaron como media \pm error estándar de la media (SEM) de los resultados obtenidos en al menos 3 experimentos independientes realizados sobre cultivos celulares distintos, cada uno realizado por triplicado. Las comparaciones estadísticas entre las diferentes condiciones experimentales se llevaron a cabo mediante el análisis de la varianza de una vía (one-way ANOVA), seguido del test de comparaciones múltiples de Holm-Sidak cuando los análisis de varianza fueron significativos. Un valor $P < 0,05$ se consideró estadísticamente significativo.

Las curvas dosis-respuesta para la estimación de las EC_{50} y los valores de actividad máxima se calcularon mediante una regresión ponderada no lineal por análisis de mínimos cuadrados, usando curvas logísticas de cuatro parámetros ($f1 = \min + (\max - \min) / (1 + (x/EC_{50})^{-\text{pendiente}})$), empleando para ello el programa SigmaPlot v.12 (Systat Software INC., 2012).

Los análisis de correlación lineal (ecuaciones de línea recta y coeficientes de correlación (r) y análisis estadísticos de las ecuaciones de regresión lineal) se realizaron mediante el test de correlación de Pearson (Coeficiente de correlación de producto-momento), llevado a cabo mediante el programa SigmaPlot v.12 (Systat Software INC., 2012).

Para el estudio de MRI *in vivo*, la significación estadística se evaluó mediante una ANOVA de dos vías seguida por un test post hoc de Bonferroni para comparar las parejas de puntos experimentales (** $P < 0,01$).



Resultados

IV. RESULTADOS

1. Efecto neuroprotector y antioxidante de las homo-bis-nitronas

Los resultados correspondientes al efecto neuroprotector y antioxidante de las **homo-bis-nitronas** (estructuras en Figura 12) corresponden al **artículo científico publicado** por nuestro grupo de investigación ([Chamorro et al., 2020](#)).

1.1. Efecto neuroprotector frente al daño mitocondrial

La alteración en la cadena de transporte de electrones mitocondrial es uno de los primeros eventos moleculares que ocurren en el ictus y en la CI, lo que conlleva una expansión de la muerte celular y del tejido dañado como consecuencia de la formación de ROS. Con el fin de imitar ese tipo de proceso molecular en condiciones experimentales, se probó el efecto que tenían las **HBNs** sobre la muerte celular inducida por oligomicina A y rotenona, inhibidores de los complejos mitocondriales V y I, respectivamente. Para ello, se empleó el test de viabilidad XTT con el objetivo de detectar la actividad metabólica de las células SH-SY5Y. Basándonos en trabajos previos en nuestro laboratorio (García-Font et al., 2016; Piotrowska et al., 2019a; Jiménez-Almarza et al., 2019), se seleccionaron las condiciones experimentales óptimas para el estudio y se probó el efecto neuroprotector de las **HBNs 1-9** a diferentes concentraciones (0,1-1000 μM), añadidas 10 min antes de la administración de O10 μM /R30 μM (O/R), empleando **PBN** como molécula de referencia.

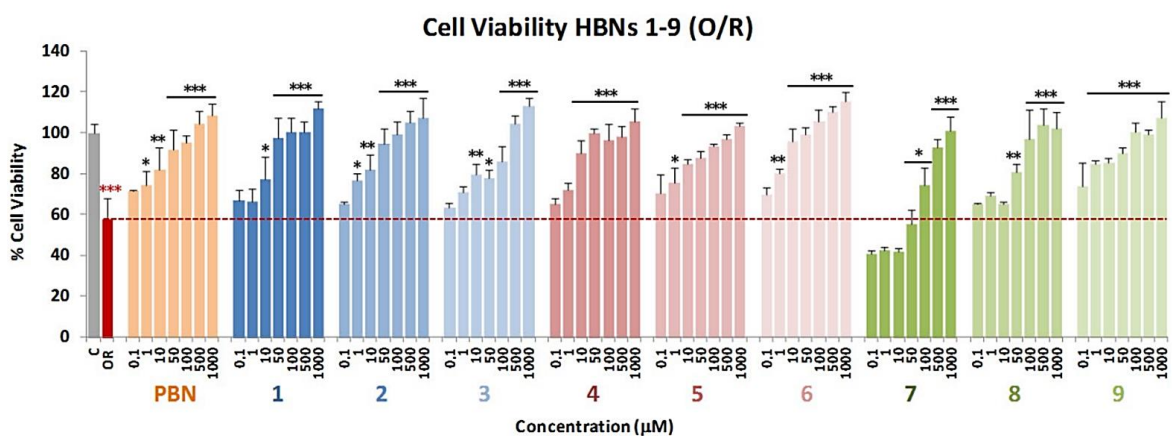


Figura 24. Efecto neuroprotector de las HBNs 1-9 en la viabilidad celular de células de neuroblastoma humano SH-SY5Y con O/R. Las barras muestran el porcentaje de viabilidad celular tras el tratamiento con O10/R30 en ausencia o presencia de HBNs 1-9 o PBN, a concentraciones de 0,1-1000 μM . Los valores representan la media \pm SEM de tres experimentos, cada uno de ellos realizado por triplicado.

RESULTADOS

La estadística compara el efecto de O/R en el control (C) (rojo ***) o el efecto de los diferentes compuestos tras O/R (24h) frente a O/R en ausencia de compuestos (**negro). La estadística de los resultados se analizó mediante el test estadístico de ANOVA de una vía, seguida de un test de comparaciones múltiples de Holm-Sidak. *P < 0,05; **P < 0,01; ***P < 0,001.

Como se muestra en la Figura 24, tras el tratamiento con O/R durante 24 h se observó una inhibición en la viabilidad de las células de neuroblastoma de un $42,31 \pm 4,43\%$ (media \pm SEM). Este efecto fue revertido totalmente con la incubación de las células en presencia de las **HBNs 1-9** y **PBN**, de manera dosis-dependiente. El estudio del efecto neuroprotector, considerando como el 100% de neuroprotección la diferencia entre la viabilidad celular de los controles de 24 h ($100 \pm 4,75\%$; media \pm SEM; n = 20) y O/R ($57,69 \pm 10,46\%$; media \pm SEM; n = 16), reveló que las nitronas más potentes fueron las **HBNs 4-6**, es decir, aquellas de estructura *meta-*. A partir de estos resultados, se realizaron y analizaron las curvas dosis-respuesta de los distintos compuestos, en el rango de 0,1-1000 μ M, y se calcularon las concentraciones efectoras medias o EC₅₀ y las actividades neuroprotectoras máximas (MNA) de cada uno de ellos, que se muestran en la Tabla 3.

Los valores de EC₅₀ calculados en la Tabla 3 siguen el siguiente orden, de más eficaces en neuroprotección a menos:

HBN5 \leq **NAC** \leq **HBN6** \leq **HBN4** \leq **HBN3** \leq **HBN2** \ll **HBN9** \leq **HBN8** $<$ **HBN1** \leq **PBN** \lll
HBN7.

Por su parte, la MNA fue bastante similar en todos los casos, sin mostrar diferencias significativas entre cada compuesto, por lo que podríamos concluir que, comparando los valores de EC₅₀, las nitronas **HBN4-6**, que tienen los dos grupos nitrona en posición *meta-*, demostraron poseer los mejores efectos neuroprotectores, seguidos por las **HBN2-3** con grupos en posición *para-*, y por último las **HBN8-9**, con los motivos nitrona en posición *orto-*. El elevado efecto neuroprotector ejercido por las **HBN4-6** supera al efecto neuroprotector de **PBN** (EC₅₀ = $81,21 \pm 14,39 \mu$ M) y es de un orden muy similar al de **NAC** (EC₅₀ = $5,16 \pm 1,60 \mu$ M).

Tabla 3. Efecto neuroprotector de las HBNs 1-9 y NAC después del tratamiento con O/R en células de neuroblastoma humano SH-SY5Y.

	HBN	R	Neuroprotection (EC ₅₀ ± SEM), μM	P < (PBN)	P < (HBN6)	Maximal activity (Mean ± SEM), %	P < (PBN)	P < (HBN6)
p-HBNs (1-3)	1	Me	62.15 ± 18.18	ns	***	116.13 ± 9.52	ns	ns
	2	tert-Bu	21.07 ± 5.30	***	ns	129.86 ± 8.81	ns	ns
	3	Bn	18.72 ± 3.02	***	ns	126.98 ± 14.88	ns	ns
m-HBNs (4-6)	4	Me	16.56 ± 3.33	***	ns	118.05 ± 8.19	ns	ns
	5	tert-Bu	4.15 ± 1.48	***	ns	108.56 ± 7.42	ns	ns
	6	Bn	5.56 ± 1.09	***	-	136.17 ± 6.64	ns	-
o-HBNs (7-9)	7	Me	176.58 ± 15.09	***	***	109.44 ± 4.40	ns	ns
	8	tert-Bu	58.62 ± 2.86	**	***	106.69 ± 3.62	ns	ns
	9	Bn	45.32 ± 7.48	**	**	123.40 ± 7.05	ns	ns
	PBN	-	81.21 ± 14.39	-	***	143.47 ± 9.29	-	ns
	NAC	-	5.16 ± 1.60	***	ns	113.39 ± 5.87	ns	ns

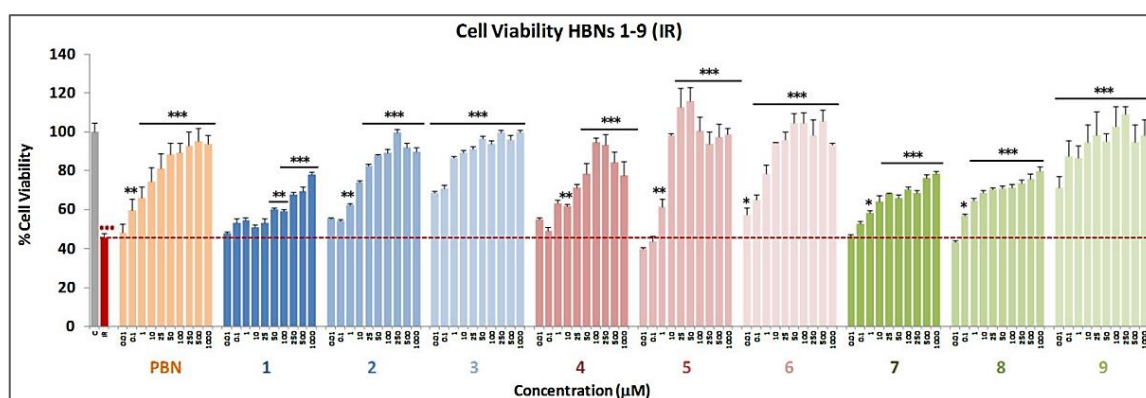
La estimación de los valores de EC₅₀ y de actividades máximas (en porcentaje de neuroprotección) fueron calculados por una regresión ponderada no lineal de mínimos cuadrados utilizando curvas logísticas, como se describe en la sección 2.7. del apartado III "Materiales y métodos". Los valores representan las medias ± SEM de tres experimentos, cada uno realizado por triplicado, a partir de los cuales se calcularon los valores de EC₅₀ y de actividades máximas. El análisis de los datos se llevó a cabo con el programa SigmaPlot v.12, y se empleó la ANOVA de una vía para obtener las diferencias estadísticamente significativas de las HBN1-9 respecto a PBN o respecto a HBN6, y fueron significativas cuando P ≤ 0,05. Las estadísticas comparan las diferencias con PBN o HBN6 a *P < 0,05, **P < 0,01 y ***P < 0,001 (ANOVA de una vía, seguida de un test de comparaciones múltiples de Holm-Sidak). ns = no significativo.

Desde el punto de vista de la relación estructura-actividad (SAR) cabe destacar que, dentro del mismo grupo de HBNs (*para-*, *meta-* u *orto-*), aquellas que poseen como sustituyente N-Bn o N-*t*-Bu en el átomo de nitrógeno del grupo nitrona, presentaron una mayor neuroprotección.

1.2. Efecto neuroprotector frente a privación de oxígeno y glucosa (OGD)

El efecto neuroprotector de las HBNs 1-9 se evaluó en el modelo *in vitro* de privación de oxígeno y glucosa (OGD) seguida de reperusión (IR) durante 24 h. Los compuestos se ensayaron a concentraciones de entre 0,01 y 1000 μM durante la IR. Tras 4 h de OGD se produjo una disminución en la actividad metabólica celular de un 50-80%, observándose una ligera recuperación tras 24 h de IR de un 38-61% (49,29 ± 3,26%; expresado como media ± SEM; n=16). Los compuestos HBNs 1-9 (Figura 25) fueron capaces de revertir parcial o totalmente la disminución en la viabilidad celular inducida por IR de forma

dosis-dependiente. Estos datos revelaron que **HBN5** y **HBN6** fueron las *bis*-nitronas más potentes. Por otro lado, entre las **HBNs 1-3**, **HBN2** y **3** indujeron un 60% de neuroprotección independientemente de la dosis. Por su parte, las **HBNs 7-9** dieron una buena curva dosis-respuesta, la mejor neuroprotección obtenida a concentraciones de 25-100 μM . De hecho, **HBN9** consiguió unos niveles de neuroprotección muy similares a los de **HBN5** y **HBN6**. En resumen, en los experimentos de viabilidad celular tras OGD, **HBN5** y **HBN6** mostraron el mejor perfil neuroprotector, en la línea de los resultados obtenidos con los inhibidores de la ETC mitocondrial.



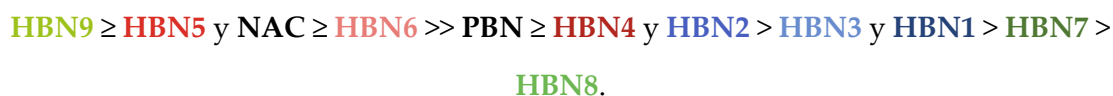
*Figura 25. Efecto neuroprotector de las HBNs 1-9 en la viabilidad de células de neuroblastoma tras OGD (4h) y reperusión (24 h) (IR 24 h). Las barras muestran el porcentaje de viabilidad celular después de IR, con o sin HBNs 1-9 y PBN a concentraciones de entre 0,01-1000 μM . Los valores corresponden a la media \pm SEM de tres experimentos, cada uno de ellos repetido por triplicado. La estadística compara el efecto de IR con su control (rojo^{***}) o el efecto de los diferentes compuestos tras IR frente a IR en ausencia de compuestos (negro^{***}). La estadística de los datos se analizó por una ANOVA de una vía, seguida de un test de comparaciones múltiples de Holm-Sidak. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$.*

En base a estos resultados tan prometedores, se determinaron las EC_{50} y actividades neuroprotectoras máximas para las **HBNs 1-9**, comparando con **PBN** y **NAC**, tras OGD e IR 24 h. Como se muestra en la Tabla 4, los valores de EC_{50} , ordenados de menor a mayor y, por tanto, de mayor a menor nitrona neuroprotectora, fueron:

$$\text{HBN3} \leq \text{HBN6} \leq \text{HBN5} \leq \text{NAC} < \text{HBN9}$$

Todos ellos mejores significativamente que **PBN**, que a su vez sería similar a **HBN2**, **HBN7** y **HBN8** \leq **HBN4**. Por último, el compuesto con un efecto neuroprotector menos eficaz y por tanto, con valor de EC_{50} más elevado con diferencia, fue **HBN1**, con $227,07 \pm 15,92 \mu\text{M}$.

Sin embargo, y basándonos en las actividades neuroprotectoras máximas observadas, el orden sería el siguiente:



Es por ello que, aunque **HBN3** tenga el valor de EC₅₀ más bajo de todos, también consigue una actividad neuroprotectora máxima muy reducida, por lo que su poder neuroprotector podría ser similar al de **HBN9**, al que le ocurre lo contrario, ya que presenta una actividad máxima muy elevada, pero a una EC₅₀ más alta. Ambos compuestos demostraron una capacidad neuroprotectora media menor a la de **HBN6** y **HBN5**, ambos con EC₅₀ bastante reducidas y altos valores de actividad máxima.

Tabla 4. Efecto neuroprotector de las HBNs 1-9, PBN y NAC tras OGD e IR en células de neuroblastoma humano SH-SY5Y.

	HBN	R	Neuroprotection (EC ₅₀ ± SEM), μM	P < (PBN)	P < (HBN6)	Maximal Activity (Mean ± SEM), %	P < (PBN)	P < (HBN6)
p-HBNs (1-3)	1	Me	227.07 ± 15.92	***	***	68.55 ± 3.96	*	***
	2	tert-Bu	45.09 ± 4.73	ns	***	77.82 ± 2.46	ns	***
	3	Bn	0.78 ± 0.09	**	ns	69.01 ± 0.87	*	***
m-HBNs (4-6)	4	Me	38.85 ± 4.05	ns	**	78.21 ± 2.23	ns	***
	5	tert-Bu	1.70 ± 0.18	**	ns	113.31 ± 4.69	***	ns
	6	Bn	1.24 ± 0.23	**	–	104.07 ± 3.06	**	–
o-HBNs (7-9)	7	Me	20.36 ± 1.21	ns	*	68.28 ± 2.13	**	***
	8	tert-Bu	20.58 ± 4.66	ns	*	55.43 ± 3.49	***	***
	9	Bn	10.14 ± 0.66	*	*	120.41 ± 6.63	***	ns
	PBN	–	42.01 ± 5.41	–	**	82.54 ± 6.23	–	**
	NAC	–	2.58 ± 0.91	**	ns	110.30 ± 2.81	**	ns

La estimación de los valores de EC₅₀ (en μM) y de las actividades máximas (en porcentaje de neuroprotección) se realizaron mediante una regresión ponderada no lineal de mínimos cuadrados empleando curvas logísticas, como se menciona en la sección 2.7. del apartado III de “Materiales y métodos”. Los valores son las medias ± SEM de tres experimentos, cada uno de ellos repetido por triplicado. El análisis estadístico de los datos se llevó a cabo mediante el programa SigmaPlot v.12, usando una ANOVA de una vía seguida de un test de comparaciones múltiples de Holm-Sidak para obtener la significación estadística de las HBNs respecto a PBN o a HBN6. Las diferencias fueron estadísticamente significativas cuando P ≤ 0,05 (*P < 0,05; **P < 0,01; ***P < 0,001; ns = no significativo).

Desde el punto de vista de la SAR, es importante destacar que: (a) las nitronas más neuroprotectoras, **HBN3**, **HBN6** y **HBN9**, poseen un grupo N-bencilo en el nitrógeno de los motivos nitrona; (b) **HBN9** posee dos motivos nitrona en posición *orto*-; y (c) la

posición relativa *meta*- de los motivos nitrona en los compuestos **HBN5** y **HBN6** es la distribución que más favorece el efecto neuroprotector. De hecho, la neuroprotección demostrada por **HBN5** y **HBN6** es muy similar a la de **NAC** ($EC_{50} = 2,58 \pm 0,91 \mu\text{M}$), una molécula muy estudiada en cuanto a sus capacidades neuroprotectoras.

1.3. Efecto de las HBNs frente a necrosis y apoptosis inducida por OGD

Durante el ictus isquémico tiene lugar un daño tisular masivo producido por necrosis, donde las membranas de las células necróticas se rompen o se permeabilizan significativamente (ver apartado 2.1.3.2. de “Introducción”). En estas circunstancias, la LDH, una enzima citosólica soluble, atraviesa fácilmente la membrana permeabilizada y permite determinar el grado de necrosis ocurrido en el experimento de OGD comparando la actividad LDH extracelular frente a la intracelular.

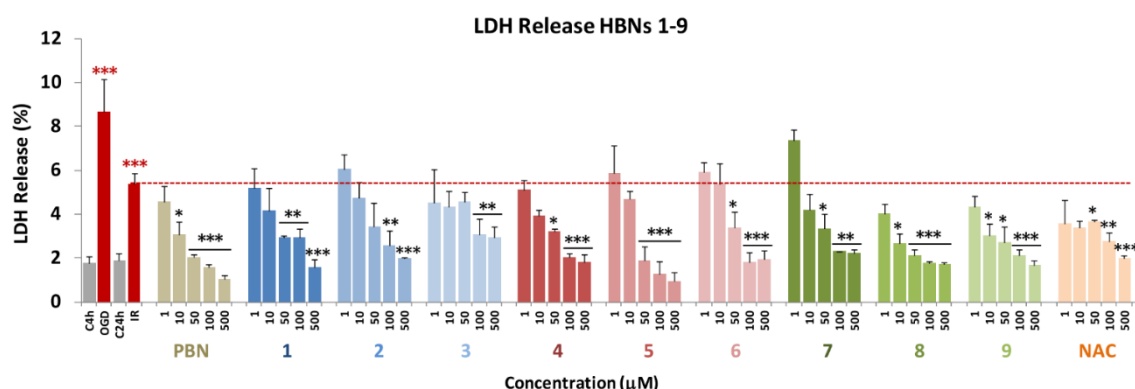


Figura 26. Efecto de las HBNs 1-9 en la liberación de LDH en células SH-SY5Y tras IR. Las barras muestran el porcentaje de liberación de LDH tras 4 h de OGD y 24 h de IR, sin (IR) o con tratamiento con HBNs 1-9, PBN y NAC, a concentraciones de 1-500 μM . Los valores son la media \pm SEM de 3 experimentos, cada uno repetido por triplicado, y la estadística compara el efecto de OGD e IR con sus respectivos controles, C4h y C24h (rojo^{***}) o el efecto de los distintos compuestos tras IR respecto a IR (negro^{***}). Se analizó la estadística de los datos mediante una ANOVA de una vía, seguida de un test de comparaciones múltiples de Holm-Sidak. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$.

De esa manera, tal y como se aprecia en la Figura 26, a partir de los valores obtenidos de la medida de liberación de LDH en células de neuroblastoma tras 4 h de OGD, seguidas de 24 h de IR y en presencia de **HBNs 1-9**, **PBN** y **NAC** de 1-500 μM , se pudo concluir que todas las **HBNs**, a excepción de **HBN3**, **PBN** y **NAC**, indujeron una reducción muy significativa de la liberación de LDH, llegando al 100% de inhibición de dicha liberación. Desde el punto de vista de la SAR, los compuestos con los grupos nitrona en posición

para- (HBNs 1-3) demostraron, en general, una menor potencia para disminuir el efecto necrótico que las nitronas con los grupos nitrona en posición *meta-* (HBNs 4-6), mientras que la presencia de los grupos nitrona en posición *orto-* (HBNs 7-9) aumenta considerablemente los efectos anti-necróticos de los compuestos, siendo HBN8 y HBN9 fueron las *bis*-nitronas más eficientes. No obstante, todas las HBNs exhibieron una potencia inhibitoria de la liberación de LDH, muy similar a la de PBN y NAC, lo que supone que la estructura de *bis*-nitrona favorece el efecto anti-necrótico de base.

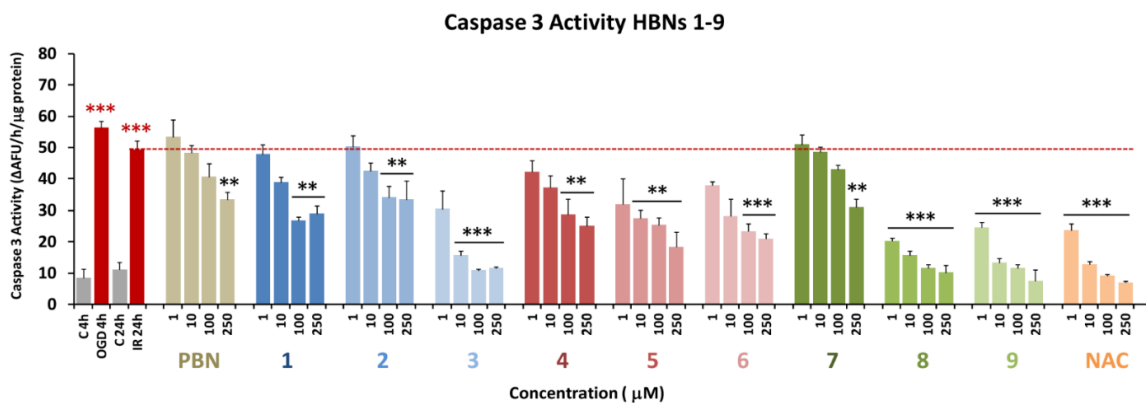


Figura 27. Efecto de las HBNs 1-9 en la actividad de la caspasa-3 en células de neuroblastoma SH-SY5Y tras IR. Las barras muestran la actividad de la caspasa-3 expresada como Δ AFU/ μ g proteína/min tras 4 h de OGD y/o 24 h de IR sola o con 1-250 μ M de HBNs 1-9, PBN y NAC. Los valores son las medias \pm SEM de tres experimentos, cada uno repetido por triplicado, y la estadística compara el efecto de OGD e IR con sus respectivos controles (C4h y C24h, respectivamente) (rojo***) o el efecto de diferentes compuestos tras el tratamiento en IR frente a IR sola, en ausencia de compuestos (negro***). Los datos fueron analizados estadísticamente con una ANOVA de una vía, seguida de un test de comparaciones múltiples de Holm-Sidak. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$. AFU = Unidades Arbitrarias de Fluorescencia.

A continuación, para evaluar la extensión de la muerte celular producida por apoptosis que suele ser la principal forma de muerte durante la CI en la zona de la penumbra, se determinó la actividad de la caspasa-3 usando la sonda fluorescente Ac-DEVD-AMC, que genera AMC fluorescente tras la hidrólisis. Tras 4 h de OGD, seguidas de 24 h de IR en presencia de 1-250 μ M de HBNs 1-9, PBN y NAC, las células se lisaron, se añadió el sustrato fluorogénico y se midió la intensidad de fluorescencia. Tal y como se muestra en la Figura 27, se puede concluir que, en general, todos los compuestos probados protegen menos eficientemente frente a apoptosis que frente a necrosis, ya que no se alcanza el 100% de inhibición de la apoptosis en todos los casos y, además, se necesitan concentraciones

mayores de los compuestos para conseguir el mayor efecto anti-apoptótico. Entre las HBNs *para-*, HBN3 con sustituyente *N*-Bn fue el agente más anti-apoptótico, ya que reducía la actividad de la caspasa-3 a una concentración de 10 μ M. HBN5 y HBN6, así como HBN8 y HBN9, también demostraron una potente actividad anti-apoptótica, siendo las HBNs *orto-* HBN8 y HBN9, con sustituyentes *N*-*t*-Bu y *N*-Bn, respectivamente, más anti-apoptóticas que HBN5 y HBN6, sus homólogas *meta-*. Desde el punto de vista de la SAR, a pesar de que la actividad anti-apoptótica de las HBNs sea inferior a su actividad anti-necrótica, se vuelve a repetir que las posiciones *meta-* y *orto-*, y en concreto con los sustituyentes *N*-*t*-Bu y *N*-Bn, son los que más favorecen la acción anti-apoptótica de los compuestos.

Tanto los efectos anti-apoptóticos como anti-necróticos de las HBNs más potentes (HBN8, HBN9, HBN5 y HBN6) fueron muy similares a los efectos observados para NAC. Sin embargo, el efecto anti-apoptótico de las HBNs fue mejor al efecto determinado en PBN, a pesar de que en cuanto a capacidad anti-necrótica sean similares a su molécula base.

1.4. Neurotoxicidad basal de las HBNs

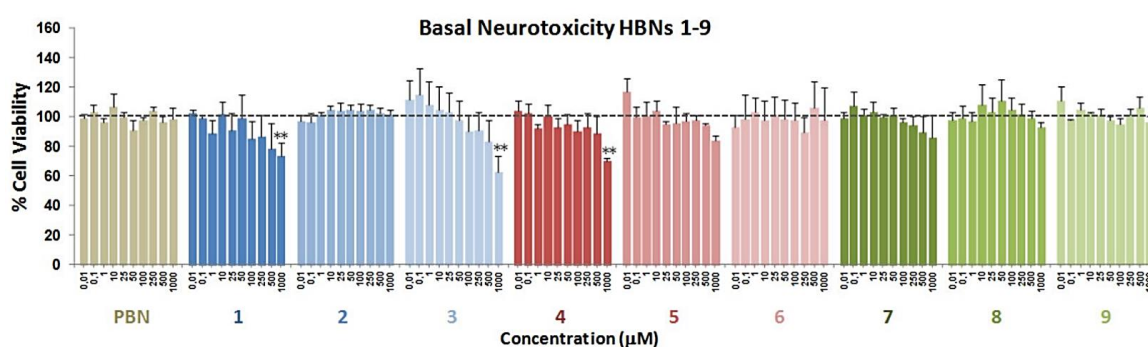


Figura 28. Efecto de las HBNs 1-9 y PBN en la viabilidad de células de neuroblastoma humano SH-SY5Y en condiciones basales. Las barras representan el porcentaje de viabilidad celular en presencia de los compuestos de 0,01-1000 μ M. A la viabilidad de las células sin tratar se le asignó el 100% ($100 \pm 5,52\%$; datos no mostrados). Los valores son la media \pm SEM de cinco experimentos, repetidos por triplicado. La estadística muestra el efecto neurotóxico de los compuestos frente al control a $**P < 0,01$, mediante ANOVA de una vía y test de comparaciones múltiples de Holm-Sidak.

Debido al descenso observado en el efecto neuroprotector de las HBNs 4-6 (Figura 25) y el efecto en la liberación de LDH que tiene HBN3 (Figura 26) a las concentraciones más altas empleadas (250-1000 μ M), se investigó la posible neurotoxicidad basal que posean

las **HBNs**. Los experimentos se llevaron a cabo midiendo la viabilidad celular con XTT, pero sin añadir ningún estímulo tóxico (ni OGD ni O/R). Como se muestra en la Figura 28, la mayor parte de las **HBNs** no presentaron neurotoxicidad a nivel basal, a excepción de **HBN3**, que ve su viabilidad celular reducida a $62,76 \pm 10,57\%$ a 1 mM ($P < 0,001$ frente al 100% de C); de **HBN4**, cuya viabilidad se reduce hasta el $70,24 \pm 1,73\%$ también a 1 mM ($P < 0,001$); y de **HBN1**, con un $73,65 \pm 8,66\%$ a 1mM ($P < 0,001$); que sí presentaron efectos neurotóxicos a la concentración de ensayo más elevada.

1.5. Capacidad antioxidante de las HBNs

Los efectos neuroprotectores de las **HBNs** detectados en los apartados anteriores nos llevaron a investigar si dicha neuroprotección podía ser consecuencia de la capacidad de las nitronas para actuar como antioxidantes y atrapadores de ROS, particularmente del anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$), uno de los más reactivos. Se empleó dihidroetidina (DHET) para la detección de $O_2^{\cdot-}$ tras 3 h de OGD y 3 h de IR, con o sin **HBNs 1-9**, **PBN** y **NAC**. Las concentraciones de los compuestos añadidos durante la IR fueron de 0,1-1000 μ M.

Como se muestra en la Figura 29A, la producción de ROS tras IR ($1,46 \pm 0,19$ AFU/min/150.000 células; media \pm SEM; n=16) fue mayor ($P < 0,05$, ANOVA de una vía) que la producción de ROS tras OGD sola ($1,14 \pm 0,07$ AFU/min/150.000 células; media \pm SEM; n=16). Como era de esperar, las **HBNs 1-9** son capaces de reducir el aumento en la generación de $O_2^{\cdot-}$ producido en la IR parcial o totalmente, de forma dosis-dependiente. A partir de dichos resultados, se crearon y analizaron las curvas dosis-respuesta (ejemplo gráfico mostrado para **HBN6** en la Figura 29B), y se calcularon las EC_{50} y actividades antioxidantes máximas de **HBNs 1-9**, **PBN** y **NAC**, esto último se mostró en la Tabla 5. Los valores de EC_{50} , ordenados de menor a mayor, es decir, de mayor a menor efectividad antioxidante, siguen el siguiente orden:

$$\text{NAC} \leq \text{HBN4} \leq \text{PBN} \leq \text{HBN6} \leq \text{HBN5} < \text{HBN2} \leq \text{HBN1} \ll \text{HBN3} \leq \text{HBN9} \lll \text{HBN8} \\ \lll \text{HBN7}.$$

Como las actividades antioxidantes máximas fueron menores para las **HBNs 1-4** y mayores para **HBN5** y **HBN6**, se puede concluir que, en cuanto a la capacidad antioxidante frente a la producción de ROS inducida por IR, las *bis*-nitronas *meta*- **HBNs 4-6** exhiben las mejores propiedades antioxidantes, seguidas de las **HBNs 1-3** (*para*-) cuyo efecto fue muy similar al de la **PBN**. Sin embargo, el hecho de que las *bis*-nitronas *orto*- **HBN8** y **HBN9** tengan mayor actividad máxima que otras **HBNs**, a pesar de su elevada EC_{50} , las convierte en nitronas con buena capacidad antioxidante, similar a aquella de las nitronas **HBNs 1-3**, las cuales, a pesar de su baja EC_{50} , también tienen las menores actividades máximas (Tabla 5).

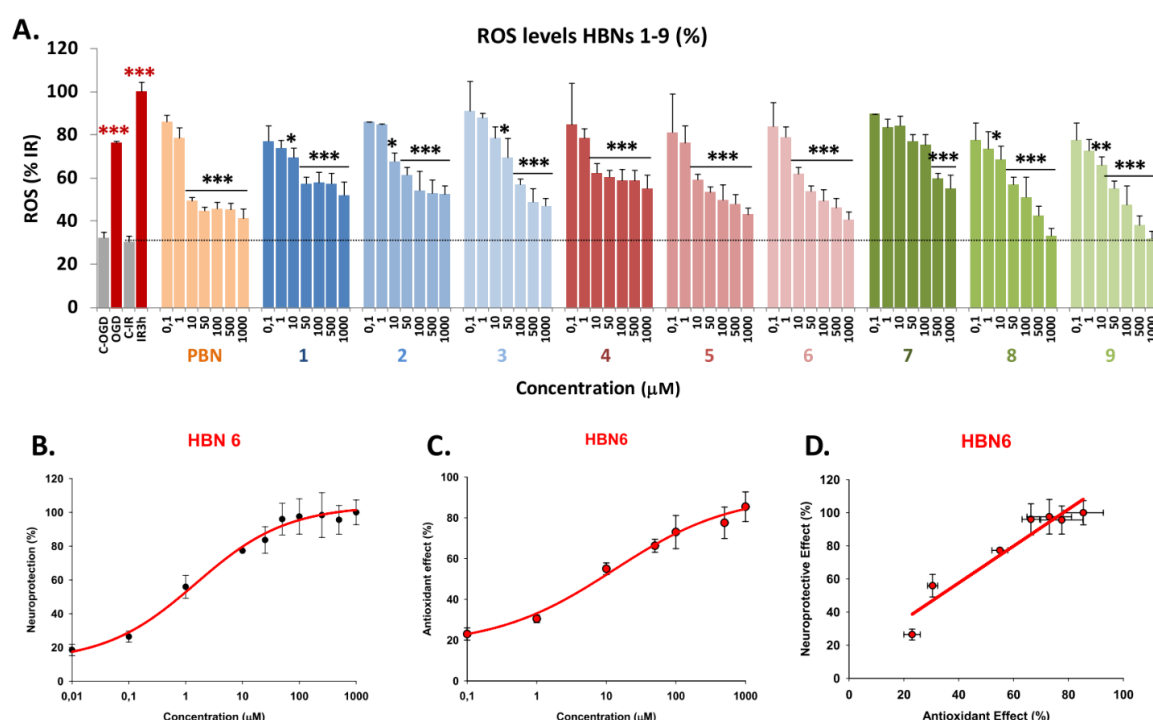


Figura 29. Efectos inhibitorios en la producción de ROS (superóxido) de HBNs 1-9 y PBN en células de neuroblastoma humano SH-SY5Y expuestas a 3 h de OGD y 3 h de IR. (A) Las barras muestran el porcentaje de ROS formado tras OGD e IR, con o sin HBNs 1-9 o PBN, de 0,1-1000 μM. Los valores corresponden a la media ± SEM de tres experimentos, cada una de las muestras repetida por triplicado. Los valores de ROS en condiciones basales obtenidos fueron de $0,42 \pm 0,09$ AFU/min/150.000 células ($n=16$), y la liberación de ROS en IR fue considerada el 100%. La estadística compara el efecto de OGD e IR con sus respectivos controles (rojo^{***}) o el efecto de los distintos compuestos respecto a IR (negro^{***}) a * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$ (ANOVA de una vía, seguida de test de comparaciones múltiples de Holm-Sidak). (B, C) Análisis de los datos de neuroprotección (B) y efecto antioxidante (C) de HBN6 en cuanto a actividad metabólica celular perdida (B) o a aumento en los niveles de ROS inducido por IR (C), llevado a cabo en SigmaPlot v.12 (ver apartado 2.7. de “Materiales y métodos”). (D) Análisis de la correlación entre el efecto neuroprotector y el efecto antioxidante de HBN6. La ecuación lineal, el coeficiente de correlación (r) y la significación estadística del análisis de la regresión se indican en el gráfico. El análisis de la regresión y la estadística se realizaron mediante el test de Correlación de Pearson, realizado en SigmaPlot v.12.

En resumen, y desde el punto de vista de la SAR, de nuevo **HBN5** y **HBN6**, con motivo *N-t*-Bu y *N*-Bn, respectivamente, son las *bis*-nitronas más potentes de toda la serie, tanto a nivel neuroprotector como a nivel antioxidante. Finalmente, a pesar de que los efectos de **HBN5** y **HBN6** fueron similares a los de **PBN**, el hecho de que **PBN** consiga una peor actividad antioxidante máxima de forma significativa ($80,56 \pm 1,48\%$, $P < 0,05$), podemos concluir que ambas nitronas presentan mejor actividad antioxidante como atrapadoras de ROS que **PBN**.

Tabla 5. Efecto antioxidante de las HBNs 1-9, PBN y NAC tras OGD e IR en células de neuroblastoma humano SH-SY5Y.

	HBN	R	Antioxidant effect (EC ₅₀ ± SEM), μM	P < (PBN)	P < (HBN6)	Maximal Activity (Mean ± SEM), %	P < (PBN)	P < (HBN6)
<i>p</i> -HBNs (1-3)	1	Me	13.41 ± 3.49	ns	ns	69.10 ± 3.25	*	***
	2	<i>tert</i> -Bu	9.06 ± 0.65	ns	ns	69.10 ± 3.25	*	***
	3	Bn	38.52 ± 5.25	ns	ns	81.43 ± 2.99	ns	**
<i>m</i> -HBNs (4-6)	4	Me	3.31 ± 0.99	ns	ns	61.38 ± 1.85	**	***
	5	<i>tert</i> -Bu	6.73 ± 0.57	ns	ns	93.48 ± 4.47	*	ns
	6	Bn	5.91 ± 1.09	ns	–	95.78 ± 3.63	**	–
<i>o</i> -HBNs (7-9)	7	Me	248.59 ± 61.03	***	***	81.64 ± 4.45	ns	**
	8	<i>tert</i> -Bu	108.97 ± 9.88	**	**	106.27 ± 7.19	***	ns
	9	Bn	68.68 ± 16.12	*	*	107.53 ± 4.27	***	*
	PBN	–	3.66 ± 0.57	–	ns	80.56 ± 1.48	–	**
	NAC	–	3.23 ± 0.35	ns	ns	112.35 ± 3.32	**	*

La estimación de los valores de (en μM) y actividades antioxidantes máximas (en porcentaje antioxidante respecto a IR) se realizaron por una regresión ponderada no lineal de mínimos cuadrados tras usar curvas logísticas, como se describe en la sección 2.7. del apartado “Materiales y métodos”. Los valores son la media ± SEM de tres experimentos, cada uno de ellos repetido por triplicado. La estadística se obtuvo mediante una ANOVA de una vía, seguida de test de comparaciones múltiples de Holm-Sidak, y se comparan las diferencias de los compuestos respecto a PBN o a HBN6, a * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$, ns = no significativo.

Finalmente, para examinar si el efecto antioxidante de las **HBNs** podía ser el responsable de su efecto neuroprotector, se llevó a cabo un análisis de correlación lineal (Figura 29D) del efecto neuroprotector (Figura 29B) frente a la capacidad antioxidante (Figura 29C), mostrado como ejemplo el caso de **HBN6**. En todos los casos, existe una correlación muy significativa entre ambos efectos, con coeficientes de correlación de Pearson (*r*) que oscilan entre 0,807 y 0,983, con significación estadística de $P < 0,001$ en el caso de las nitronas con sustituyentes *N-t*-Bu y *N*-Bn, y de $P < 0,01$ y $0,05$ para **HBNs** con *N*-Me y **PBN** (datos no mostrados).

En resumen, parece claro que los resultados de los experimentos antioxidantes están en concordancia con el análisis de la neuroprotección, y confirman que **HBN5** y **HBN6** son las mejores *bis*-nitronas y las más balanceadas de la familia de *bis*-nitronas, en términos de neuroprotección (OGD-IR, y O/R) y en términos de capacidad antioxidante. Además, el poder antioxidante de **HBN5** y **HBN6** es muy similar al de **NAC** ($EC_{50} = 3,23 \pm 0,35 \mu\text{M}$), una molécula de gran capacidad antioxidante.

Basados en los prometedores resultados de neuroprotección de estos compuestos, y en concreto de **HBN6**, también se estudió el posible efecto neuroprotector de esta molécula en un modelo *in vivo* de isquemia cerebral.

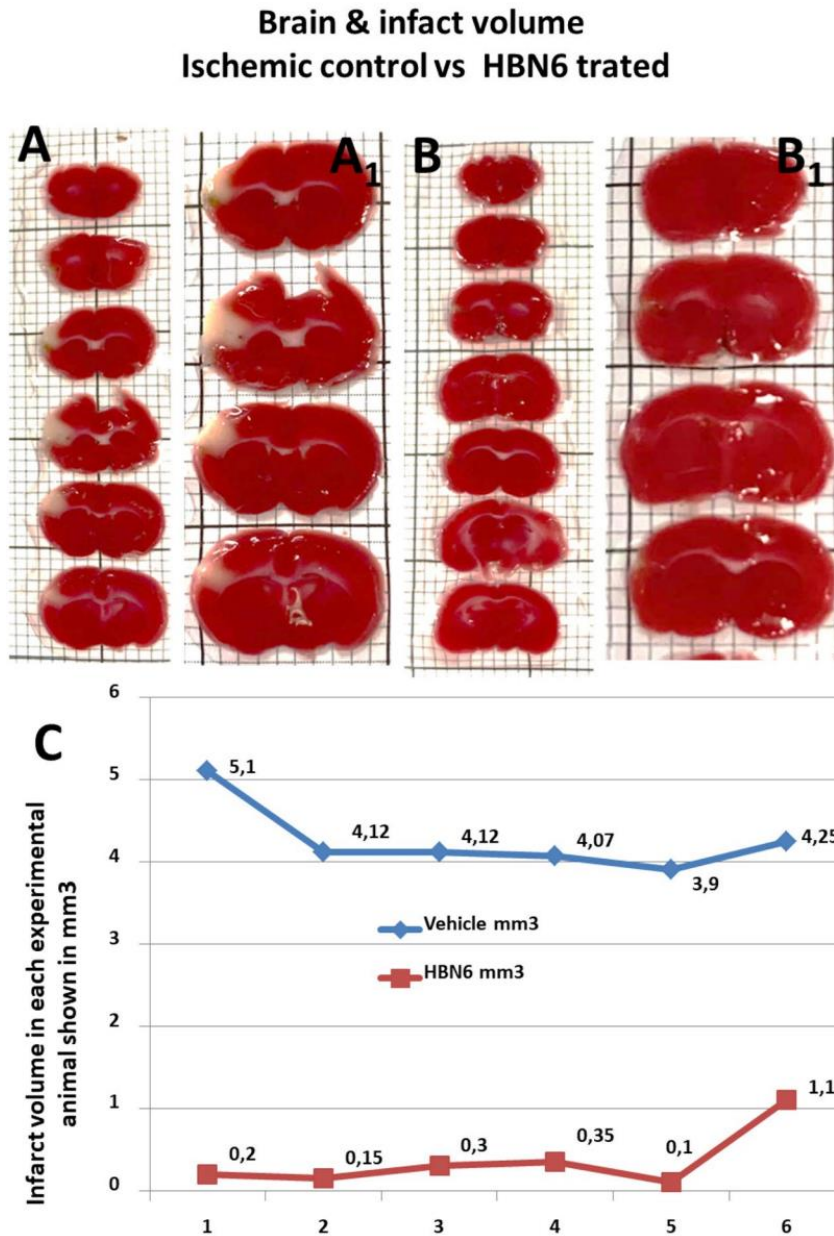
1.6. Contribución de HBN6 a la prevención del daño cerebral

Los modelos de isquemia permanente reflejan las variantes del ictus más frecuentes en pacientes que se encuentran fuera de la ventana terapéutica, o que no responden al rtPA o a la trombectomía quirúrgica. Además, la isquemia permanente se asocia con una gran acumulación de ROS (Murakami et al., 1998), por lo que la oclusión permanente de la arteria cerebral media (pMCAO) es una técnica ampliamente empleada en ratones como modelo de ictus (Colak et al., 2011).

Es por ello que, empleando el procedimiento de pMCAO (Pozo-Rodríguez et al., 2012; ver sección 2.6. del apartado “Materiales y métodos”), se analizó el efecto *in vivo* de **HBN6** para la prevención del daño cerebral isquémico.

Como era de esperar, los animales del grupo de cirugía simulada (*sham*) no mostraron infarto (resultados no mostrados). En contraste, los grupos sometidos a pMCAO mostraron, 48 h después de la oclusión, áreas infartadas en la corteza cerebral (Figura 30). El tamaño medio del área infartada fue de $4,26 \pm 0,2 \text{ mm}^3$ (media \pm SEM; n=6) en animales tratados con vehículo, un valor significativamente mayor al del grupo tratado con **HBN6**, $0,37 \pm 0,15 \text{ mm}^3$ (media \pm SEM) (n=6; $P < 0,001$, analizado por prueba *t* de Student de dos colas suponiendo varianzas iguales) (Figura 30A, B). Considerando que el total de volumen cerebral de los ratones tratados con vehículo fue de $458,42 \pm 18,41 \text{ mm}^3$ y que el de los ratones con **HBN6** fue de $458,26 \pm 26,16 \text{ mm}^3$ (media \pm SEM) (n=6; no significativo, analizado por prueba *t* de Student de dos colas), el área infartada del grupo con vehículo

representa el $0,92 \pm 0,05\%$, y el área del grupo con **HBN6**, el $0,088 \pm 0,03\%$ del volumen cerebral total, respectivamente ($n=6$; $P < 0,001$; t de Student de dos colas). Es decir, que **HBN6** produce una disminución del 90% del volumen de infarto *in vivo*, aproximadamente.



Experimental mice (n=12): 6 vehicle (group b) and 6 HBN6 treated (group c)

Figura 30. El tratamiento con HBN6 reduce el volumen de infarto tras pMCAO, rama frontal, en ratones. Los ratones se sometieron a pMCAO, y los volúmenes de cerebro total y región infartada se midieron 48 h después del inicio de la isquemia, mediante secciones coronales de 1 mm de grosor con tinción TTC. Porciones representativas de las secciones teñidas con TTC se muestran para cada

grupo experimental: b (A, A1, tratado con vehículo) y c (B, B1, tratado con HBN6), mirar la sección 2.6. del apartado III “Materiales y métodos”. (A1) y (B1) muestran de forma aumentada las mismas rodajas de A y B, respectivamente. No se detectaron diferencias en cuanto al volumen total del cerebro entre los grupos b y c. En contraste, los ratones del grupo b (A, A1; buffer salino con 29% de DMSO) revelan un área mucho más amplia de tejido isquémico sin teñir en el neocórtex al compararse con los ratones tratados con HBN6 del grupo c (B, B1; HBN6 100 mg/kg disuelto en el mismo vehículo que el grupo b), los cuales no tienen tejido infartado fácilmente detectable. (C) Datos de 6 animales (n=6) para cada grupo, vehículo (grupo b) y HBN6 (grupo c) administrados intraperitonealmente. Los grupos se compararon mediante una prueba de t de Student de dos colas ($P < 0,001$).

2. Efecto neuroprotector y antioxidante de las homo-tris-nitronas

A partir de los prometedores resultados de las **HBNs**, y en concreto especialmente de las **HBNs meta- HBN5** y **HBN6**, quedando demostrado que la última de ellas tenía un poderoso efecto neuroprotector *in vivo*, protegiendo el tejido cerebral en un 90% frente al daño isquémico, planteamos desarrollar compuestos con tres grupos nitrona, de acuerdo con nuestra hipótesis de trabajo. En efecto, ya que las **HBNs**, con dos grupos nitrona, habían demostrado tener mejores propiedades que **PBN**, un tercer grupo nitrona debería aumentar aún más los efectos antioxidantes y neuroprotectores respecto de **HBNs**.

Los resultados correspondientes al efecto neuroprotector y antioxidante de las **homo-tris-nitronas** (Figura 13) se han publicado recientemente ([Diez-Iriepe, Chamorro et al., 2020](#)).

2.1. Efecto neuroprotector frente al daño mitocondrial

Para imitar el evento del colapso de la ETC mitocondrial, que ocurre de forma precoz en el daño isquémico, se probó el efecto de las **HTNs** sobre la muerte celular inducida por la combinación de neurotóxicos de oligomicina A y rotenona (O/R), inhibiendo así los complejos mitocondriales V y I. Se seleccionaron las condiciones experimentales apropiadas (ver apartado 2.2.1. de la sección de “Materiales y Métodos”), y se probaron los efectos de las **HTNs 1-3** en un rango de concentraciones entre 1-1000 μM , añadidos 10 min antes de la administración de O10 μM /R30 μM , y empleando **PBN** y **NAC** como compuestos de referencia.

En estas condiciones, se evaluó el efecto neuroprotector de los compuestos en cuanto a la viabilidad celular (ver apartado 2.3.1. de “Materiales y métodos”). Tal y como se muestra en la Figura 31A, las tres **HTNs** mostraron un claro aumento en la viabilidad celular, de forma dosis-dependiente. La nitrona que obtuvo el mejor resultado fue **HTN3**, ya que desde concentraciones bajas (10 μM) consigue una viabilidad de más del 70%, e incluso a altas concentraciones sobrepasa los valores de viabilidad de los controles. **HTN1** a bajas concentraciones (1 μM) consiguió más de un 60% de viabilidad celular, pero al igual que le ocurre a **HTN2**, ninguna de ellas llega al nivel de viabilidad celular máximo de **HTN3** a altas concentraciones. Además, en general no se pudieron observar diferencias muy significativas entre las **HTNs**, pero todas ellas mejoran más la viabilidad celular respecto

a la nitrona de referencia, **PBN**, que no llega a alcanzar el nivel de viabilidad celular de los controles a ninguna de sus concentraciones. En cuanto a efecto neuroprotector, donde se aprecian mejor las diferencias entre cada compuesto, se puede observar que todos los compuestos ensayados son bastante dependientes de la dosis empleada (Figura 31B).

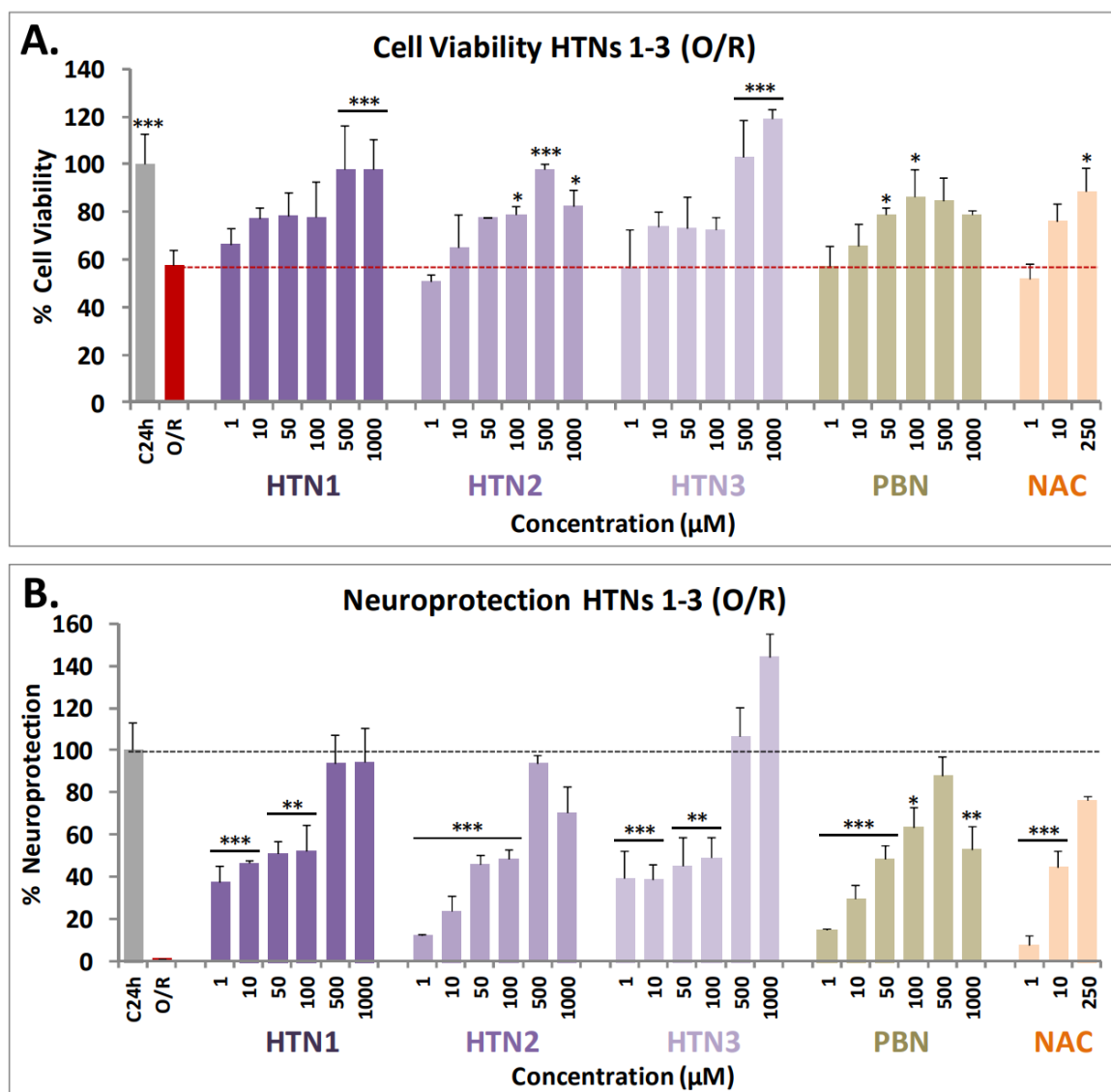


Figura 31. Efecto neuroprotector de las HTNs 1-3, PBN y NAC sobre la actividad metabólica de células de neuroblastoma humano SH-SY5Y tras el tratamiento con oligomicina A 10 μM/rotenona 30 μM (O/R). (A) Las barras muestran el porcentaje de la viabilidad celular tras el tratamiento con O/R, con o sin HTNs, PBN y NAC, a concentraciones entre 1-1000 μM. (B) Las barras muestran el porcentaje de neuroprotección resultante a las mismas concentraciones, considerando como 100% la diferencia entre la viabilidad del control (C24h) y la de O/R. Los valores corresponden a las medias ± SEM de tres experimentos, cada uno realizado en triplicado. Las estadísticas en (A) comparan las diferencias con O/R (línea roja discontinua), y las estadísticas de (B) comparan las diferencias con el C24h (100% de neuroprotección sin nitronas; línea negra discontinua) a *P < 0,05, **P < 0,01, ***P < 0,001, mediante ANOVA de una vía, seguida de un test de comparaciones múltiples de Holm-Sidak. No se muestran las comparaciones estadísticas para valores mayores a los de C24h.

Para evaluar con mejor precisión la capacidad neuroprotectora de estas nitronas, se generaron las curvas dosis-respuesta para cada compuesto y, a partir de ellas, se estudiaron la EC₅₀ y la actividad neuroprotectora máxima (Tabla 6). El orden de potencia neuroprotectora de los compuestos (de más baja a más alta EC₅₀) fue:

$$\text{HTN2} > \text{PBN} \geq \text{HTN3} \geq \text{HTN1}.$$

Sin embargo, en cuanto a actividad neuroprotectora máxima (en %), los datos reflejan una tendencia distinta (de más alto a más bajo % de actividad máxima):

$$\text{HTN3} > \text{HTN1} \geq \text{PBN} \geq \text{HTN2}.$$

Esto indica que el mejor compuesto, en cuanto a que produce neuroprotección a una dosis más baja, es **HTN2**, que tiene grupo *N-t*-Bu como sustituyente; mientras que en cuanto al compuesto que produce un mayor grado de neuroprotección se trata de **HTN3**, a pesar de que lo haga a una dosis más alta que **HTN2**, que tiene grupos *N*-Bn en su estructura. **HTN1**, con sustituyentes *N*-Me, muestra una capacidad neuroprotectora intermedia entre sus análogos **HTN2** y **HTN3**. **HTN2** es similar a **PBN** en cuanto a su EC₅₀ (51,63 ± 4,32 y 65,63 ± 6,89, respectivamente) y su actividad neuroprotectora máxima (83,45 ± 3,54 y 88,18 ± 5,20, respectivamente). Sin embargo, la actividad neuroprotectora máxima de **HTNs 1-3** fue más alta que la de sus correspondientes **HBNs** (**HBN4**, **HBN5** y **HBN6**), también incluidas en la Tabla 6, lo que indica que, teniendo una actividad máxima similar a la mejor HTN (**HTN3**), las **HTNs** demostraron menor capacidad neuroprotectora en presencia de O/R que sus análogas estructurales con dos grupos nitrona, **HBN4**, **HBN5** y **HBN6**, así como **NAC**.

Por ello, podemos concluir que la introducción de un grupo nitrona adicional no parece proveer de un beneficio adicional a la actividad neuroprotectora observada en las **HBNs 4-6**, que poseen dos motivos nitrona, frente a tóxicos de la ETC mitocondrial

Tabla 6. Efecto neuroprotector de HTNs 1-3, HBNS 4-6, PBN y NAC frente a neurotoxicidad inducida por oligomicina A y rotenona en células de neuroblastoma humano SH-SY5Y.

	Compound	Structure (R)	Neuroprotection EC ₅₀ ±SEM (µM)	P< (PBN)	P< (HTN2)	Maximal Activity mean±SEM (%)	P< (PBN)	P< (HTN2)
HTNs (1-3)	HTN1	Me	89.17±7.59	ns	*	94.56±9.21	ns	ns
	HTN2	tert-Bu	51.63±4.32	*	-	83.45±3.54	ns	-
	HTN3	Bn	79.50±7.49	ns	***	125.57±6.19	**	***
	PBN	-	65.63±6.89	-	ns	88.18±5.20	-	ns
m-HBNS (4-6)	HBN4	Me	16.56±3.33 ^[46]	***	***	118.05±8.19 ^[46]	**	**
	HBN5	tert-Bu	4.15±1.48 ^[46]	***	***	108.56±7.42 ^[46]	**	*
	HBN6	Bn	5.56±1.09 ^[46]	***	***	136.17±6.64 ^[46]	***	***
	NAC	-	5.16±1.60 ^[46]	***	***	113.39±5.87 ^[46]	**	**

La estimación de los valores de EC₅₀ (M) y actividades máximas (% neuroprotección) se realizó mediante una regresión ponderada no lineal de mínimos cuadrados usando curvas logísticas, como se describe en el apartado 2.7. de “Materiales y métodos”. Los valores corresponden a la media ± SEM de tres experimentos, cada uno realizado por triplicado.. El análisis de los datos se llevó a cabo mediante el programa SigmaPlot v.12, y en concreto con una ANOVA de una vía para obtener las significaciones estadísticas de las HTNs frente a PBN, y posteriormente un test de comparaciones múltiples de Holm-Sidak.. Las diferencias fueron consideradas estadísticamente significativas cuando P < 0,05, de forma que *P < 0,05; **P < 0,01; ***P < 0,001; ns = no significativo.

2.2. Efecto neuroprotector frente a privación de oxígeno y glucosa (OGD)

El efecto neuroprotector de las HTNs 1-3 se evaluó posteriormente *in vitro*, en el modelo de privación de oxígeno y glucosa (OGD), seguido de 24 h reperusión (IR) empleando el test de viabilidad de XTT. Tras la OGD, se añadieron los compuestos de estudio a concentraciones de 0,01-1000 µM, dejándose actuar durante IR.

Tras las 4 h de OGD, se observó una muerte celular de un 50-80%, mostrando una ligera recuperación en la viabilidad celular tras 24 h de IR de un 38-61% (49,29 ± 3,26; media ± SEM; n = 16; datos no mostrados). En cuanto al efecto de los compuestos de ensayo, todas las HTNs 1-3 fueron capaces de reducir parcial o totalmente la muerte celular inducida por IR, de manera dosis-dependiente, como se aprecia en el nivel de neuroprotección de la Figura 32.

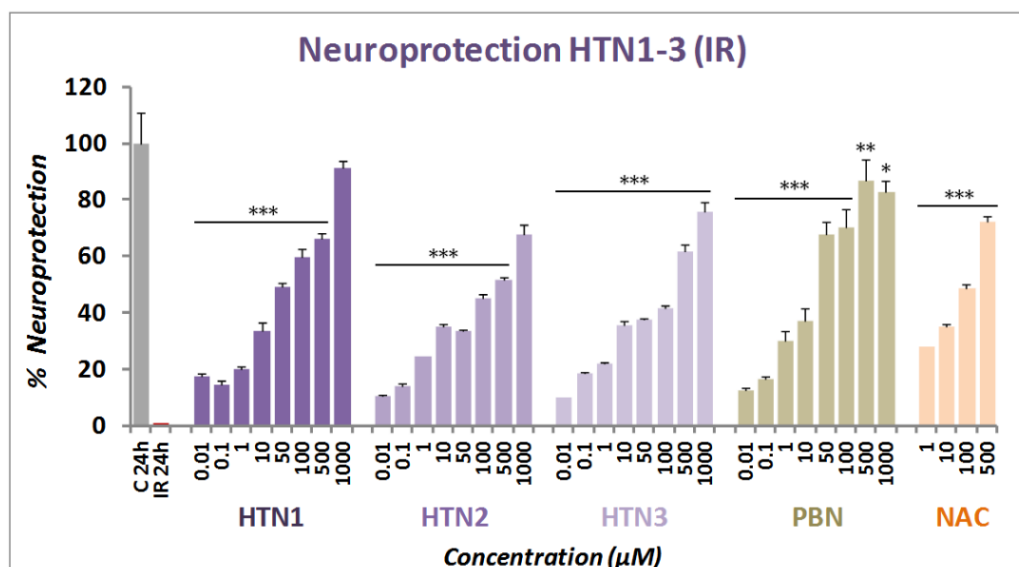


Figura 32. Efecto neuroprotector de las HTNs 1-3 y PBN en la viabilidad celular de células de neuroblastoma humano tras OGD (4 h) y reperusión (24 h). Las barras muestran el porcentaje de neuroprotección a las concentraciones indicadas, considerando el 100% de neuroprotección la diferencia en viabilidad entre el C24h e IR sola. Los valores representan la media \pm SEM de tres experimentos, cada una de las muestras repetida por triplicado. La estadística compara el efecto de cada concentración de HTN, o de PBN, respecto al 100% de neuroprotección, a * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ y *** $P < 0,001$; mediante ANOVA de una vía, seguida de un test de comparaciones múltiples de Holm-Sidak.

Basándonos en estos resultados, se analizaron las curvas dosis-respuesta de las HTNs, PBN y NAC, en el rango de 0,01 a 1000 μ M, teniendo en cuenta el posible efecto neurotóxico a altas concentraciones, tal y como se midió en la sección del análisis de la toxicidad basal (apartado 2.3.1. de “Materiales y métodos”). Como resultado, se determinaron las EC_{50} y actividades neuroprotectoras máximas, recopiladas en la Tabla 7. Así, se puede apreciar que las HTNs 1-3 fueron agentes menos potentes en neuroprotección que PBN, ya de mostraban una EC_{50} significativamente mayor a la de PBN, aunque poseen una mayor actividad máxima que ésta, sobre todo a altas concentraciones. Es por ello que el orden de los compuestos en cuanto a la eficacia neuroprotectora es el siguiente:

$$\text{PBN} > \text{HTN2} \geq \text{HTN3} > \text{HTN1}.$$

En este caso, se apreció significación entre HTN2 y HTN3 respecto a HTN1, pero no hubo diferencias significativas en cuanto al porcentaje de actividad neuroprotectora máxima entre las tres HTNs. Sin embargo, como también ocurría en la neuroprotección frente a O/R, los valores de EC_{50} de las HTNs son mayores a los correspondientes a HBNs 4-6 y

NAC, que tienen una actividad máxima similar (Tabla 7), lo que indica que, también en este modelo de isquemia experimental, la introducción de un tercer grupo nitrona no genera una mejora en la capacidad neuroprotectora con respecto a sus homólogas estructurales de **HTNs**.

Tabla 7. Efecto neuroprotector de las HTNs 1-3, HBNs 4-6, PBN y NAC tras la privación de oxígeno y glucosa y reperusión (IR) en células de neuroblastoma humano SH-SY5Y.

	Compound	Structure (R)	Neuroprotection EC ₅₀ ±SEM (μM)	P< (PBN)	P< (HTN2)	Maximal Activity mean ±SEM (%)	P< (PBN)	P< (HTN2)
HTNs (1-3)	HTN1	Me	108.06±5.94	***	*	96.59±6.82	ns	ns
	HTN2	tert-Bu	87.57±3.87	**	-	115.54±6.73	*	-
	HTN3	Bn	98.14±4.87	**	ns	124.06±7.40	**	ns
	PBN	-	51.13±6.37	-	**	86.32±7.18	-	*
m-HBns (4-6)	HBN4	Me	38.85±4.05 ^[46]	ns	***	78.21±2.23 ^[46]	ns	**
	HBN5	tert-Bu	1.70±0.18 ^[46]	***	***	113.31±4.69 ^[46]	**	ns
	HBN6	Bn	1.24±0.23 ^[46]	***	***	104.07±3.06 ^[46]	*	ns
	NAC	-	2.58±0.91 ^[46]	***	***	110.30±2.81 ^[46]	**	ns

La estimación de los valores de EC₅₀ (μM) y actividad máxima (% neuroprotección) se realizaron con una regresión ponderada no lineal de mínimos cuadrados usando curvas logísticas, como se describe en el apartado 2.7. de “Materiales y métodos”. Los valores corresponden a la media ± SEM de tres experimentos, repetidos por triplicado. El análisis de los datos se llevó a cabo con el programa SigmaPlot v.12, y un ANOVA de una vía seguida de un test de comparaciones múltiples de Holm-Sidak para sacar la significación estadística de las diferencias de HTNs y HBNs respecto a PBN y a HTN2. Dichas diferencias fueron estadísticamente significativas cuando *P < 0,05, **P < 0,01, y ***P < 0,001; ns = no significativo.

Por ello, desde el punto de vista de la SAR, la incorporación de un tercer grupo nitrona en las **HTNs 1-3** con respecto a las **HBNs 4-6**, disminuye significativamente su capacidad neuroprotectora.

2.3. Efecto neuroprotector de las HTNs en muerte celular necrótica y apoptótica inducida por OGD

Para conocer la influencia que pudieran tener las nitronas **HTNs** sobre la muerte celular necrótica temprana en el proceso isquémico, se midió la actividad extracelular de la LDH

y se comparó con su actividad intracelular, determinando así el grado de necrosis sufrido por las células en el experimento de OGD e IR.

Como se muestra en la Figura 33, de los valores obtenidos a partir de la medida de liberación de LDH tras 4 h de OGD y 24 h de IR en células de neuroblastoma, y en presencia de HTNs, PBN y NAC a concentraciones entre 1-1000 μM , se pudo concluir que el compuesto más eficiente fue la HTN3, seguida de HTN2, y por último con diferencia el peor compuesto de la serie en cuanto a poder anti-necrótico es HTN1.

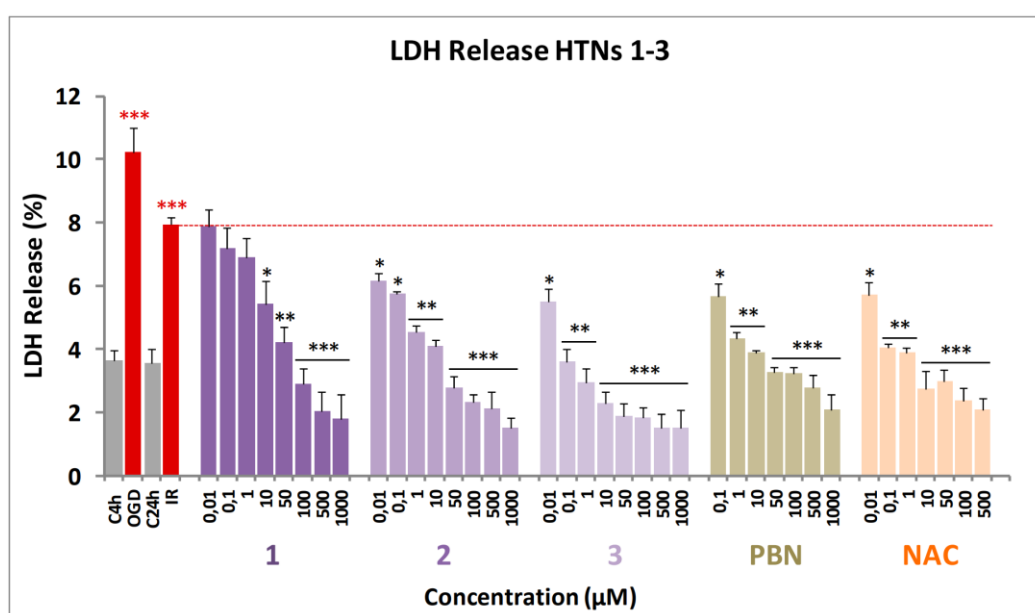


Figura 33. Efecto de las HTNs 1-3 en la liberación de lactato deshidrogenasa en células SH-SY5Y tras isquemia-reperusión. Las barras muestran el porcentaje de liberación de LDH tras 4 h de OGD y 24 h de IR, sin (IR24h) o con la adición de HTNs 1-3, NAC y PBN a concentraciones de 0,01-1000 μM . Los valores corresponden a la media \pm SEM de tres experimentos, cada uno repetido por triplicado. Se compara el efecto de OGD e IR con sus respectivos controles (rojo***) o el efecto de los distintos compuestos durante IR (negro***) frente a IR sola (línea roja punteada). Los datos se analizaron estadísticamente mediante una ANOVA de una vía, seguida de un test de Holm-Sidak, a * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, y *** $P < 0,001$.

Estos resultados se confirmaron con el cálculo de las concentraciones inhibitorias medias (IC_{50}) y las actividades máximas (Tabla 8). En este caso, las HTNs demostraron poseer una actividad máxima muy similar. De acuerdo a los resultados de la tabla, teniendo en cuenta los valores de IC_{50} , HTN3 muestra un mayor poder anti-necrótico, por tener una IC_{50} más baja, que HTN2, y ambas seguidas por HTN1, que mostraba el menor poder anti-necrótico de todas las tris-nitronas. Al comparar con los compuestos de referencia, HTN3 es significativamente más potente que ambos, en concreto 10 y 4 veces más potente que PBN

y NAC, respectivamente. Sin embargo, HTN3 no demostró diferencias significativas respecto a HTN2 (Tabla 8), por lo que también HTN2 tiene un buen efecto anti-necrótico.

Tabla 8. Efecto de las HTNs 1-3, PBN y NAC en la liberación de lactato deshidrogenasa tras privación de oxígeno y glucosa y reperusión en células de neuroblastoma humano SH-SY5Y; cálculo de las IC₅₀ y actividades inhibitorias máximas.

	Compound	R	LDH Release Inhibition IC ₅₀ ± SEM (μM)	P< (PBN)	P< (HTN2)	Maximal Inhibition mean ± SEM (%)	P< (PBN)	P< (HTN2)
	HTNs (1-3)	HTN1	Me	23.34 ± 7.71	ns	**	82.95 ± 7.88	ns
HTN2		tert-Bu	8.49 ± 2.45	***	-	85.21 ± 10.69	ns	-
HTN3		Bn	3.47 ± 0.57	***	ns	82.47 ± 12.64	ns	ns
PBN		-	32.01 ± 8.61	-	***	89.27 ± 11.41	-	ns
NAC		-	13.21 ± 5.49	**	ns	95.60 ± 11.05	ns	ns

La estimación de los valores de IC₅₀ y actividad inhibitoria máxima (%) se realizaron mediante una regresión ponderada no lineal de mínimos cuadrados empleando curvas logísticas, como se describe en el apartado 2.7. de “Materiales y métodos”. Los valores corresponden a la media ± SEM de tres experimentos, repetidos por triplicado. El análisis de los datos se llevó a cabo mediante el programa SigmaPlot v.12, mediante un ANOVA de una vía seguida de un test de comparaciones múltiples de Holm-Sidak, para obtener la significación de las diferencias de HTNs respecto a PBN, o a HTN2. Las diferencias fueron consideradas estadísticamente significativas cuando *P < 0,05, **P < 0,01, ***P < 0,001; ns = no significativo.

Posteriormente, y para evaluar el grado de muerte celular tras la isquemia por apoptosis, empleamos el sustrato Ac-DEVD-AMC. De esa manera, tras 4 h de OGD y añadiendo HTNs 1-3 y PBN a concentraciones de 1-250 μM, seguido de 24 h de IR, las células se lisaron y se añadió el sustrato fluorogénico, midiendo así la actividad de la caspasa-3.

Como se muestra en la Figura 34, en cuanto a los efectos anti-apoptóticos de los compuestos ensayados, HTN3 fue sin lugar a dudas el más potente de todos, no solo de entre las HTNs y por comparación con PBN, sino que también superó incluso el efecto anti-apoptótico de su homóloga bis HBN6, ya que HBN6 sólo consiguió bajar de los 30 AFU/h/μg de proteína a partir de los 100 μM, mientras que HTN3 baja de los 30 AFU/h/μg de proteína a todas sus concentraciones, de 1 μM en adelante (Figura 34). Así, parece claro que desde el punto de vista de la SAR, el sustituyente N-Bn induce mayor actividad anti-apoptótica en las HTNs. Además, de forma muy similar a lo que ocurría con la actividad anti-necrótica, HTN3 es significativamente más anti-apoptótica que PBN, y ampliamente

superior a HTN1, la peor molécula de la serie, que además tuvo un efecto protector frente a la apoptosis muy similar y no significativamente diferente al de la PBN.

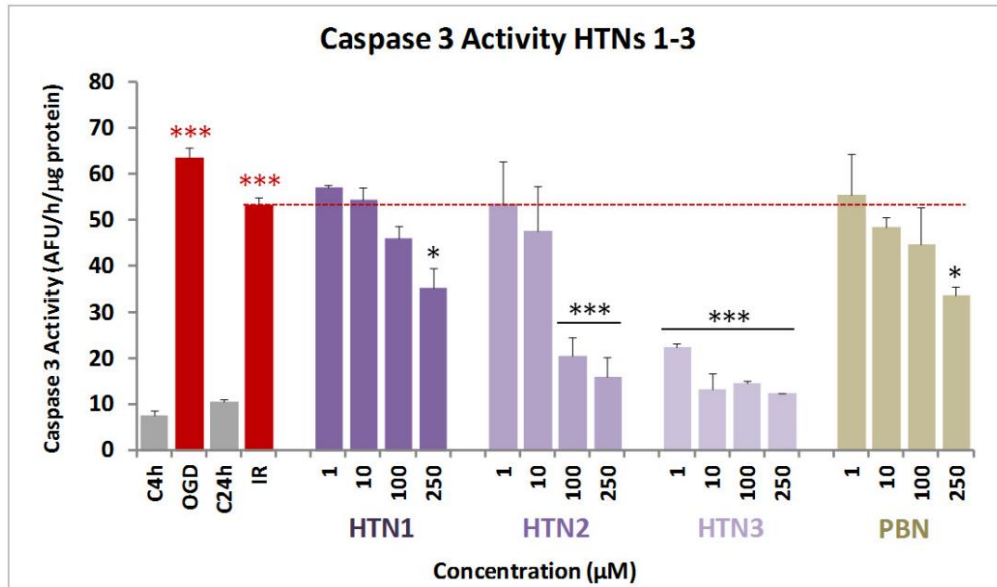


Figura 34. Efecto de las HTNs 1-3 y PBN en la actividad de la caspasa-3, en células de neuroblastoma humano SH-SY5Y tras IR. Las barras muestran el porcentaje de liberación de LDH tras 4 h de OGD y 24 h de IR, sin (IR) o con HTNs 1-3 y PBN a concentraciones entre 1-250 μM . Los valores corresponden a la media \pm SEM de tres experimentos, que se repitieron por triplicado, y se compara el efecto de OGD e IR con sus respectivos controles (rojo***) o el efecto de los distintos compuestos tras IR con IR sola (línea roja punteada), en la ausencia de estos compuestos (negro***). Los datos fueron analizados estadísticamente mediante un ANOVA de una vía, seguido por un test de comparaciones múltiples de Holm-Sidak. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$. AFU = unidades arbitrarias de fluorescencia.

2.4. Neurotoxicidad basal de las HTNs

En base a los resultados obtenidos en los apartados anteriores, a continuación se analizó su posible efecto neurotóxico a nivel basal. Así, se realizó un experimento para la medida de la viabilidad celular con XTT, pero sin añadir ningún tratamiento tóxico. Como se aprecia en la Figura 35, las HTNs 1-3, PBN y NAC no mostraron ningún efecto neurotóxico a nivel basal.

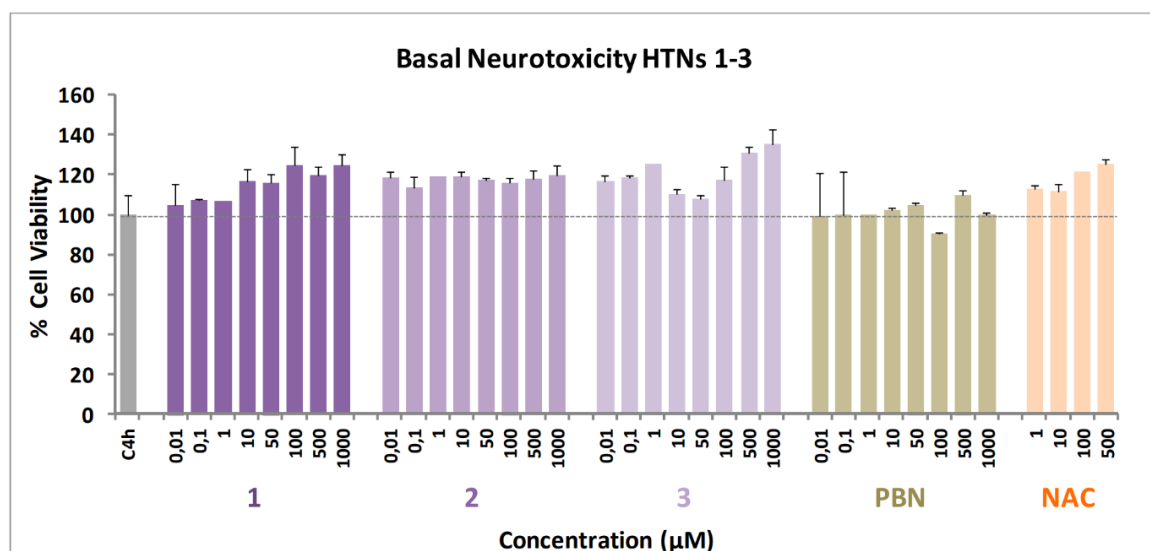


Figura 35. Efecto de las HTNs 1-3, PBN y NAC en células de neuroblastoma humano SH-SY5Y en condiciones basales. Las barras representan el porcentaje de viabilidad celular en la presencia de los compuestos entre 0,01-1000 μM . A la viabilidad celular de las células sin tratar (C4h) se le asignó el 100% de viabilidad ($100 \pm 5.52\%$). Los valores son la media \pm SEM de cinco experimentos, cada muestra repetida por triplicado. No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre el control (línea de puntos negros) y las distintas nitronas (test ANOVA de una vía).

2.5. Capacidad antioxidante de las HTNs

Los resultados mostrados respecto a viabilidad celular, actividad anti-necrótica y anti-apoptótica, en las secciones anteriores correspondientes al efecto neuroprotector de las HTNs, nos llevaron a investigar si dicho efecto de protección de las células nerviosas podía ser consecuencia de su capacidad de actuación como antioxidantes y eliminadores de ROS, particularmente del anión superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$), cuya detección se llevó a cabo usando la sonda dihidroetidina (DHET), tras 3 h de OGD y 3 h de IR, con o sin HTNs 1-3, además de PBN y NAC como moléculas de referencia.

Como se aprecia en la Figura 36, el nivel de producción de ROS tras IR fue mayor a los ROS producidos tras OGD sola, por lo que se consideraron esos niveles de ROS como el 100%. Como era de esperar, PBN demostró ser un agente antioxidante intermedio respecto al resto de compuestos estudiados. De esa forma, en general, las HTNs mostraron un perfil antioxidante muy favorable, siendo las más potentes de ellas HTN2 y HTN3, con un perfil antioxidante similar al de sus contrapartes bis-nitronas HBN5 y HBN6

([Chamorro et al., 2020](#)), ambos superando con creces el poder antioxidante de la madre PBN.

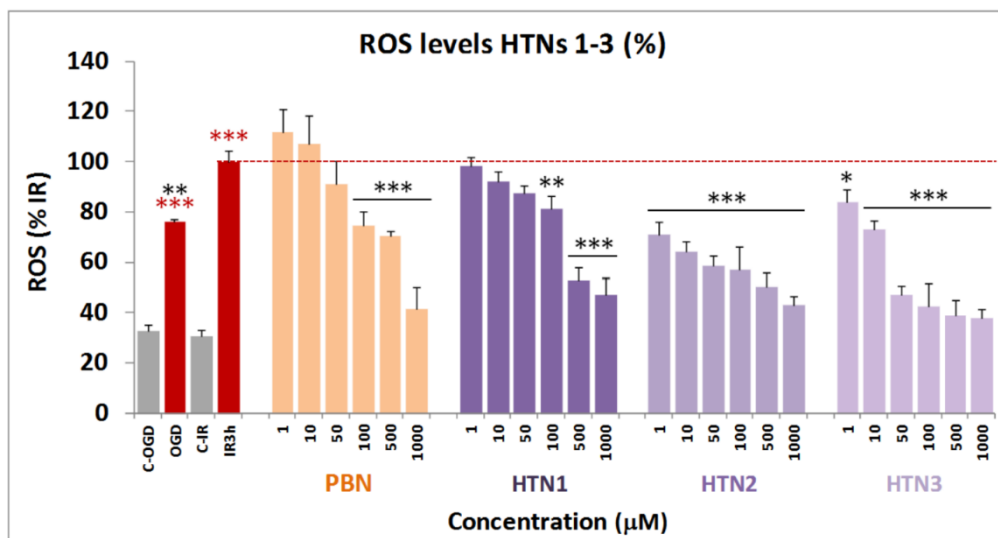


Figura 36. Efectos inhibitorios de las HTNs 1-3 y PBN en la producción de ROS (superóxido) en cultivos de células de neuroblastoma humano SH-SY5Y, expuestos a 3 h de OGD y 3 h de IR. Las barras muestran el porcentaje de ROS formado tras OGD, su control (C-OGD), IR sola, su control (C-IR), o el tratamiento durante IR con los compuestos HTNs 1-3 y PBN a concentraciones entre 1-1000 μM. Los valores corresponden a la media ± SEM de tres experimentos, cada uno repetido por triplicado. El valor de ROS obtenido en IR fue de $1,98 \pm 0,25$ AFU/min/150.000 células, y fue considerado como el 100% de liberación de ROS. La estadística compara el efecto de IR frente a su control (rojo***) o el efecto de los diferentes compuestos frente a IR sola (línea de puntos roja, negro***) a * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, y *** $P < 0,001$ (mediante un ANOVA de una vía y un test de comparaciones múltiples de Holm-Sidak).

El análisis de las curvas dosis-respuesta y los cálculos de los valores de EC_{50} y actividades antioxidantes máximas para las HTNs 1-3, PBN y NAC se muestran en la Tabla 9. Los valores de EC_{50} , de menor a mayor, es decir, de mayor a menor eficacia, siguen el siguiente orden:

$$NAC \leq HTN2 \leq HTN3 < PBN < HTN1.$$

Y en cuanto a sus actividades antioxidantes máximas, fueron inferiores para HTN1 y PBN, y mayores para HTNs 2, 3 y NAC. Es por ello que se pudo concluir que, en cuanto a la capacidad antioxidante frente a la producción de superóxido tras IR, HTN2 y HTN3 exhiben las mejores propiedades antioxidantes, que son bastante similares a la capacidad antioxidante de HBN5 y HBN6, sus homólogas bis-nitronas, respectivamente ([Chamorro et al., 2020](#)), así como al poder antioxidante de NAC.

RESULTADOS

Tabla 9. Efecto antioxidante de las HTNs 1-3, PBN y NAC tras privación de oxígeno y glucosa, con reperusión, en células de neuroblastoma humano SH-SY5Y.

Compound	Structure (R)	Antioxidant effect EC ₅₀ ± SEM (μM)	P< (PBN)	P< (HTN2)	Maximal Activity (mean ± SEM) %	P< (PBN)	P< (HBN2)	
HTNs (1-3)	HTN1	Me	66.61 ± 5.46	***	***	80.43 ± 4.02	ns	**
	HTN2	<i>tert</i> -Bu	5.12 ± 1.23	***	-	93.63 ± 5.64	*	-
	HTN3	Bn	6.77 ± 1.35	***	ns	90.95 ± 2.67	*	ns
<i>m</i> -HBNs (4-6)	HBN4	Me	3.31 ± 0.99 ^[46]	***	**	61.38 ± 2.85 ^[46]	**	***
	HBN5	<i>tert</i> -Bu	6.73 ± 0.57 ^[46]	***	*	96.65 ± 7.38 ^[46]	**	ns
	HBN6	Bn	5.91 ± 1.09 ^[46]	***	*	118.19 ± 3.65 ^[46]	***	**
PBN	-	23.96 ± 5.21	-	***	81.53 ± 4.09	-	*	
NAC	-	3.23 ± 0.35 ^[46]	***	ns	112.35 ± 3.32 ^[46]	***	**	

La estimación de los valores de EC₅₀ (μM) y de las actividades máximas (porcentaje de efecto antioxidante) se realizaron mediante una regresión ponderada no lineal de mínimos cuadrados empleando curvas logísticas, como se describe en el apartado 2.7. de “Materiales y métodos”. Los valores corresponden a la media ± SEM, siendo los valores de EC₅₀ y actividad antioxidante máxima calculados a partir de los datos de 3 experimentos, cada uno repetido por triplicado. La estadística compara las diferencias con PBN o con HTN2, a *P < 0,05, **P < 0,01, ***P < 0,001, ns = no significativo (ANOVA de una vía, seguida de un test de Holm-Sidak).

En resumen, y desde el punto de vista de la SAR, de nuevo fueron HTN2 y HTN3, con sustituyentes *N-t*-Bu y *N*-Bn, respectivamente, las HTNs más potentes, con una capacidad antioxidante similar a la de sus análogos HBN5 y HBN6, y a la de NAC, un potente antioxidante, superando ampliamente la capacidad de eliminación de ROS de la PBN, la molécula madre.

3. Efecto neuroprotector y antioxidante de las bi-fenil-nitronas (BPMNs y BPHBNs)

Tras observar los favorables resultados en capacidad neuroprotectora y antioxidante de las **HBNs** y **HTNs** de las dos secciones anteriores (apartados 1 y 2 de “Resultados”), y dado que ambos tipos de compuestos se han diseñado a partir de **PBN**, que posee un anillo fenilo como eje central de su molécula, también era interesante observar si, añadiendo un segundo grupo fenilo a la estructura central, las moléculas podrían conservar o incluso potenciar sus capacidades neuroprotectoras.

Con ese objetivo, se diseñaron, sintetizaron y, en este trabajo, se evaluó la actividad biológica de las **bi-fenil-mono-nitronas** (**BPMNs 1-3**) y las **bi-fenil-homo-bis-nitronas** (**BPHBN4** y **BPHBN5**) (Figura 14), en el contexto del tratamiento frente a la isquemia cerebral.

Estos resultados se han publicado recientemente ([Chamorro et al., 2021](#)).

3.1. Estudio de neuroprotección frente a la disfunción mitocondrial

Como se indicó previamente en el apartado 1.1. de “Resultados”, se han empleado dos modelos experimentales de daño celular distintos (O/R y OGD-IR).

En primer lugar, se empleó el modelo de O/R para evaluar el efecto de las **BPNs** sobre la viabilidad celular tras este tratamiento. Para ello, se empleó el test XTT ([Chamorro et al., 2020](#)), examinando el efecto neuroprotector de las **BPNs 1-5** a concentraciones crecientes, de entre 0,1-1000 μM , adicionando los compuestos 10 min antes del tratamiento tóxico, empleando a su vez **PBN** y **NAC** como compuestos de referencia a las mismas concentraciones.

Tal y como se muestra en la Figura 37, se observó una reducción en la viabilidad de las células de neuroblastoma humano de un 57% ($43,23 \pm 2,61\%$ de viabilidad celular) tras el tratamiento con O/R durante 24 h. Este efecto fue revertido totalmente con el tratamiento con **BPNs 1-5**, **PBN** y **NAC**, de manera dosis-dependiente. El estudio de neuroprotección, considerando el 100% de neuroprotección como la diferencia entre la viabilidad de C24h

($100 \pm 2.55\%$; $n = 20$) y O/R ($43.23 \pm 2.61\%$; $n = 16$), reveló que la nitrona más potente de todas fue **BPHBN5**.

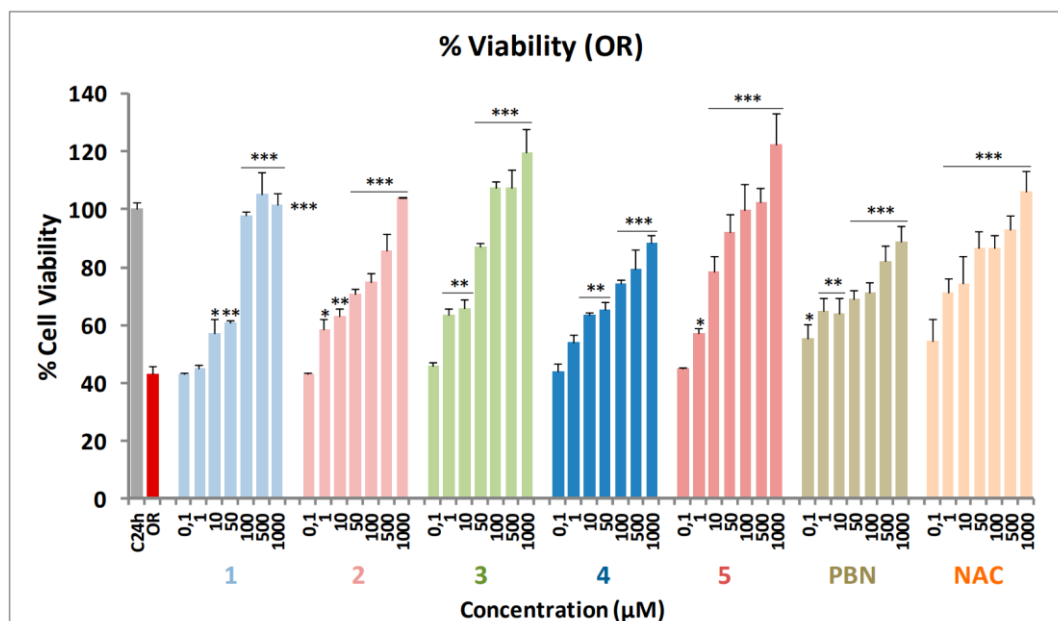


Figura 37. Efecto neuroprotector de las BPNs 1-5, PBN y NAC en la actividad metabólica de las células de neuroblastoma humano SH-SY5Y tras el tratamiento con oligomicina A $10 \mu\text{M}$ y rotenona $30 \mu\text{M}$ (O/R). Las barras muestran el porcentaje de viabilidad celular tras el tratamiento con O/R en presencia o ausencia de BPNs 1-5, PBN y NAC a concentraciones de $0,1$ - $1000 \mu\text{M}$. Los valores corresponden a la media \pm SEM de tres experimentos, cada uno realizado por triplicado. La estadística compara las diferencias entre la condición O/R a $*P < 0,05$, $**P < 0,01$ y $***P < 0,001$ (ANOVA de una vía, y test de comparaciones múltiples de Holm-Sidak).

La Figura 38 muestra el análisis de las curvas dosis-respuesta para las **BPNs 1-5**, comparadas con las de **PBN** y **NAC**, en el rango de $0,1$ - $1000 \mu\text{M}$ (Figura 38A); y los correspondientes valores de EC_{50} y de actividad neuroprotectora máxima calculados a partir de dichas curvas (Figura 38B). El orden en cuanto a EC_{50} , de menor a mayor, es decir, de compuesto más a menos neuroprotector para O/R, es el siguiente:

$$\mathbf{BPHBN5} \leq \mathbf{NAC} \leq \mathbf{BPMN3} \leq \mathbf{BPMN2} \leq \mathbf{BPMN1} \leq \mathbf{BPHBN4} \ll \mathbf{PBN}.$$

Estos resultados indican que todas las **BPNs 1-5** estudiadas tienen mejores efectos neuroprotectores que **PBN** en cuanto a la muerte celular inducida por bloqueantes de la ETC mitocondrial. En cuanto a las actividades neuroprotectoras máximas, solo **BPMN3**, con un sustituyente *N*-Bn, y **BPHBN5**, con dos sustituyentes *N*-*t*-Bu, tuvieron una

actividad mucho más significativa que la de **PBN**, lo que a su vez indica que estas dos nitronas son los agentes neuroprotectores más potentes en este modelo de daño neuronal.

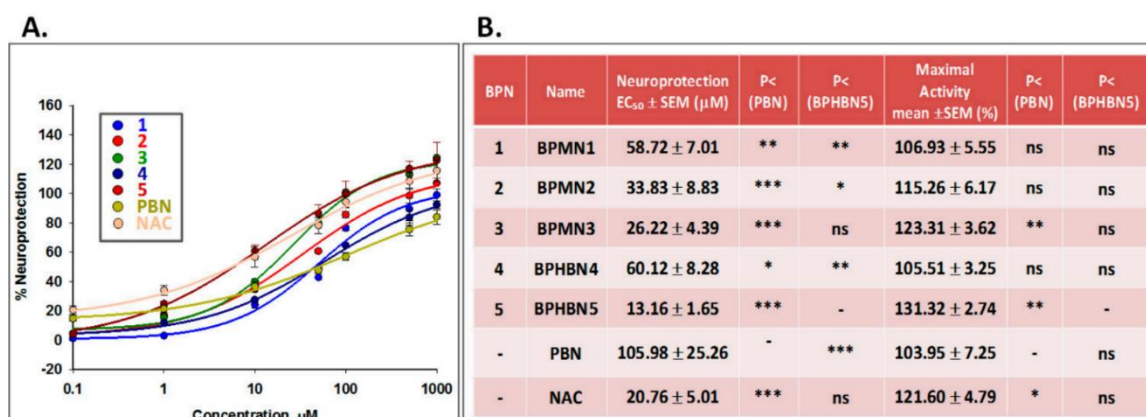


Figura 38. Efectos neuroprotectores de las BPNs 1-5, PBN y NAC frente a muerte celular inducida por el tratamiento con oligomicina A 10 µM y rotenona 30 µM (O/R) en células de neuroblastoma humano SH-SY5Y. (A) Curvas concentración-respuesta mostrando el porcentaje de neuroprotección de los diferentes compuestos a concentraciones entre 0,1-1000 µM. Los ajustes de la curva para determinar los valores de EC₅₀ se llevaron a cabo mediante una regresión ponderada no lineal de mínimos cuadrados, empleando curvas logísticas [f1 = min + (max-min) / (1+(x/EC₅₀) ^ (-pendiente))]. Los datos representan la media ± SEM de tres experimentos, cada uno realizado por triplicado. El análisis de los datos se implementó con el software SigmaPlot v.12. (B) Valores de EC₅₀ y actividad máxima para los distintos compuestos. La estadística compara las diferencias en EC₅₀ o actividad máxima entre los distintos compuestos frente a PBN o BPMN2 a *P < 0,05, **P < 0,01. ***P < 0,001, ns = no significativo.

La elevada neuroprotección que pudimos apreciar para las **BPMN2**, **BPMN3**, y **BPHBN5** supera a la de **PBN**, su molécula madre, y es muy similar a la de **NAC**. Por ello, desde el punto de vista de la SAR, es importante destacar que entre las **BPNs**, aquellas que tienen un *N*-Bn o un *N*-*t*-Bu unido al grupo nitrona muestran un mayor efecto neuroprotector en el modelo de daño mitocondrial.

3.2. Análisis de neuroprotección en un modelo de privación de oxígeno y glucosa (OGD) seguido de reperfusion (IR)

A continuación, se evaluó el efecto neuroprotector de las **BPNs 1-5** en un modelo de OGD seguido de reperfusion de oxígeno y glucosa (IR) ([Chamorro et al., 2020](#); [Diez-Iriepa, Chamorro et al., 2020](#)). Las concentraciones de ensayo fueron de 0,1-1000 µM, añadidas tras OGD y durante IR. Tras 4 h de OGD, se produjo una pérdida de actividad metabólica de un 60% (40,07 ± 2,37% de viabilidad celular, media ± SEM; n = 16), mostrando una

pequeña recuperación de un 20-25% a las 24 h de reperusión ($61,96 \pm 8,56\%$ de viabilidad celular; media \pm SEM; n = 16). Las **BPNs 1-5** fueron capaces de revertir parcial o totalmente la pérdida de actividad metabólica celular inducida por IR de forma dosis-dependiente (Figura 39). Estos datos revelaron que las **BPNs 2, 3 y 5** fueron las nitronas más potentes: entre las **BPMNs**, con un solo grupo nitrona, las **BPMN2** y **BPMN3** fueron las que generaron mejor efecto neuroprotector, con sustituyente *N-t*-Bu y *N*-Bn, respectivamente; y en cuanto a las **BPHBNs**, la más neuroprotectora fue **BPHBN5**. En resumen, en el experimento de OGD, el hecho de que las **BPNs 2, 3 y 5** fueran las mejores protectoras de la capacidad metabólica de las células de neuroblastoma concuerda con los resultados observados con los inhibidores de la ETC mitocondrial.

La Figura 40 reúne el análisis de las curvas dosis-respuesta de las **BPNs 1-5**, comparadas con las de **PBN** y **NAC**, en el rango de 0,01-1000 μ M (Figura 40A) y los correspondientes valores de EC_{50} y actividad neuroprotectora máxima (Figura 40B). Como bien se muestra, el orden de compuestos en función de su EC_{50} , de menor a mayor, es decir, de mayor a menor eficacia neuroprotectora, fue el siguiente:

$$\text{NAC} \leq \text{BPMN3} \leq \text{BPHBN5} \leq \text{BPMN2} < \text{BPMN1} < \text{BPHBN4} \ll \text{PBN}.$$

Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas en cuanto a la actividad neuroprotectora máxima de los distintos compuestos, salvo que se detectó que **BPMN1** y **BPHBN4** (ambos con sustituyente *N*-Me) conseguían una menor actividad neuroprotectora máxima que el resto de compuestos ensayados.

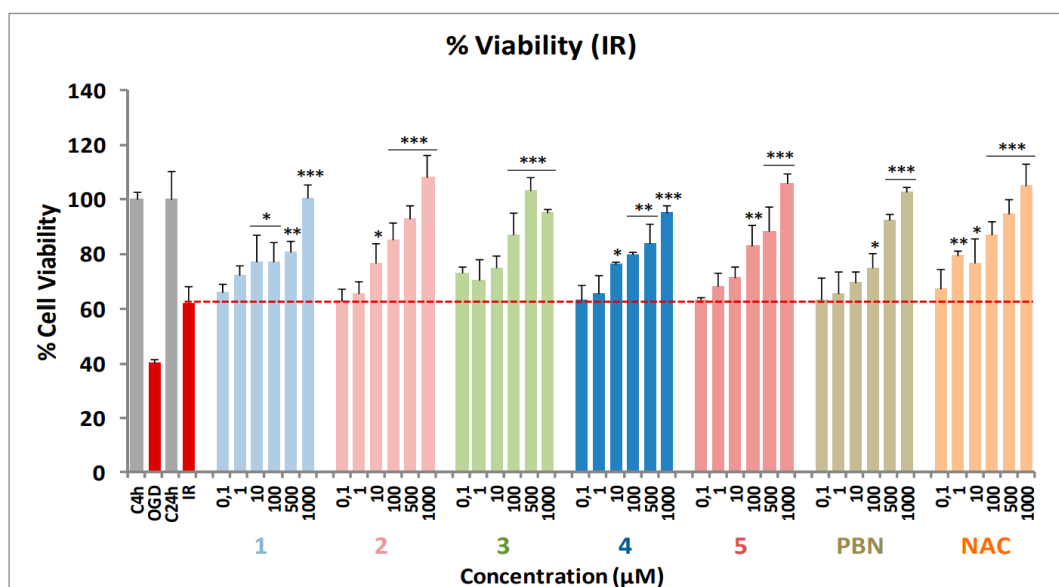


Figura 39. Efecto neuroprotector de las BPNs 1-5, PBN y NAC en la actividad metabólica de células de neuroblastoma humano SH-SY5Y tras 4 h de OGD y 24 h de IR. Las barras muestran el porcentaje de viabilidad celular con, o sin, adición de BPNs 1-5, PBN y NAC durante la IR a las concentraciones de 0,1-1000 μ M. Los valores corresponden a la media \pm SEM de tres experimentos, cada uno repetido por triplicado. La estadística compara las diferencias respecto a IR sola (línea de puntos roja) a * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, y *** $P < 0,001$ (ANOVA de una vía, seguida de test de comparaciones múltiples de Holm-Sidak).

Debido a ello, desde el punto de vista de la SAR, se debe destacar que:

- Las nitronas más neuroprotectoras de este grupo fueron **BPMN2**, **BPMN3** y **BPHBN5**, con sustituyente *N-t*-Bu (**BPMN2** y **BPHBN5**) o *N*-Bn (**BPMN3**) unido al átomo de nitrógeno del grupo nitrona.
- No se encuentran diferencias significativas en cuanto a capacidad neuroprotectora entre las nitronas con un solo sustituyente *N-t*-Bu (**BPMN2**) o dos (**BPHBN5**).
- Los compuestos de peor capacidad neuroprotectora, es decir, la **BPMN1** y la **BPHBN4**, tienen sustituyente *N*-Me, y su capacidad empeora con la adición del segundo grupo *N*-Me, ya que **BPHBN4** es peor que **BPMN1** (Figura 40B).
- La neuroprotección conseguida por las **BPNs 1-5** es mejor que la de PBN, y la capacidad neuroprotectora de las tres mejores nitronas de este grupo es muy similar a la de NAC ($EC_{50} = 17,62 \pm 1,93 \mu$ M).

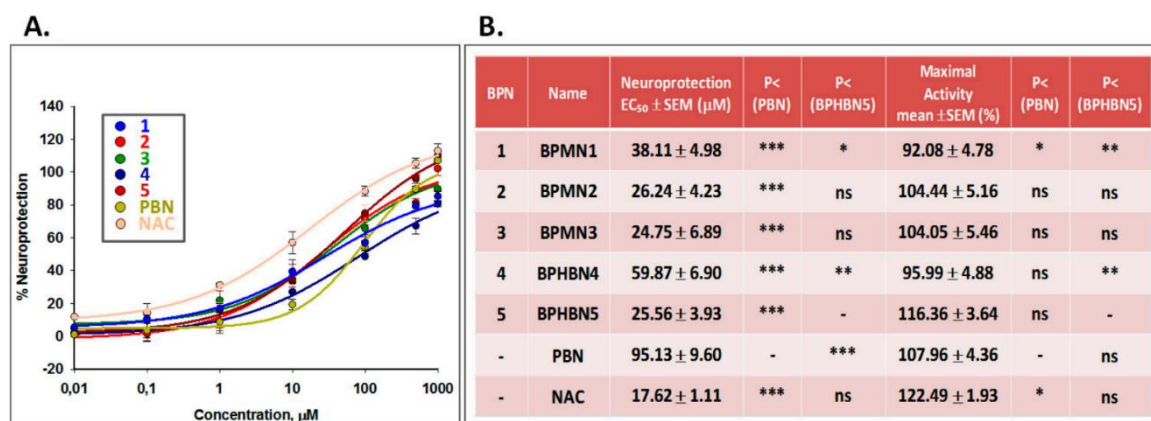


Figura 40. Efectos neuroprotectores de las BPNs 1-5, PBN y NAC frente a la muerte celular inducida por tratamiento de OGD e IR en células de neuroblastoma humano SH-SY5Y. (A) Curvas dosis-respuesta que muestran el porcentaje de neuroprotección alcanzada por los diferentes compuestos a concentraciones entre 0,1-1000 µM. Los ajustes de la curva para determinar los valores de EC₅₀ se llevaron a cabo mediante una regresión ponderada no lineal de mínimos cuadrados, usando curvas logísticas. Los datos representan la media ± SEM de 3 experimentos, repetidos por triplicado. El análisis se implementó usando el programa SigmaPlot v.12. (B) Los valores de EC₅₀ y actividad máxima de los distintos compuestos se representan en esta tabla. La estadística compara las diferencias en EC₅₀ y actividades máximas de los compuestos frente a PBN o BPMN2 a *P < 0,05, **P < 0,001, ***P < 0,001, ns = no significativo (ANOVA de una vía, seguida del test de Holm-Sidak).

3.3. Efecto de las BPNs 1-5 sobre la muerte celular necrótica y apoptótica inducida por el modelo de OGD e IR

Una vez se confirmó el efecto neuroprotector de las BPNs frente al daño isquémico, se quiso estudiar su efecto concreto frente a la necrosis y la apoptosis.

Así, se determinó la extensión de la muerte por necrosis midiendo la actividad LDH extra e intracelular y calculando el porcentaje liberado de dicha enzima. De esa manera, como se muestra en la Figura 41A, a partir de los valores obtenidos de la liberación de LDH tras 4 h de OGD, seguidas de 24 h de IR, y añadiendo 1-500 µM de BPNs 1-5, PBN y NAC, se pudo concluir que todas las BPNs disminuyeron significativamente la liberación de LDH de forma dependiente de la concentración, llegando al 100% de inhibición de la liberación de LDH entre 100 y 500 µM (Figura 41A). Las nitronas que mostraron un mayor efecto anti-necrótico fueron BPHBN5, con dos sustituyentes *N-t*-Bu y un efecto muy similar al ejercido por NAC, seguida de las nitronas BPMN3 (con sustituyente *N*-Bn) y BPHBN4 y BPMN1 (con sustituyente *N*-Me), que también mostraron un perfil anti-necrótico bueno,

aunque inferior al de **BPHBN5** y **BPMN2**, respectivamente. De nuevo, **PBN** demostró el peor efecto anti-necrótico de entre todas las nitronas ensayadas.

Para evaluar el grado de muerte celular apoptótica en estas condiciones, se determinó la actividad de la caspasa-3 empleando el sustrato Ac-DEVD-AMC, que libera AMC fluorescente tras la hidrólisis. De esa manera, tras 4 h de OGD, y añadiendo **BPNs 1-5**, **PBN** y **NAC** a concentraciones de 10-500 μM , se procedió a la IR durante 24 h, y finalmente, las células se lisaron, se añadió el sustrato y se midió la emisión de fluorescencia.

De acuerdo con la Figura 41B, se puede concluir que todas las **BPNs** tienen un efecto anti-apoptótico dependiente de la concentración. Sin embargo, en general, estos compuestos son menos eficaces protegiendo frente a la apoptosis que frente a la necrosis. La nitrona más potente del grupo fue **BPHBN5**, que a la concentración de 500 μM consigue un 100% de inhibición de la apoptosis, como también ocurre con **NAC**. Por otro lado, la capacidad anti-apoptótica de **BPMN3** también fue buena. En general, desde el punto de vista de la SAR, los compuestos con dos motivos nitrona en su estructura, es decir, **BPHBN4** con *N*-Me y **BPHBN5** con *N-t*-Bu, especialmente éste último, tienen un efecto anti-apoptótico muy marcado, mayor al de sus homólogas con un solo grupo nitrona, **BPMN1** (con *N*-Me) y **BPMN2** (con *N-t*-Bu).

En resumen, las nitronas **BPHBN5** y **BPMN3** demostraron poseer los mejores efectos anti-necróticos y anti-apoptóticos, similares a los que demostró **NAC** y mayores a los de **PBN**. Estas características respaldan los efectos neuroprotectores de estas moléculas sobre la actividad metabólica neuronal que describimos en los apartados anteriores.

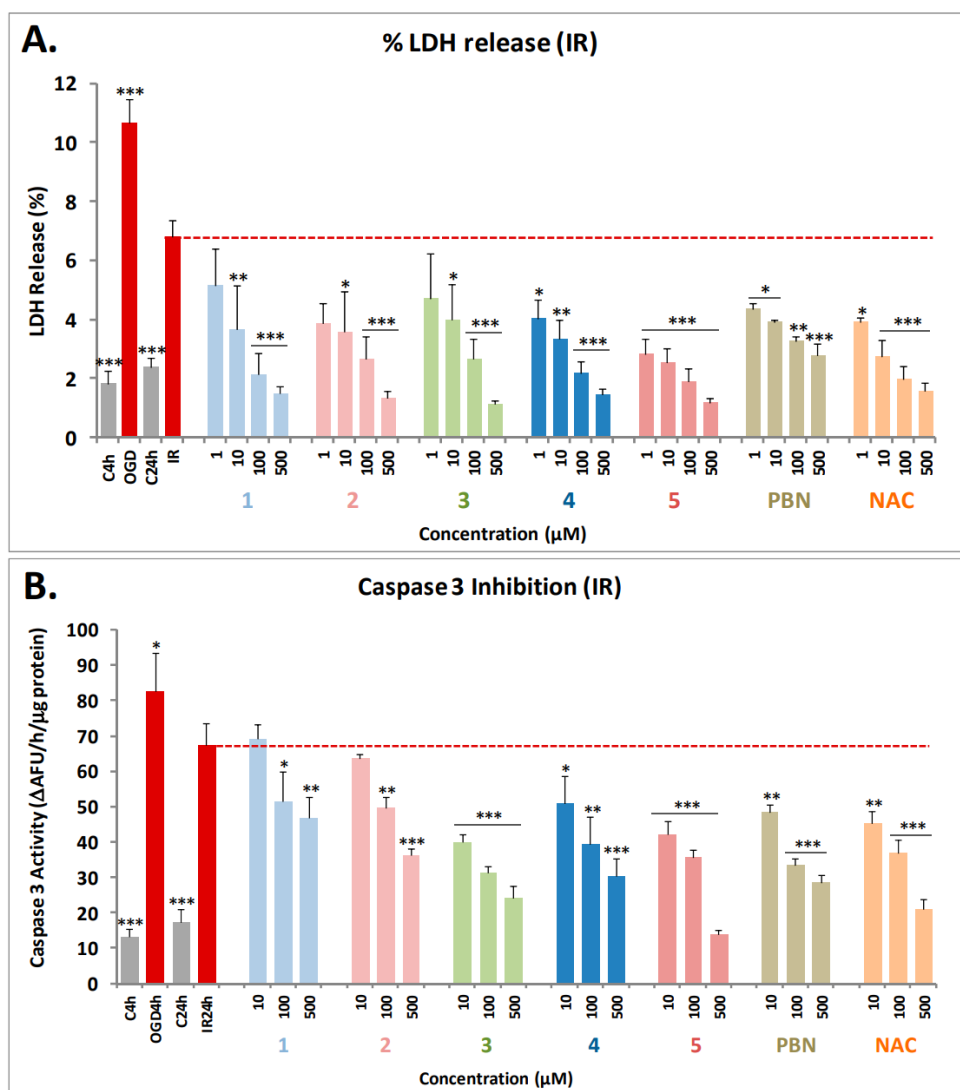


Figura 41. Efectos neuroprotectores de las BPNs 1-5, PBN y NAC frente a muerte celular necrótica (A) y apoptótica (B) inducida por el tratamiento de OGD e IR en células de neuroblastoma humano SH-SY5Y. (A) Las barras muestran el porcentaje de liberación de LDH tras 4 h de OGD y 24 h de IR, sin o con tratamiento con BPNs 1-5, PBN o NAC de 1-500 μM. (B) Las barras muestran la actividad de la caspasa-3 expresada como AFU/μg proteína/h/min tras OGD e IR sola o con BPNs 1-5, PBN y NAC de 10-500 μM. (A-B) Los valores son la media ± SEM de tres experimentos, cada uno repetido por triplicado, y se compara el efecto de los compuestos con IR solo. Los datos se analizaron estadísticamente mediante una ANOVA de una vía, seguida de test de comparaciones múltiples de Holm-Sidak. *P < 0,05, **P < 0,01, ***P < 0,001; AFU: Unidades Arbitrarias de Fluorescencia.

3.4. Neurotoxicidad basal de las BPNs, PBN y NAC

Basándonos en los resultados descritos anteriormente, era necesario analizar la posible neurotoxicidad basal de las BPNs 1-5, y se llevó a cabo midiendo la viabilidad celular con el test XTT pero sin emplear ningún tratamiento tóxico.

Los resultados de estos experimentos se muestran en la Figura 42, donde se aprecia que ninguna de las **BPNs**, al igual que **PBN** y **NAC**, presentaron ningún efecto neurotóxico a nivel basal.

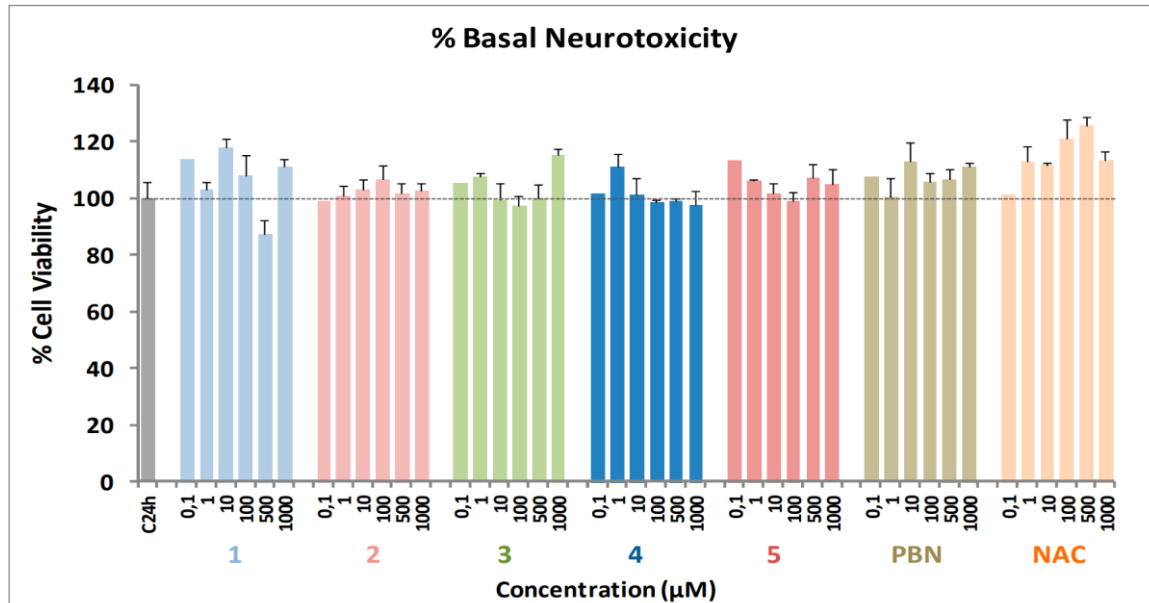


Figura 42. Efecto de las BPNs 1-5, PBN y NAC sobre la viabilidad de las células de neuroblastoma humano SH-SY5Y en condiciones basales. Las barras representan el porcentaje de viabilidad celular en presencia de los compuestos indicados de 0,1-1000 μM. La viabilidad de las células sin tratar (C24h) fue considerada como el 100% ($100 \pm 5,52\%$). Los valores corresponden a la media \pm SEM de cinco experimentos, cada uno repetido por triplicado. La estadística se realizó mediante un test ANOVA, pero no se encontraron diferencias significativas respecto al control. El análisis de los resultados por encima del 100% no se muestra.

3.5. Capacidad antioxidante de las BPNs 1-5, PBN y NAC: eliminación de radical superóxido

Los resultados obtenidos en las secciones previas nos llevaron a investigar si el efecto neuroprotector que observábamos con las **BPNs** podía ser consecuencia de su capacidad para actuar como antioxidantes y eliminadores de ROS, en particular de anión superóxido ($O_2^{\bullet-}$). La detección de anión superóxido se llevó a cabo mediante la sonda fluorescente dihidroetidina (DHET), añadido tras 3 h de OGD y 3 h de IR, en presencia o no de **BPNs** 1-5, **PBN** y **NAC**, cuyas concentraciones fueron de 0,1-1000 μM.

Como se muestra en la Figura 43, los niveles de producción de ROS tras IR ($0,459 \pm 0,080$ AFU/min/100.000 células; media \pm SEM; n = 12) fueron mayores a los de OGD sola ($0,422 \pm 0,078$ AFU/min/100.000 células, media \pm SEM; n = 12), pero no significativamente; es por ello que consideramos la liberación de ROS de IR como el 100%. Como cabía esperar, las **BPNs** fueron capaces de reducir parcial o totalmente el incremento en los niveles de ROS inducidos por IR de manera dosis-dependiente.

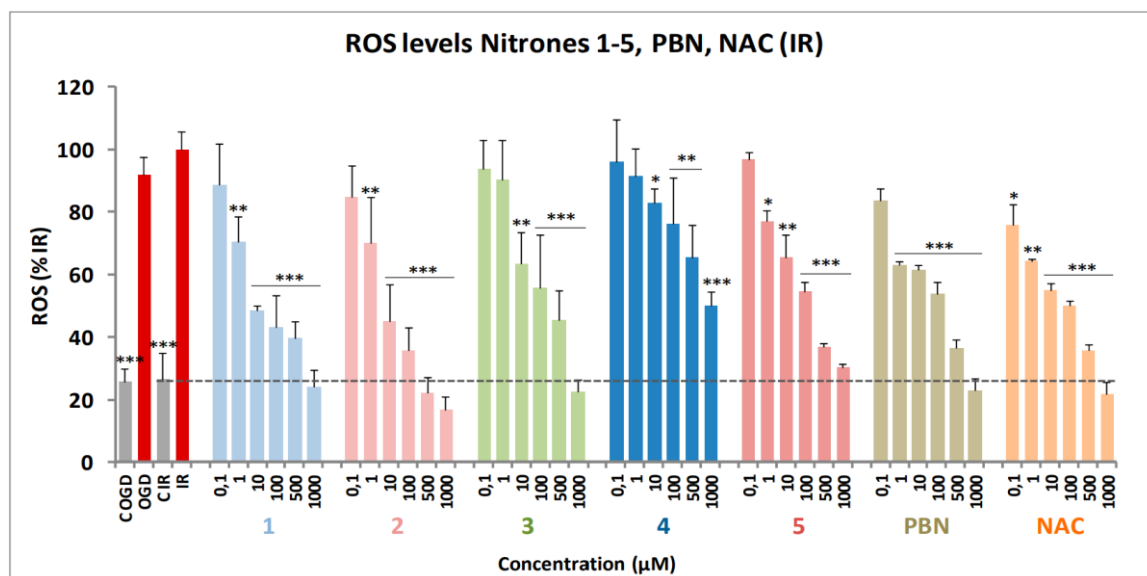


Figura 43. Efectos inhibitorios de las BPNs 1-5, PBN y NAC sobre la producción de ROS (superóxido) en células de neuroblastoma humano SH-SY5Y sometidas a 3 h de OGD y 3 h de reperusión (IR). Las barras muestran el porcentaje de ROS formado tras OGD e IR con, o sin, BPNs 1-5, PBN y NAC a concentraciones de 0,1-1000 µM. Los valores corresponden a la media \pm SEM de tres experimentos, cada uno repetido por triplicado. Los valores de producción de ROS en condiciones basales fueron $0,46 \pm 0,08$ AFU/min/100.000 células. La estadística compara el efecto de IR frente a los controles (línea de puntos) o el efecto de los distintos compuestos respecto a IR a * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$ (ANOVA de una vía, seguida de un test de comparaciones múltiples de Holm-Sidak).

El análisis de las curvas dosis-respuesta, y los cálculos de los valores de EC_{50} y actividad antioxidante máxima de las **BPNs 1-5**, **PBN** y **NAC** se muestran en la Figura 44A y Figura 44B, respectivamente. De acuerdo con los valores de EC_{50} , de menor a mayor, el orden de las nitronas, de mayor eficacia antioxidante a menos, es el siguiente:

$$\text{BPMN2} < \text{BPHBN5} \leq \text{BPMN3} \leq \text{PBN} \leq \text{NAC} \ll \text{BPMN1} \ll \text{BPHBN4}.$$

En cuanto a las actividades antioxidantes máximas, éstas fueron muy similares para todos los compuestos de ensayo, por lo que se puede concluir que las nitronas **BPMN2**, **BPHBN5** y **BPMN3** exhiben las mejores propiedades antioxidantes, que permiten reducir

de forma bastante eficaz la producción de superóxido que se produce tras IR. Este poder antioxidante es similar al de **PBN** y **NAC**, sus moléculas de referencia, que demostraron una buena capacidad antioxidante.

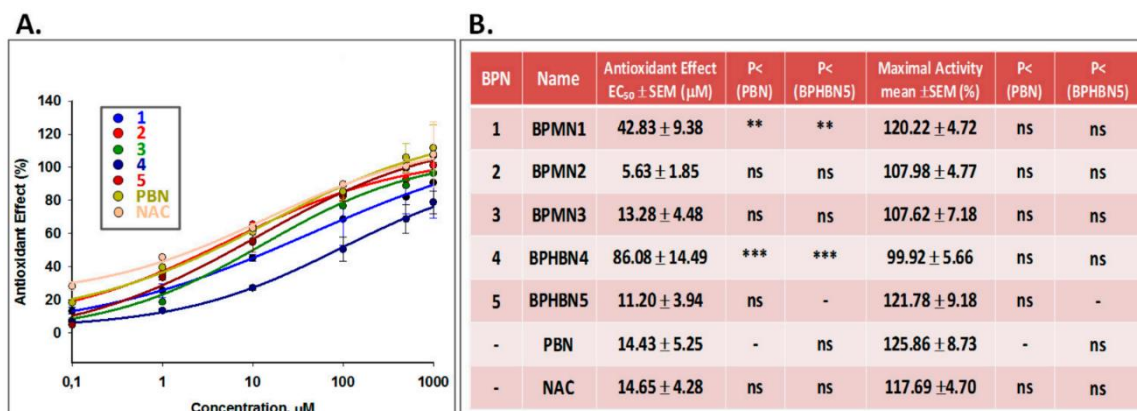


Figura 44. Efecto antioxidante de las BPNs 1-5, PBN y NAC tras IR en células de neuroblastoma humano SH-SY5Y. (A) Curvas dosis-respuesta que muestran el porcentaje de efecto antioxidante de los distintos compuestos de 0,1-1000 μM. Los ajustes de la curva para la estimación de las EC₅₀ se llevó a cabo mediante una regresión ponderada no lineal de mínimos cuadrados, usando curvas logísticas, empleando el programa SigmaPlot v.12. Los datos representan la media ± SEM de tres experimentos, repetidos por triplicado. (B) Valores de EC₅₀ y actividad antioxidante máxima de los distintos compuestos frente a PBN o BPMN2 a *P < 0,05, **P < 0,001, ***P < 0,001, ns = no significativo (ANOVA de una vía, y test de comparaciones múltiples de Holm-Sidak).

En resumen, y desde el punto de vista de la SAR, de nuevo fueron **BPMN2** y **BPHBN5**, con uno o dos sustituyentes *N-t*-Bu, y **BPMN3**, con sustituyente *N*-Bn, las nitronas más potentes en cuanto a efecto antioxidante de toda la serie de **BPNs**. Es por ello que estos datos confirman una vez más que las nitronas sustituidas con grupos *N-t*-Bu y *N*-Bn son las que mejores propiedades antioxidantes tienen, como también pasaba con las propiedades neuroprotectoras, aunque en este caso, y a diferencia de la capacidad neuroprotectora, el hecho de poseer dos grupos nitrona no parece aumentar el efecto antioxidante para la eliminación de ROS; más bien, incluso puede disminuir levemente el efecto antioxidante de la molécula.

4. Efecto neuroprotector y antioxidante de las nitronas derivadas de nucleobases (NDNs)

Los buenos resultados de neuroprotección y efecto antioxidante obtenidos con las *homo-bis*, *homo-tris* y *bi-fenil-nitronas*, nos ha estimulado para explorar de nuevas nitronas con diferente estructura base para su posible tratamiento en enfermedades asociadas a la edad, focalizando este estudio sobre la isquemia cerebral. De ese modo, se desarrollaron nitronas que contenían **nucleobases pirimidínicas** (NDNs **9a-e**, y **9h, 9i**) y **nucleobases purínicas** (NDNs **9f, 9g**), que fueron sintetizadas en el laboratorio de la Dra. Dorota Piotrowska (Universidad de Lodz, Polonia) (Figura 17). Algunas de ellas, habían sido previamente ensayadas como antivirales, y aunque no se llegó a demostrar dicha actividad, sí se observó que ninguna de ellas tenía efectos citotóxicos en las líneas celulares ensayadas (Gotkowska et al., 2012; Piotrowska et al., 2016; Piotrowska et al., 2019). Es por ello que para este trabajo de investigación, se procedió al estudio de sus capacidades neuroprotectoras y antioxidantes, cuyos resultados han sido publicados recientemente ([Chamorro et al., 2022](#)).

4.1. Efectos neuroprotectores de las NDNs en el modelo de privación de oxígeno y glucosa (OGD)

El efecto neuroprotector de las nitronas derivadas de nucleobases (NDNs) **9a-i** se estudió en el modelo *in vitro* de OGD seguido por re-administración de oxígeno y glucosa, o reperfusión (IR). Los compuestos **PBN** y **NAC** se emplearon como referencia. El rango de concentraciones de los compuestos fue de 0,1-1000 μM , añadidos durante la IR. Tras 4 h de OGD, se produjo una disminución en la viabilidad celular de un 50% ($49,09 \pm 5,38$ % viabilidad celular, media \pm SEM; n = 12), seguido de una ligera recuperación en la viabilidad de las células SH-SY5Y de un 20% ($62,28 \pm 6,19$ % viabilidad celular, media \pm SEM; n = 12) a las 24 h de reperfusión (IR). Las nitronas **9a-i** fueron capaces de recuperar, de forma parcial o totalmente, la actividad metabólica celular reducida tras tratamiento de OGD e IR, de una manera dependiente de la concentración (Figura 45). Estos resultados revelaron que las nitronas pirimidínicas **9a, 9c, 9h** y **9i** fueron los compuestos más potentes de la serie.

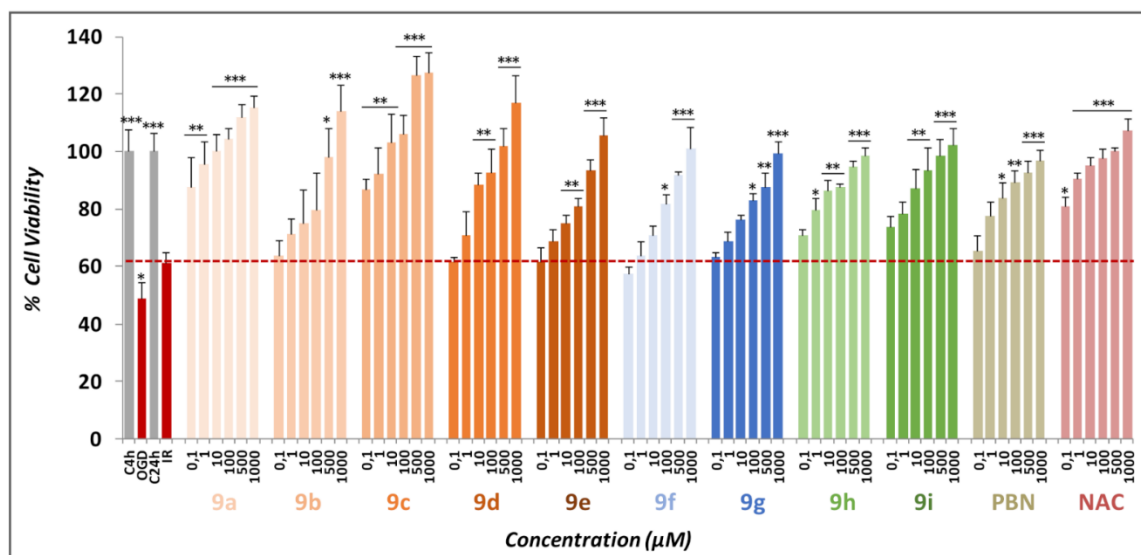


Figura 45. Efecto neuroprotector de las nitronas 9a-i, PBN y NAC en la actividad metabólica de células de neuroblastoma humano SH-SY5Y tras el tratamiento de 4 h de OGD y 24 h de IR. Las barras muestran el porcentaje de viabilidad celular a concentraciones de 0,1-1000 µM de las NDNs 9a-i, PBN y NAC. Los valores representan la media ± SEM de tres experimentos, cada uno realizado por triplicado. La estadística compara las diferencias de las distintas condiciones con respecto a IR sola (línea de puntos roja) a *P < 0,05, **P < 0,01, ***P < 0,001 (ANOVA de una vía, seguida de un test de Holm-Sidak).

En relación al punto de vista de la SAR, dentro de las pirimidínicas, la nitrona **9a** (con sustituyente R = H) y la nitrona **9c** (con sustituyente R = F) generaron la mejor recuperación de la viabilidad celular. Sin embargo, la introducción de un grupo metilo en la *mono*-nitrona **9b**, o la introducción de halógenos (Br, Cl) en las *mono*-nitronas **9d** y **9e**, disminuía el efecto neuroprotector de éstas. En cuanto a las nitronas con sustituyente halogenado **9d** y **9e**, esta reducción fue proporcional al volumen del átomo en cuestión (**9d** > **9e**, es decir, Br > Cl). Por su parte, las nitronas con purinas **9f** y **9g** indujeron también un aumento de la viabilidad celular, superior al efecto de **9h** y **9i**, las dos *bis*-nitronas con R = H y R = Br, respectivamente, que fueron a su vez peores que las *mono*-nitronas **9a** y **9c**.

En la Figura 46 se muestran las curvas dosis-respuesta para las NDNs comparadas con las de PBN y NAC, en un rango de concentraciones de entre 0,1-1000 µM (Figura 46A y B), mostrando los valores de EC₅₀ y de actividad máxima (Figura 46C), siendo los mejores compuestos, es decir, de menor a mayor EC₅₀, los siguientes:

$$9f \leq 9g \leq \text{NAC} \leq 9h \leq 9a \leq 9c < 9i \leq 9d \leq \text{PBN} \leq 9e \leq 9b.$$

Las nitronas, **9a**, **9c** y **9h**, en cuanto a compuestos pirimidínicos, y las nitronas purínicas **9f** y **9g** son las que mayor potencia presentaban, mientras que **PBN** y las nitronas **9e** y **9b** fueron las que mostraron menor eficacia neuroprotectora.

En este caso, no se apreciaron diferencias significativas en cuanto a las actividades neuroprotectoras máximas, obteniéndose el orden siguiente:

$$9c \geq 9a \geq \text{NAC} \geq 9f \geq 9d \geq 9b \geq 9h \geq 9i \geq 9g \geq 9e \geq \text{PBN}.$$

Todas las nitronas tienen una actividad máxima muy elevada, siendo las nitronas **9a**, **9c** y **9d** las de mayores actividades máximas, y **9g**, **9e** y **PBN** las de menor actividad máxima.

En resumen, en los experimentos de viabilidad celular tras OGD e IR, se pudo apreciar que las nitronas purínicas (**9f** y **9g**) fueron los compuestos con mayores efectos neuroprotectores, seguidos de las *mono*-nitronas **9a** (R = H) y **9c** (R = F), que fueron mejores que **9h** (R = H) y **9i** (R = Br), las dos *bis*-nitronas pirimidínicas. Por su parte, los compuestos menos neuroprotectores fueron las *mono*-nitronas **9b**, con R = Me, y **9e**, con R = Cl, que no consiguen mejorar la neuroprotección ofrecida por la molécula madre **PBN**.

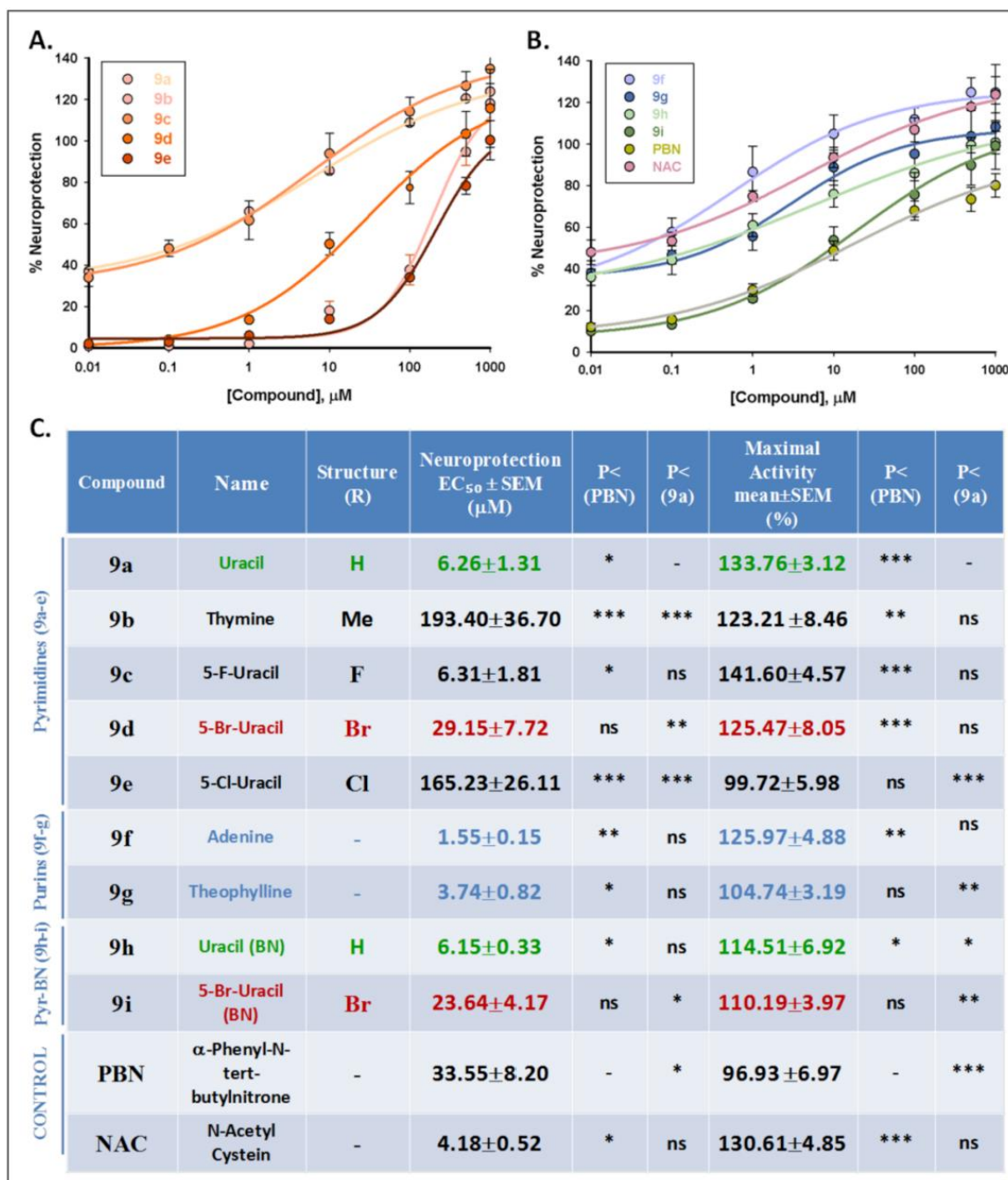


Figura 45. Efectos neuroprotectores de las NDNs 9a-i, PBN y NAC frente al daño metabólico celular inducido por el tratamiento de OGD e IR en cultivos de neuroblastoma humano SH-SY5Y. (A, B) Curvas dosis-respuesta que representan el porcentaje de neuroprotección de diferentes nitronas, 9a-e (A) y nitronas 9f-i, PBN y NAC (B) a las concentraciones de entre 0,1-1000 μM . El ajuste de las curvas y el cálculo de los valores de EC_{50} y de actividad neuroprotectora máxima se realizaron como se describió en la sección 2.7. del apartado de "Materiales y métodos". Los datos corresponden a la media \pm SEM de cuatro experimentos, realizados por triplicado. (C) Valores de EC_{50} y actividades neuroprotectoras máximas de los compuestos de estudio. Las comparaciones estadísticas de los datos se llevaron a cabo frente a PBN o a la nitrona 9a a * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$, y ns = no significativo (ANOVA de una vía, seguida de test de comparaciones múltiples de Holm-Sidak).

4.2. Efectos neuroprotectores de las NDNs en la muerte celular necrótica y apoptótica inducida por el modelo de OGD e IR

A continuación, se estudió el efecto protector de las NDNs frente a muerte celular necrótica y apoptótica.

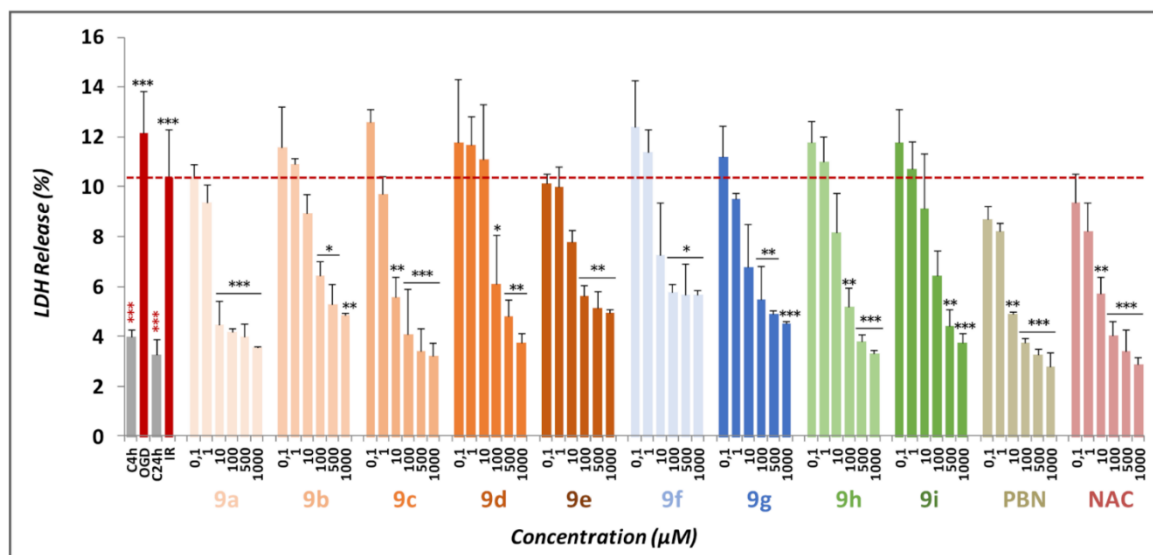


Figura 47. Efecto anti-necrótico de las nitronas 9a-i, PBN y NAC en células SH-SY5Y tras OGD e IR. Las barras representan el porcentaje de LDH liberado tras OGD e IR en células tratadas en ausencia, o presencia, de los compuestos indicados a concentraciones de 0,1-1000 μM. Los valores representan la media ± SEM de tres experimentos, que se repitieron por triplicado, y se compara el efecto de OGD e IR frente a sus respectivos controles (rojo***) o el efecto de los distintos compuestos tras IR frente a IR sola (línea de puntos roja) en ausencia de los compuestos (negro***). El análisis estadístico se llevó a cabo como se indica en la sección 2.7. del apartado “Materiales y métodos”, a *P < 0,05, **P < 0,01 y ***P < 0,001 (ANOVA de una vía seguida del test de Holm-Sidak).

La Figura 47 muestra los valores de liberación de LDH obtenidos tras 4 h de OGD, seguidos de 24 h de IR en células de neuroblastoma, añadiendo las nitronas 9a-i de 0,1-1000 μM, junto con PBN y NAC a esas mismas concentraciones. A la vista de los resultados, podemos concluir que todas las NDNs reducen significativamente la liberación de LDH de forma dosis-dependiente, llegando a un 100% de inhibición máxima a concentraciones entre 100 y 1000 μM.

Para poder comparar la eficacia de estas nitronas en la reducción de la muerte necrótica, se realizaron las curvas concentración-respuesta (ver apartado 4.2.6. de “Materiales y métodos”), y se calcularon los valores de EC₅₀ y actividades inhibitorias máximas. En la Figura 48 se muestra el análisis de las curvas dosis-respuesta para las NDNs 9a-i, PBN y

NAC (Figura 48A y B), así como los valores de IC_{50} y actividades anti-necróticas máximas (Figura 48C). De acuerdo con los valores de IC_{50} , ordenados de menor a mayor, es decir, de mayor a menor eficacia neuroprotectora frente a necrosis, el poder neuroprotector de las nitronas sigue el siguiente orden:

$$9c \leq 9a \leq 9g \leq 9f \leq \text{NAC} \leq \text{PBN} < 9e < 9h < 9b < 9i \leq 9d.$$

Las nitronas **9c**, **9a**, **9g** y **9f** tuvieron la máxima eficacia anti-necrótica, y las nitronas **9h**, **9b**, **9i** y **9d** fueron las de menor potencia. Por otro lado, también se observaron diferencias significativas en cuanto a la actividad anti-necrótica máxima de los distintos compuestos, haciendo que el orden de los mismos (de mayor a menor actividad máxima) fuera:

$$9c > 9f \geq 9g \geq 9h \geq 9b \geq 9i \geq 9d > 9a \geq \text{NAC} \geq 9e > \text{PBN}.$$

De esa manera, todas las nitronas demostraron tener una elevada actividad máxima (que rondaba o sobrepasaba el 100%), siendo las nitronas **9c** sobre todo, pero también **9f**, **9g** y **9h** las de mayor actividad máxima, mientras que las nitronas **9a**, **9e** (rondando el 100%), pero sobre todo **PBN** (77%) tuvieron una menor actividad máxima, de forma similar a como ocurría en los experimentos de viabilidad celular (ver apartado 4.1. de “Resultados”).

A continuación, para evaluar la extensión de la muerte celular por apoptosis, se determinó la actividad de la caspasa-3 empleando el sustrato Ac-DEVD-AMC. Así, tras 4 h de OGD, y añadiendo los compuestos **NDNs**, **PBN** y **NAC** a concentraciones de 0,1-1000 μM , tras 24 h de IR, las células se lisaron, se añadió el sustrato fluorogénico y se midió la fluorescencia.

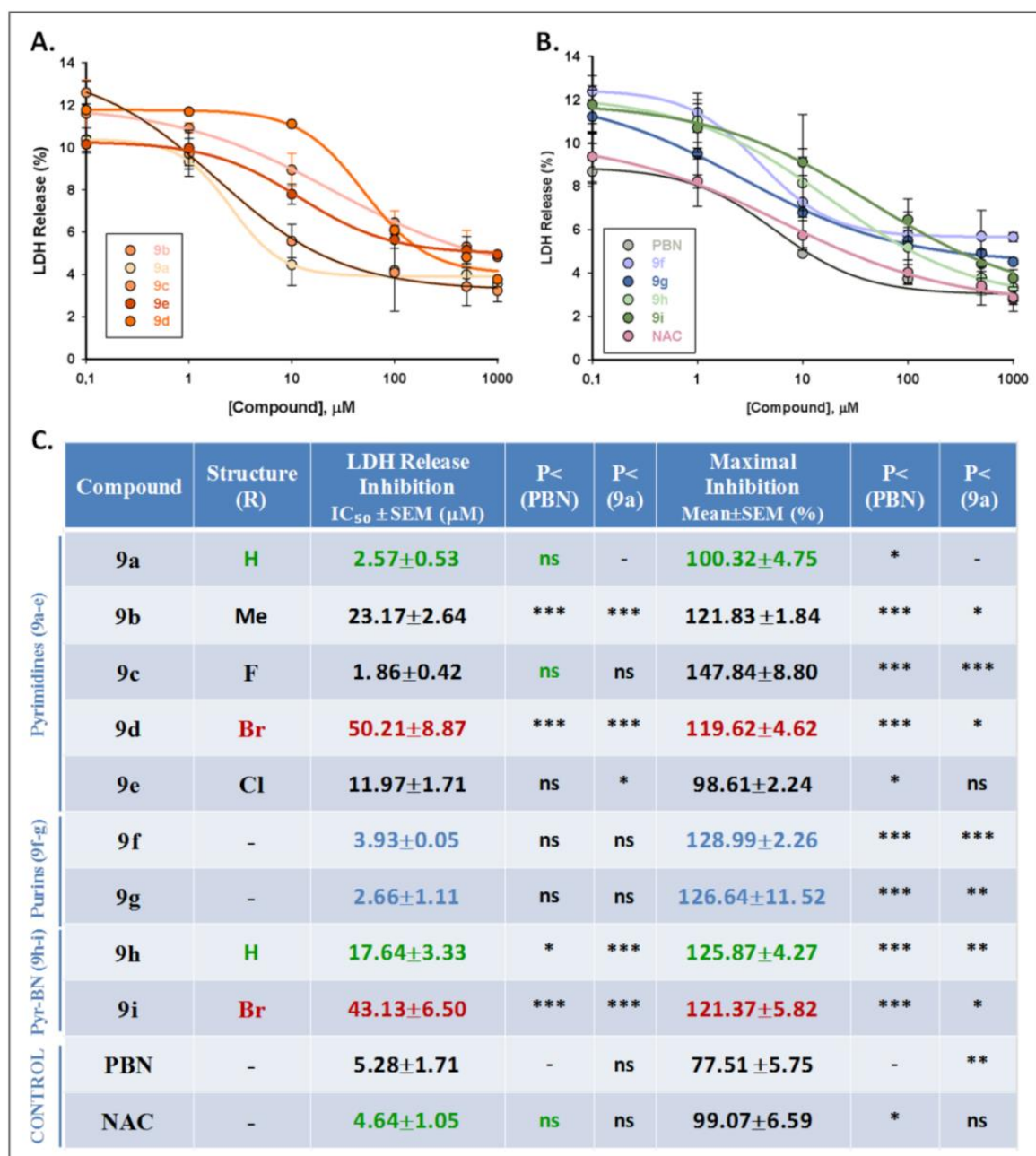


Figura 48. Efectos protectores de las nitronas 9a-i, PBN y NAC frente a la muerte necrótica inducida por el tratamiento de IR en células SH-SY5Y. (A. B) Curvas dosis-respuesta, que muestran el porcentaje de efecto anti-necrótico de los diferentes compuestos: nitronas 9a-e (A) y nitronas 9f-i, PBN y NAC (B), a concentraciones de 0,1-1000 μM . (C) Datos de IC_{50} y actividad máxima para los compuestos indicados. La representación de los datos, el ajuste de la curva y el análisis estadístico se realizaron como se describe en el apartado 2.7. de “Materiales y métodos”. Las diferencias estadísticas se realizaron frente a PBN o frente a la nitrona 9a a * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$, y ns = no significativo (ANOVA de una vía y posterior test de Holm-Sidak).

Como se puede apreciar en la Figura 49, todas las NDNs del ensayo tuvieron un efecto anti-apoptótico dependiente de la concentración. Sin embargo, también queda patente que las nitronas protegen de forma menos eficiente frente a apoptosis que frente a necrosis, además de que el perfil anti-apoptótico de los compuestos ensayados difiere del

anti-necrótico. Esto se traduce en que, en el caso de la apoptosis, las nitronas más neuroprotectoras parecen ser las *bis*-NDNs, **9h** y **9i**, mucho mejores a PBN o a NAC, por lo que podría decirse que la presencia de un segundo grupo nitrona en estos compuestos favorece claramente su capacidad anti-apoptótica. Sin embargo, si comparamos el efecto de las *mono*-nitronas, podemos destacar las nitronas **9a** (con base de Uracilo), **9b** (Timina) y **9d** (Br-Uracilo) como las más neuroprotectoras, mientras que las nitronas con nucleobases de purina **9f** y **9g** muestran el menor efecto anti-apoptótico.

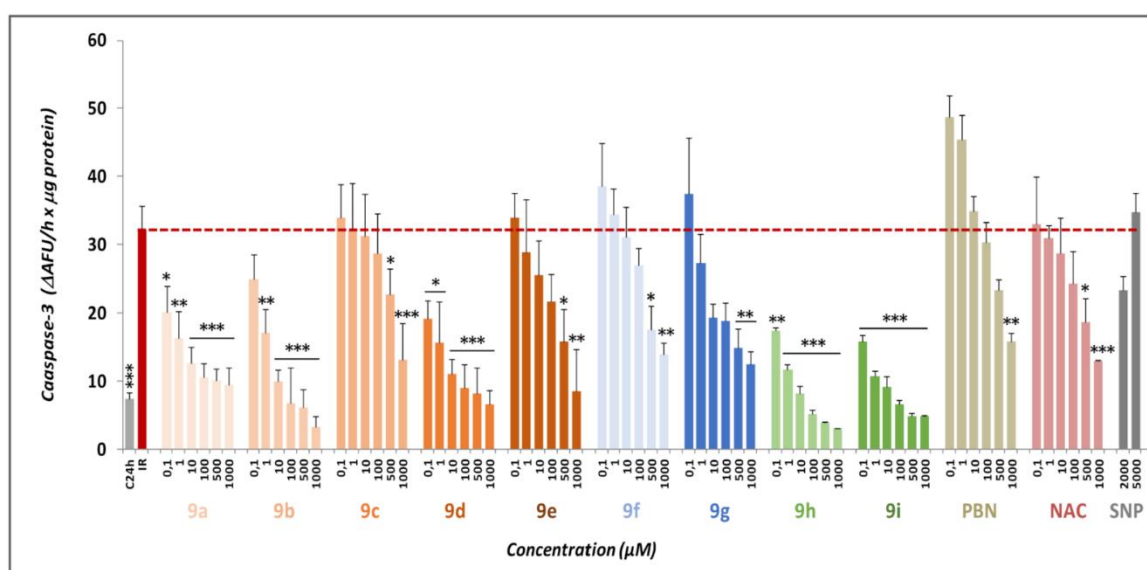


Figura 49. Efectos anti-apoptóticos de las nitronas **9a-i**, PBN y NAC frente al tratamiento de OGD e IR en células SH-SY5Y. Las barras muestran la actividad de caspasa-3 (Δ AFU/min/ μ g proteína) tras OGD e IR, en ausencia o presencia de los compuestos **9a-i**, PBN y NAC, a concentraciones de 0,1-1000 μ M. Los valores representan la media \pm SEM de tres experimentos, que se repitieron por triplicado, y se compara el efecto de IR frente a su control (negro^{***}) y el efecto de los distintos compuestos tras IR frente a IR sola (línea de puntos roja) en ausencia de los compuestos (negro^{***}). La presentación de los datos y su análisis estadístico se realizaron como se indica en el apartado 2.7. de "Materiales y métodos". AFU = Unidades arbitrarias de fluorescencia. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$.

4.2.1. ANÁLISIS DEL EFECTO NEUROPROTECTOR DE LAS NITRONAS DERIVADAS DE NUCLEOBASES

La *mono*-nitrona **9a** posee las mejores propiedades anti-necróticas y una de las mejores anti-apoptóticas, además de mostrar el mayor efecto de recuperación de la actividad metabólica y viabilidad celular. Dadas las óptimas propiedades de la HBN6 (Figura 12) (Chamorro et al., 2020), atribuibles al segundo grupo nitrona por comparación con PBN, se evaluó la capacidad neuroprotectora de la *bis*-nitrona **9h**, por la que se añadía un

segundo motivo nitrona al compuesto **9a**; con el mismo análisis, pero a partir de la *mono*-nitrona **9d**, con un átomo de bromo en su estructura, se diseñó la *bis*-nitrona **9i**, llevándose a cabo el análisis del poder neuroprotector de las *bis*-nitronas **9h** y **9i** de la forma usual (ver apartado 2.7. de “Materiales y métodos”).

En cuanto al análisis de la neuroprotección ejercida en el modelo de OGD seguido de IR, la incorporación de dos motivos nitrona en las NDNs pirimidínicas **9a** y **9d**, con H y Br como los sustituyentes R, respectivamente, mostró que las *bis*-nitronas **9h** y **9i** no aumentaron la viabilidad celular comparadas con las correspondientes *mono*-nitronas **9a** y **9d** (Figura 45). En la Figura 46, que presenta el análisis de las curvas dosis-respuesta para todos los compuestos ensayados en el rango de 0,1-1000 μ M (Figura 46A y B), y los correspondientes valores de EC₅₀ y actividad neuroprotectora máxima (Figura 46C), se puede apreciar que el compuesto **9h** (*bis*-nitrona con R = H) tiene una EC₅₀ significativamente menor a la de **9i** y PBN, siendo **9h** la nitrona más neuroprotectora de las dos. Sin embargo, como ya se describió anteriormente (ver apartado 4.1. de “Resultados”), los compuestos más neuroprotectores de entre las NDNs fueron **9a** y **9c**, demostrando que las *bis*-nitronas no presentan un aumento en la actividad neuroprotectora significativo respecto a las *mono*-nitronas.

En la Figura 47, se representaron los valores obtenidos de la medida de liberación de LDH tras 4 h de OGD, seguida de 24 h de IR, sin o con distintas concentraciones de NDNs **9a-i**, PBN y NAC. A la vista de estos resultados, se puede concluir que, salvo **9e** y **9f**, todas las nitronas mostraron una buena capacidad anti-necrótica, llegando al 100% de inhibición máxima de liberación de LDH a concentraciones entre 100 y 1000 μ M. Para comparar la eficacia de los distintos fármacos, se realizó el estudio dosis-respuesta determinando los valores de IC₅₀ y actividad máxima, recopilados en la Figura 49. Como se muestra en dicha figura, en cuanto a valores de IC₅₀, las *bis*-nitronas **9h** y **9i** fueron significativamente menos eficaces en la inhibición de la necrosis que las nitronas purínicas **9f** y **9g**, o las *mono*-nitronas pirimidínicas **9a** y **9c**; además, **9h** volvió a ser significativamente más anti-necrótica que **9i**, al menos en cuanto a IC₅₀, lo que confirma que la nitrona **9h**, con sustituyente R = H, es más neuroprotectora que **9i**, con sustituyente R = Br.

Posteriormente, para evaluar el efecto anti-apoptótico de los compuestos, se determinó la actividad de la caspasa-3 usando Ac-DEVD-AMC y, tras 4 h de OGD y 24h en presencia o ausencia de las NDNs, PBN y NAC, obteniéndose las actividades de la caspasa-3 recogidas en la Figura 49. Como ya se había adelantado (ver apartado 4.2. de “Resultados”), las *bis*-nitronas **9h** y **9i** tienen un perfil anti-apoptótico más potente que sus homólogas *mono*-nitronas **9a** y **9d**, lo que indica que la presencia de dos motivos nitrona sí aumenta significativamente el efecto anti-apoptótico de las moléculas resultantes, mientras que no varía el efecto anti-necrótico de las mismas.

En resumen, la nitrona **9h** es una de las mejores nitronas de la serie NDN, demostrando un fuerte efecto anti-apoptótico, mejor al de **9a** y **9d**, aunque en cuanto a efecto protector de la viabilidad celular y efecto anti-necrótico no destaque significativamente respecto a las *mono*-nitronas.

4.3. Neurotoxicidad basal de las nitronas 9a-i

Dados los buenos resultados neuroprotectores de las NDNs **9a-i**, a continuación se llevó a cabo la evaluación de la viabilidad celular que inducían en las células SH-SY5Y en condiciones basales. Ninguno de los compuestos ensayados, NDNs **9a-i**, PBN y NAC, mostraron indicios de generar efectos neurotóxicos a nivel basal (Figura 50).

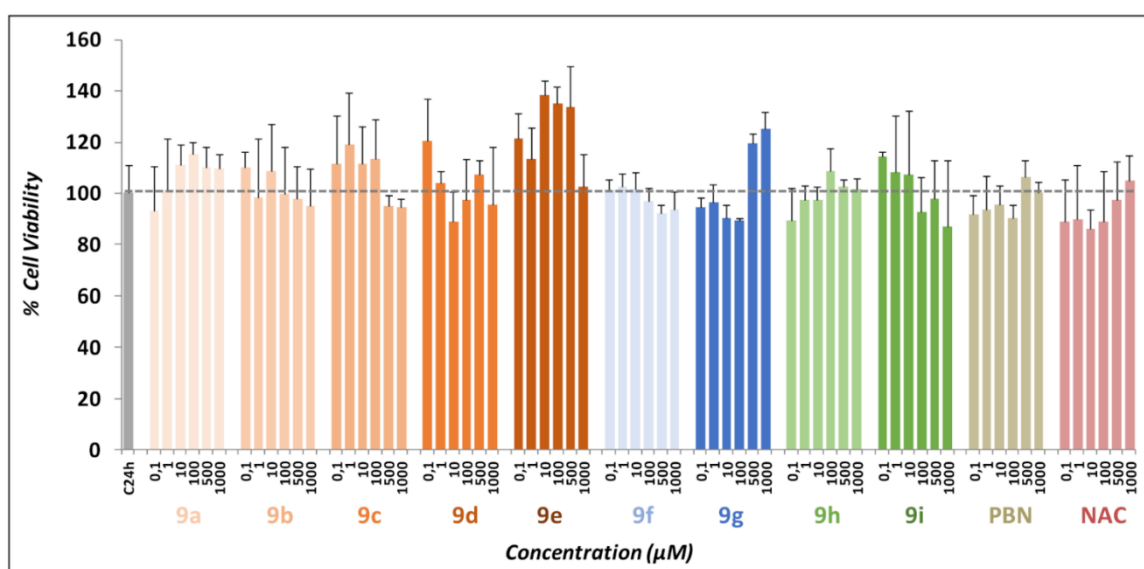


Figura 50. Efecto de las nitronas **9a-i**, PBN y NAC en la viabilidad de células de neuroblastoma humano SH-SY5Y en condiciones basales. Las barras muestran el porcentaje de viabilidad celular en presencia de los compuestos a concentraciones de 0,1-1000 µM. Las células no tratadas (C24h) se consideraron como el 100% de viabilidad (100 ± 9,96%). Los valores representan la media ± SEM de seis experimentos, que se repitieron por triplicado. La estadística se realizó mediante un test ANOVA de una vía.

No se encontraron diferencias significativas respecto a la viabilidad de C24h. No se muestra el análisis estadístico de los valores por encima del 100% de viabilidad.

4.4. Actividad antioxidante de las nitronas 9a-i

La detección de anión superóxido se llevó a cabo usando la sonda fluorescente dihidroetidina (DHET), tras 3 h de OGD y 3 h de IR, en ausencia o presencia de las **NDNs 9a-i**, con PBN y NAC actuando como compuestos de referencia. Las concentraciones de los compuestos fueron de 0,1-1000 μ M.

La Figura 51 recoge los niveles de ROS producidos por todas las condiciones mencionadas, y en ella se puede observar que los niveles de ROS tras IR ($0,311 \pm 0,057$ AFU/min/100.000 células; media \pm SEM; n = 12) fueron mayores, pero no significativamente distintos (ns, ANOVA de una vía) a la producción de superóxido tras OGD sola ($0,344 \pm 0,065$ UAF/min/100.000 células; media \pm SEM; n = 12). Como cabía esperar, las nitronas **9a-i** fueron capaces de revertir total o parcialmente el aumento en los niveles de ROS inducido por IR, de forma dosis-dependiente (Figura 51).

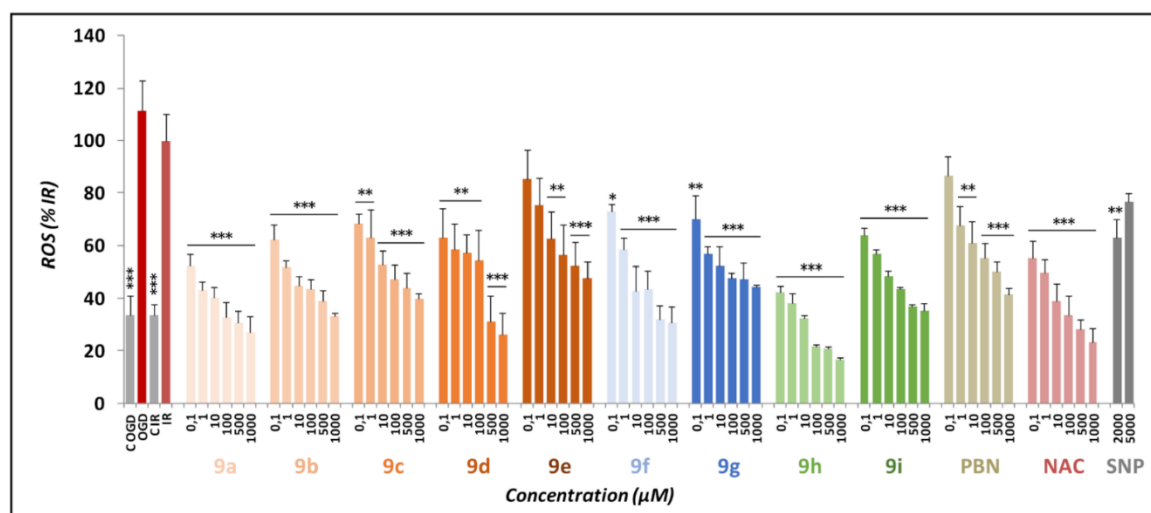


Figura 51. Efectos inhibitorios de las nitronas 9a-i, PBN y NAC en la producción de superóxido en cultivos celulares de SH-SY5Y sometidos a 3 h de OGD y 3 h de IR. Las barras representan el porcentaje de ROS formado tras OGD e IR, en ausencia o presencia de los compuestos a concentraciones de 0,1-1000 μ M. Los valores corresponden a la media \pm SEM de al menos cuatro experimentos, cada muestra repetida por triplicado. Los datos para las condiciones basales de ROS fueron de $0,101 \pm 0,022$ AFU/min/100.000 células. La presentación de los datos y el análisis estadístico de los mismos se realizó como se describe en el apartado 2.7. de "Materiales y métodos". La estadística compara el efecto de OGD e IR frente a sus controles o el de los compuestos frente IR sola. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$.

De acuerdo con el análisis de las curvas dosis-respuesta (Figura 52A, B) y el cálculo de los valores de EC_{50} y actividades antioxidantes máximas (Figura 52C), el orden de las nitronas, de mayor a menor capacidad antioxidante, es el siguiente:

$$9g \leq 9h \leq 9a \leq 9b \leq \text{NAC} \leq 9i \leq 9f \leq 9c \leq \text{PBN} < 9e < 9d$$

Así, las nitronas **9g**, **9h** y **9a** fueron las de mayor potencia antioxidante, y **PBN** y las nitronas **9e** y **9d** las de menor potencia. También se encontraron diferencias significativas en cuanto a la actividad máxima, obteniendo el siguiente orden, de mayor a menor actividad antioxidante máxima:

$$9h \geq \text{NAC} > 9d \geq 9a \geq 9i \geq 9f \geq 9b \geq 9c \geq \text{PBN} \geq 9e \geq 9g.$$

En definitiva, todas las nitronas poseen una elevada actividad máxima, alcanzando y superando en muchos casos el 100%, siendo especialmente la nitrona **9h** la de mayor actividad antioxidante, y **PBN** y **NDN 9e** las de menor efecto antioxidante máximo, al igual que también ocurría en los experimentos de viabilidad celular con XTT. Sin embargo, a pesar de numerosas pequeñas diferencias en cuanto a los valores de EC_{50} para el efecto antioxidante, la aplicación de test estadísticos para la comparación entre compuestos demostró que solo las nitronas **9d** y **9e**, con R = Br y Cl, respectivamente, tuvieron unas EC_{50} significativamente mayores a las de **PBN** y las nitronas **9a** y **9h**. En cuanto a la capacidad antioxidante máxima, solo las nitronas **9h**, **9a**, **9d** y **9i**, y **NAC** fueron significativamente mejores que **PBN**, y solo las nitronas **9c**, **9e**, **9g** y **PBN** fueron significativamente peores que la nitrona **9a**. Eso hizo que **NAC** y la nitrona **9h** (*bis*-nitrona pirimidínica con R = H) fueran los únicos compuestos con una actividad antioxidante máxima significativamente mayor a la de **9a**.

En resumen, se puede concluir que, de nuevo, las nitronas pirimidínicas **9a** y **9h**, *mono*-nitrona y *bis*-nitrona con R = H, poseen una capacidad antioxidante muy elevada, a nivel de **NAC**.

Esto implica, por un lado, que la adición del segundo grupo nitrona no modifica el efecto antioxidante de forma significativa, aunque en el caso de la *bis*-nitrona **9i** sí que hace que ésta posea una EC_{50} mucho más baja que la *mono*-nitrona **9d** (R = Br). En cambio, vuelve a ocurrir que la sustitución del H en C5 del motivo uracilo por Br o Cl (*mono*-nitronas **9d** y

9e, respectivamente) reduce su poder antioxidante, siendo los peores compuestos NDN en estos ensayos. Por otro lado, las nitronas purínicas **9f** y **9g**, especialmente **9f**, no fueron mucho peores a las mejores pirimidínicas (**9a** y **9h**).

En conclusión, las nitronas pirimidínicas **9a** y **9h**, así como las purínicas **9f** y **9g**, son las nitronas con mejores propiedades antioxidantes. Esta conclusión es consistente con sus propiedades neuroprotectoras sobre la capacidad metabólica y anti-necrótica, pero no con la actividad anti-apoptótica de estos compuestos, donde destacaban principalmente las *bis*-nitronas **9h** y **9i**. En cuanto a la adición del segundo grupo nitrona en estas NDNs, globalmente parece generar, y sobre todo en el caso de **9i** frente a **9d**, un cierto aumento en su capacidad antioxidante, aunque ello no se traduce en una mejora de sus efectos neuroprotectores.

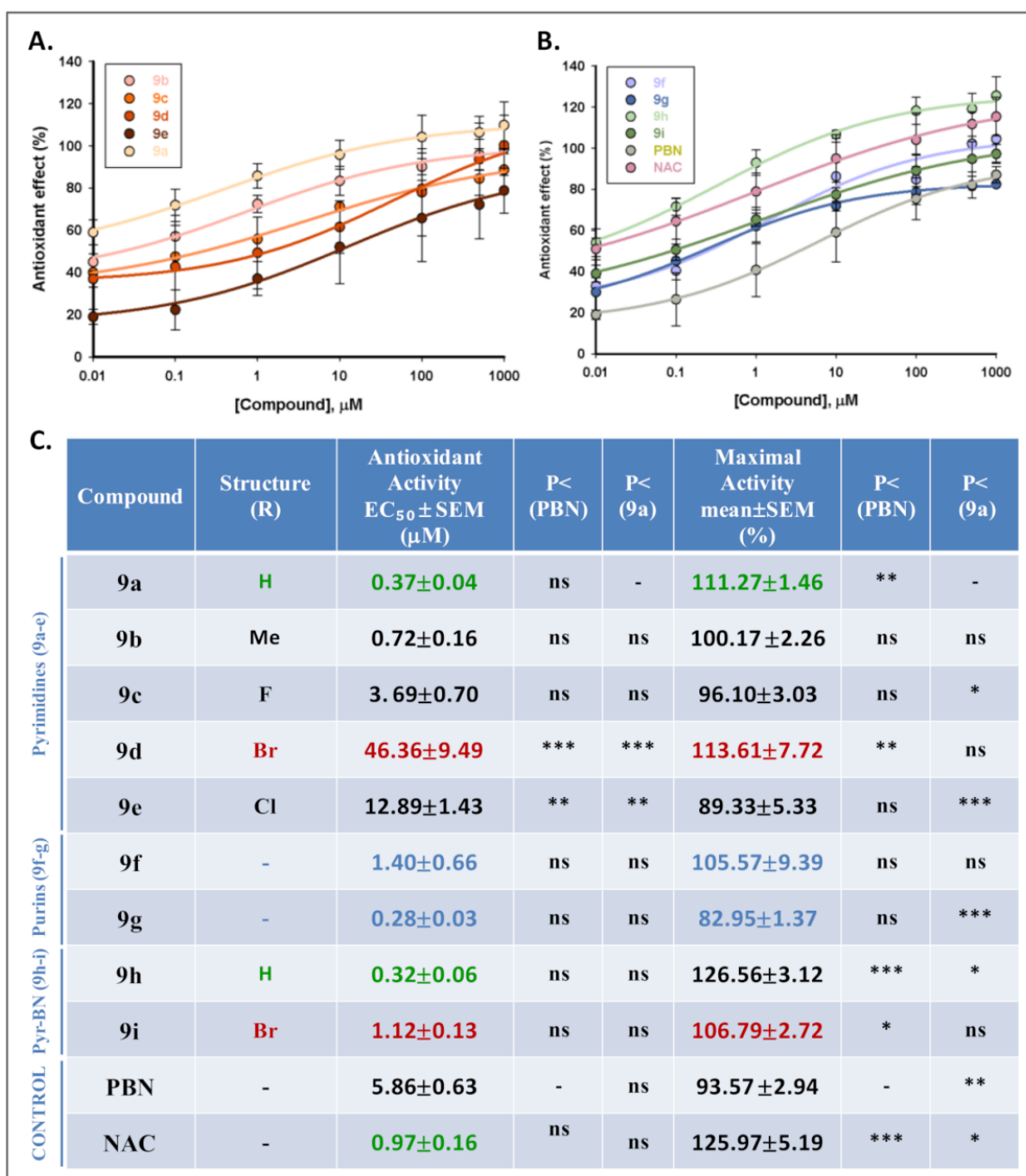


Figura 52. Efecto antioxidante de las nitronas 9a-i, PBN y NAC tras OGD e IR en células de neuroblastoma humano SH-SY5Y. (A, B) Curvas dosis-respuesta que muestran el porcentaje de efecto antioxidante de los distintos compuestos de 0,1-1000 μM . (C) Valores de EC₅₀ y actividad antioxidante máxima para los compuestos indicados. La representación de los datos, el ajuste de la curva y el análisis estadístico se realizó de acuerdo al apartado 2.7. de “Materiales y métodos”. La estadística compara las diferencias entre EC₅₀ o actividad máxima de los distintos compuestos respecto a PBN o a la nitrona 9a. *P < 0,05, **P < 0,01, ***P < 0,001; ns = no significativo.

5. Efecto neuroprotector y antioxidante de las quinolil-nitronas (QNs)

En este capítulo se describirán los resultados obtenidos con las **8-hidroxi-quinolil-nitronas (QNs) 1-6** (Figura 15), relacionadas con otras quinolil-nitronas estudiadas con anterioridad, como **RP19** (Chioua et al., 2012; Ayuso et al., 2017). Los resultados de sus propiedades neuroprotectoras y antioxidantes se han publicado recientemente ([Chamorro et al., 2023a](#)).

5.1. Análisis de la neuroprotección de QNs 1-6 en un modelo de OGD-IR

El efecto neuroprotector de las **QNs 1-6**, **PBN** y **NAC** se ha evaluado en un modelo de OGD, seguido de re-administración de oxígeno y glucosa (IR).

En base a la experiencia previa ([Chamorro et al., 2020](#)), las concentraciones de compuestos elegidas para la administración durante el tiempo de IR fueron de 0,1-1000 μ M. Se empleó el test XTT para medir la viabilidad celular de cada una de las muestras. Tras 4 h de OGD, se produjo una disminución de la actividad metabólica de un 55% ($45,22 \pm 2,88\%$ viabilidad celular, media \pm SEM; n = 6), y a las 24 h de IR, se produjo una ligera recuperación de un 15% ($62,28 \pm 6,19\%$ viabilidad celular; media \pm SEM; n = 6). Como se muestra en la Figura 53, todas las **QNs** destacaron por su alta efectividad como compuestos neuroprotectores, revirtiendo la disminución de la viabilidad inducida por IR y haciéndolo de forma dosis-dependiente, con una potencia similar a la de **PBN** y **NAC**.

Para determinar los valores de EC_{50} y actividad neuroprotectora máxima (MNA) de los compuestos, se analizaron las curvas dosis-respuesta de las nitronas **QN 1-6**, comparándolas con las de **PBN** y **NAC**, en el rango de 0,1-1000 μ M (Figura 54A, B), y a partir de ellas, se calcularon y recopilamos las EC_{50} y actividades máximas (Figura 54C). Como se puede apreciar en la Figura 54C, en base a los valores de EC_{50} , de menor a mayor, el orden de las nitronas de mayor a menor efectividad neuroprotectora fue el siguiente:

$$QN2 \leq QN3 \leq QN1 \leq QN4 \leq NAC \leq PBN \leq QN6 < QN5.$$

Estos resultados indican que solo la EC_{50} de **QN5** fue significativamente superior al resto de nitronas y **NAC**. Por otro lado, la comparación de las actividades máximas mostró el siguiente orden de potencia:

$NAC \gg PBN \geq QN3 \geq QN6 \geq QN1 \geq QN4 > QN5 > QN2$.

Este orden indica que las nitronas que mostraron un efecto menos neuroprotector fueron **QN5** y **QN2**, que tenían una MNA menor a la del resto de nitronas y a la de **NAC**.

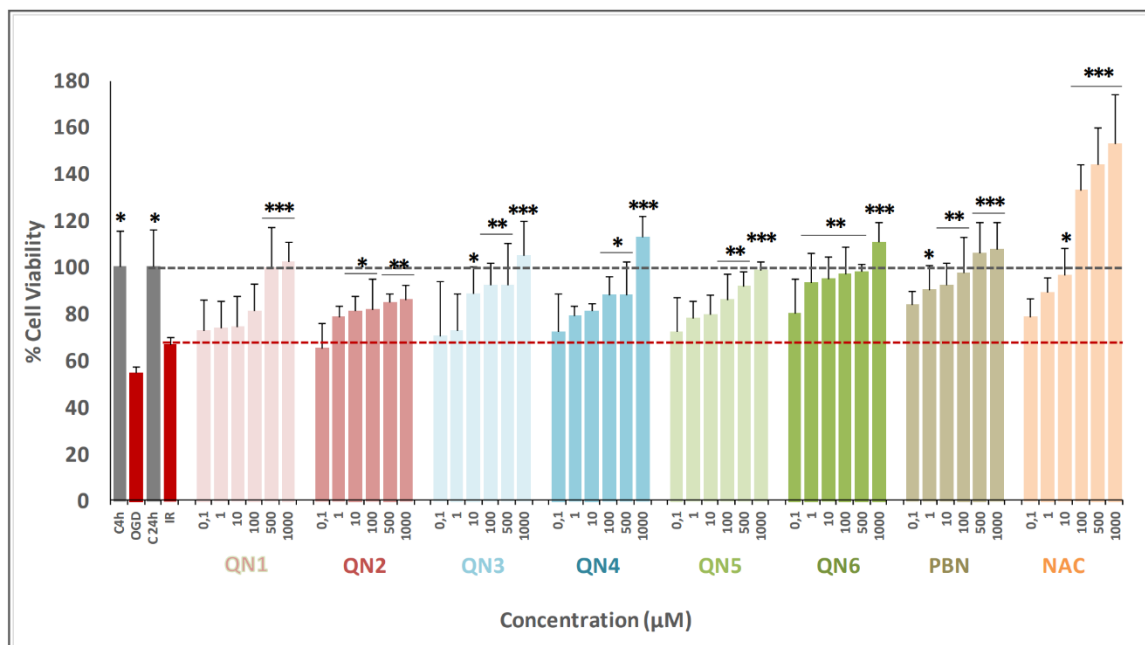


Figura 53. Efecto neuroprotector de las QNs 1-6, PBN y NAC en la actividad metabólica de células de neuroblastoma humano de la línea SH-SY5Y tras 4 h de OGD y 24 h de IR. Las barras muestran el porcentaje de viabilidad celular a las concentraciones de 0,1-1000 µM de QNs 1-6, PBN y NAC. Los valores representan la media \pm SEM de tres experimentos, repetidos por triplicado. La estadística compara las diferencias de los compuestos respecto a la condición de IR sola (línea roja discontinua) a * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$ (ANOVA de una vía, seguida de test de comparaciones múltiples de Holm-Sidak). La línea negra discontinua hace referencia a la viabilidad de los controles en condiciones basales.

Todas las QNs, a excepción de **QN5**, tienen una EC_{50} muy baja y similar, sin ser significativamente diferentes a las de **PBN** y **NAC**, a pesar de que en cuanto a MNA las **QNs 1, 2 y 4** obtuvieron valores inferiores a los compuestos de referencia, dejando a **QN3** y **QN6** como las nitronas más balanceadas en cuanto a capacidad neuroprotectora frente a la pérdida de viabilidad celular inducida por OGD e IR.

En cuanto a la SAR, a pesar de que la presencia de sustituyentes Cl y metoxi en el núcleo de la QN disminuye ligeramente los valores de EC_{50} obtenidos, esto también reduce su MNA, por lo que globalmente no aumenta significativamente su capacidad neuroprotectora. En cuanto a la presencia de sustituyentes *N-t*-Bu o *N-Bn* en el grupo nitrona, no se apreciaron diferencias en cuanto a la actividad neuroprotectora entre ambos

RESULTADOS

tipos de compuestos, salvo en el caso de las QNs que no tienen Cl en su estructura, como QN5 y QN6, donde el sustituyente *N*-Bn (QN6) parece conferir un valor más bajo de EC₅₀ y un valor más elevado de MNA.

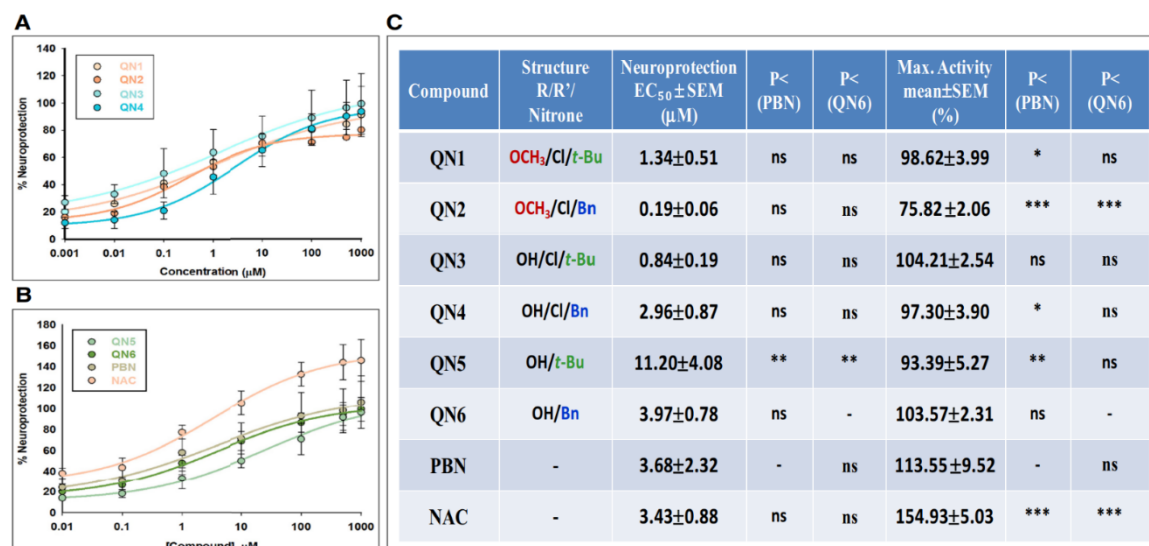


Figura 54. Efectos neuroprotectores de las QNs 1-6, PBN y NAC frente a la pérdida de capacidad metabólica inducida por IR en células de neuroblastoma humano SH-SY5Y. (A, B) Curvas dosis-respuesta que muestran el porcentaje de neuroprotección de las QNs 1-4 (A) y QNs 5-6, PBN y NAC (B) a concentraciones de 0,1-1000 μM. Los ajustes de la curva para la estimación de las EC₅₀ y MNA se llevaron a cabo mediante una regresión ponderada no lineal de mínimos cuadrados, usando curvas logísticas $f1 = \min + (\max - \min) / (1 + (x/EC_{50})^{-\text{pendiente}})$. Los datos representan la media ± SEM de cuatro experimentos, cada uno repetido por triplicado. El análisis se implementó con el programa SigmaPlot v.12. (C) Valores de EC₅₀ y MNA para los compuestos de estudio. La estadística compara las diferencias en EC₅₀ y MNA de los diferentes compuestos frente a PBN o a QN6, a *P < 0,05, **P < 0,01, ***P < 0,001, ns = no significativo (ANOVA de una vía y test de Holm-Sidak).

En resumen, todas las QNs tienen una potente capacidad neuroprotectora en términos de recuperación de la actividad metabólica celular. Sin embargo, las dos nitronas más balanceadas en términos de afinidad y eficacia fueron QN3 y QN6, la última de ellas con una EC₅₀ bastante baja (3,97 ± 0,78 μM), similar a la de PBN y NAC (3,68 ± 2,32 y 3,43 ± 0,88 μM, respectivamente), y una alta MNA de 103,57 ± 2,31%, similar a la de PBN (113,55 ± 9,52%). Por esta razón, y basados en los resultados de muerte celular necrótica y actividad antioxidante (ver apartados 5.1., 5.2. y 5.4. de “Resultados”), se decidió realizar comprobación estadística frente a este compuesto (Figura 54C).

5.2. Efecto de las QNs 1-6 en la muerte celular necrótica y apoptótica inducida por OGD-IR

Para investigar con mayor profundidad el mecanismo de neuroprotección ejercido por estas QNs, se estudió el efecto neuroprotector de las mismas frente a muerte celular necrótica y apoptótica, dos tipos de muerte celular muy importantes que tienen lugar en la isquemia cerebral. Para ello, tras realizar el tratamiento experimental con OGD e IR, se midió el porcentaje de liberación de la enzima citosólica LDH al medio extracelular midiendo su actividad en ambas condiciones (extra e intracelular), para estimar el grado de necrosis sufrida por cada una de las muestras.

En la Figura 55 se representan los valores obtenidos de la medida de liberación de LDH tras 4 h de OGD, seguida de 24 h de reperusión, añadiendo las QNs 1-6, sin olvidar los compuestos de referencia PBN y NAC, a 0,1-1000 μ M. A la vista de los resultados, se puede concluir que todas las QNs disminuyen significativamente la liberación de LDH de forma dependiente de la concentración, llegando a un 100% de inhibición a concentraciones entre 100 y 1000 μ M.

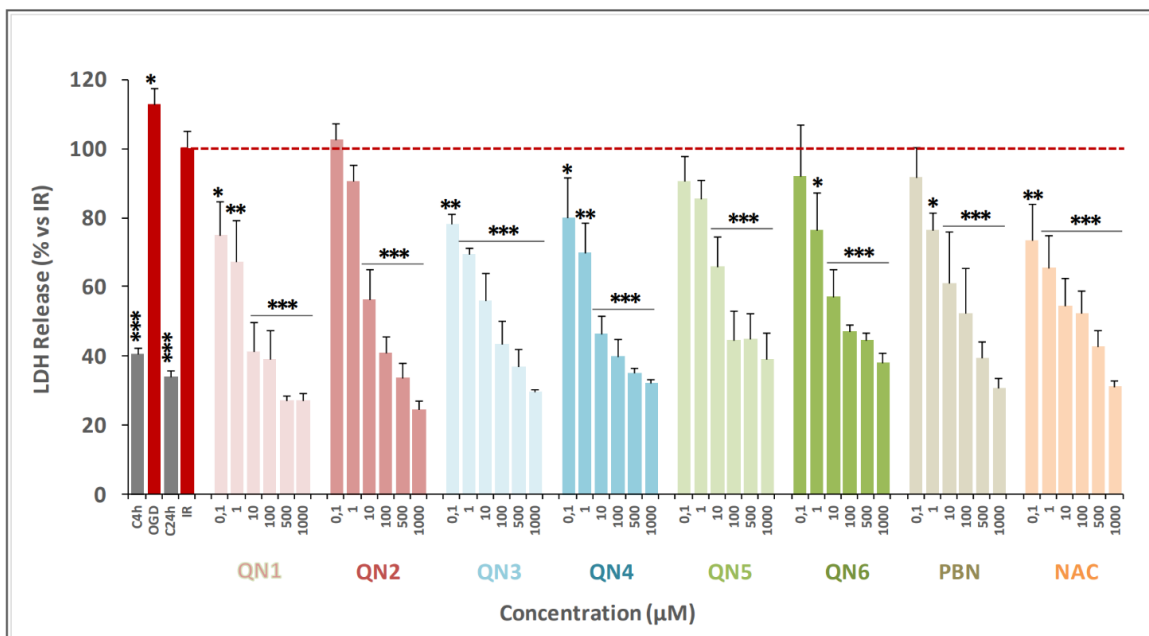


Figura 55. Efecto de las QNs 1-6, PBN y NAC en la liberación de LDH tras el tratamiento de OGD-IR en células SH-SY5Y. Las barras muestran el porcentaje de liberación de LDH tras 4 h de OGD y 24 h de IR, sin (IR) o con los compuestos de estudio a concentraciones de 0,1-1000 μ M. Los valores corresponden a la media \pm SEM de 4 experimentos, cada uno de ellos realizado por triplicado, y comparando el efecto de distintos compuestos frente a IR sola (línea roja discontinua). Los datos se analizaron estadísticamente mediante una ANOVA de una vía, seguida de un test de Holm-Sidak, a * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, y *** $P < 0,001$.

Para comparar la eficacia de estas nitronas en la disminución de la necrosis, se realizó el estudio dosis-respuesta determinando los valores de EC₅₀ y MNA. Así, en la Figura 56 se muestra el análisis de las curvas dosis-respuesta de las **QNs 1-6**, comparadas con **PBN** y **NAC**, en el rango de 0,1-1000 μM (Figura 56A, B), mostrando a continuación los correspondientes valores de EC₅₀ y actividades anti-necróticas máximas (Figura 56C).

Como se puede apreciar en la Figura 56C, en base a los valores de EC₅₀, de menor a mayor, el orden de las nitronas de mayor a menor eficacia anti-necrótica es el siguiente:

$$\mathbf{QN1} \leq \mathbf{QN4} \leq \mathbf{QN3} \leq \mathbf{NAC} \leq \mathbf{QN6} \leq \mathbf{QN2} < \mathbf{PBN} \leq \mathbf{QN5}.$$

Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre las MNA de los distintos compuestos, ya que el orden fue de:

$$\mathbf{PBN} \geq \mathbf{QN3} \geq \mathbf{NAC} \geq \mathbf{QN6} \geq \mathbf{QN1} \geq \mathbf{QN4} \geq \mathbf{QN2} \geq \mathbf{QN5}.$$

Dado que todos los valores de MNA de las **QNs** fueron muy similares entre sí y muy cercanos al 100% de neuroprotección, siendo el menor valor el de **QN5** (92,85 ± 2,24%), y dado que los valores de EC₅₀ son todos menores a 10 μM, se puede concluir que todas las **QNs** tienen un buen efecto anti-necrótico, en general. Sin embargo, las nitronas con mayor eficacia anti-necrótica fueron **QN1**, **QN3** y **QN4**, ya que presentaron los menores valores de EC₅₀, inferiores incluso a los de **NAC** y **PBN**, y además mostraron unas MNA muy similares a las del resto de nitronas. En cuanto a la actividad anti-necrótica de **QN6** hay que destacar que, a pesar de que posee una EC₅₀ ligeramente mayor a las de **QN1**, **QN4**, **QN3** y **NAC**, **QN6** demostró poseer uno de los mejores valores de MNA de su serie (Figura 56C). Es por ello que la **QN6** demostró ser una nitrona bastante balanceada en términos de su actividad anti-necrótica, lo que está en sintonía con los resultados obtenidos de viabilidad celular.

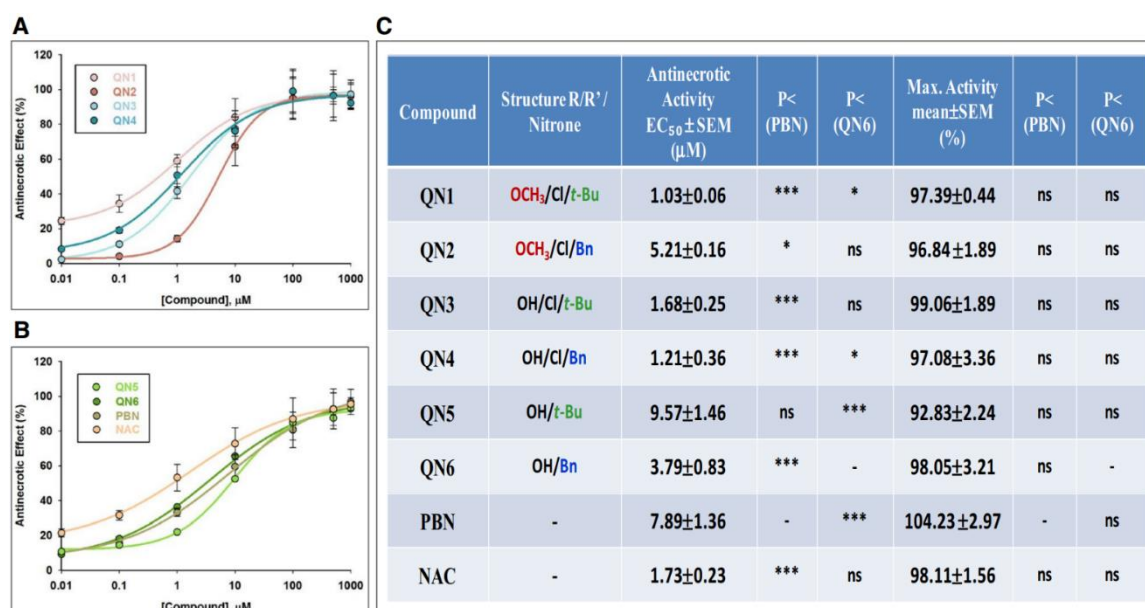


Figura 56. Efecto de las QNs 1-6, PBN y NAC en la liberación de LDH tras el tratamiento de OGD-IR en células SH-SY5Y. Las barras muestran el porcentaje de liberación de LDH tras 4 h de OGD y 24 h de IR, sin (IR) o con los compuestos de estudio a concentraciones de 0,1-1000 μM. Los valores corresponden a la media ± SEM de 4 experimentos, repetidos por triplicado, y comparando el efecto de distintos compuestos frente a IR sola (línea roja discontinua). Los datos se analizaron estadísticamente mediante una ANOVA de una vía, seguida de un test de Holm-Sidak, a *P < 0,05, **P < 0,01, y ***P < 0,001.

Teniendo todos estos resultados en cuenta, y desde el punto de vista de la SAR, éstas son las conclusiones más significativas, al comparar con los resultados de capacidad metabólica:

- Las QNs con mayor capacidad anti-necrótica (respecto a EC₅₀) son aquellas que contienen Cl y metoxi como sustituyentes en el anillo quinolina, a excepción de QN2, que obtuvo la mayor EC₅₀, pero la menor MNA en viabilidad celular. Las QNs 5 y 6, sin Cl en su estructura, muestran un efecto anti-necrótico más leve que el resto de compuestos; de hecho, QN5 tiene el valor más alto de EC₅₀ y el menor de MNA, siendo por tanto la peor nitrona de la serie, mientras que QN6 se comporta de forma balanceada en términos de ambos parámetros, igual que se mostraba en los estudios de viabilidad celular con XTT.
- Igual que ocurría en el estudio de la capacidad metabólica, los sustituyentes N-t-Bu o N-Bn no afectan significativamente a la actividad anti-necrótica de las nitronas, a pesar de que en el grupo de nitronas que no tienen Cl en su estructura, QN5 y QN6, el sustituyente N-Bn consigue un potencial anti-necrótico mayor, de

manera similar a como ocurría en los experimentos de viabilidad celular (menor EC_{50} y mayor MNA para QN6 respecto a QN5).

En conclusión, todas las QNs tienen un potente efecto anti-necrótico, siendo QN1, QN3, QN4 y QN6 las más potentes y balanceadas, demostrando un efecto anti-necrótico similar al de NAC y mejor al de su molécula madre, PBN.

A continuación, para evaluar la extensión de la muerte celular de tipo apoptótico en las condiciones isquémicas, se determinó la actividad de la caspasa-3, empleando el sustrato Ac-DEVD-AMC. Tras 4 h de OGD y 24 h de IR con o sin presencia de QNs, PBN y NAC, a concentraciones en el rango de 0,1-1000 μ M, las células se lisaron, se añadió el sustrato y se midió la intensidad de fluorescencia.

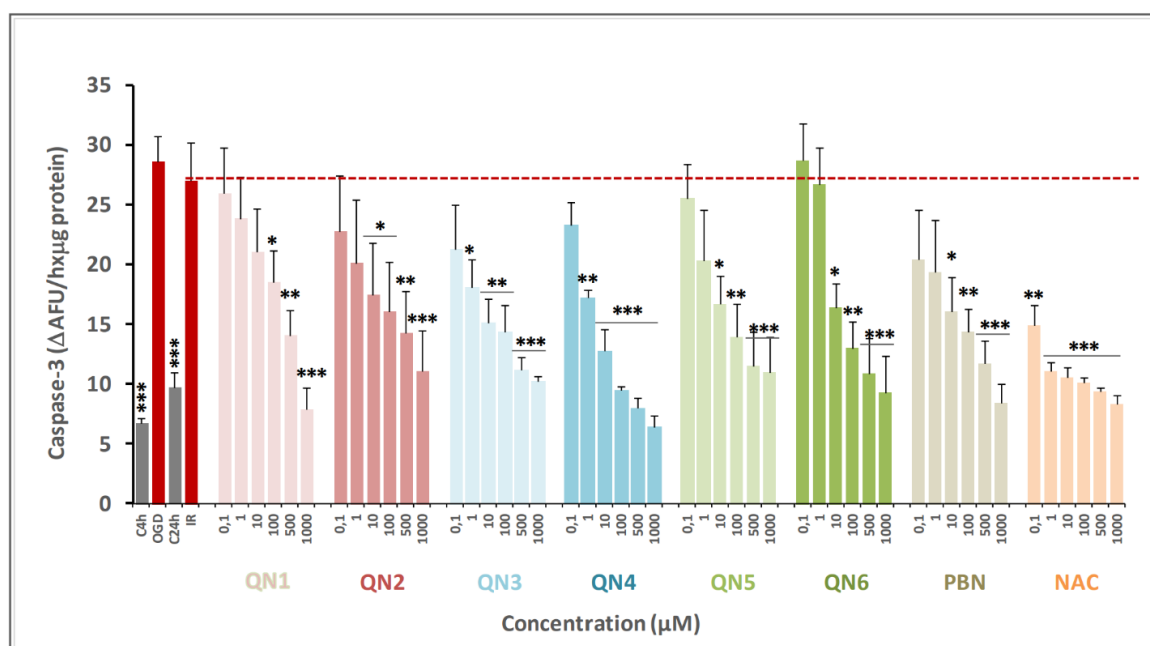


Figura 57. Efectos neuroprotectores de QNs 1-6, PBN y NAC frente a muerte celular apoptótica inducida por OGD-IR en células SH-SY5Y. Las barras muestran la actividad de la caspasa-3 (Δ AFU/min/ μ g proteína) tras 4 h de OGD y 24 h de IR, sin tratamiento (IR) o con los compuestos QNs 1-6, PBN y NAC, a concentraciones de 0,1-1000 μ M. Los valores representan la media \pm SEM de 3 experimentos, cada uno repetido por triplicado. La estadística compara las diferencias en actividad caspasa-3 de los diferentes compuestos respecto a IR sola, a * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, y *** $P < 0,001$ (ANOVA de una vía y test de comparaciones múltiples de Holm-Sidak). AFU = unidades arbitrarias de fluorescencia.

La Figura 57 muestra cómo todas las QNs presentaron un buen efecto anti-apoptótico dependiente de la concentración. Sin embargo, cabe destacar que este efecto se consiguió a concentraciones mayores que el efecto anti-necrótico. De hecho, las nitronas que no

tienen Cl en su estructura (**QN5** y **QN6**) mostraron un efecto anti-apoptótico ligeramente mejor que su efecto anti-necrótico.

Para poder comparar el orden de eficacia de estas nitronas frente a la apoptosis, se realizó un estudio dosis-respuesta y se determinaron las EC_{50} y MNA de cada compuesto. Así, en la Figura 58 se han agrupado tanto las curvas dosis-respuesta de las QNs, comparándose con las de PBN y NAC, en el rango de 0,1-1000 μ M (Figura 58A, B), como los valores de EC_{50} y actividades anti-apoptóticas máximas (Figura 58C).

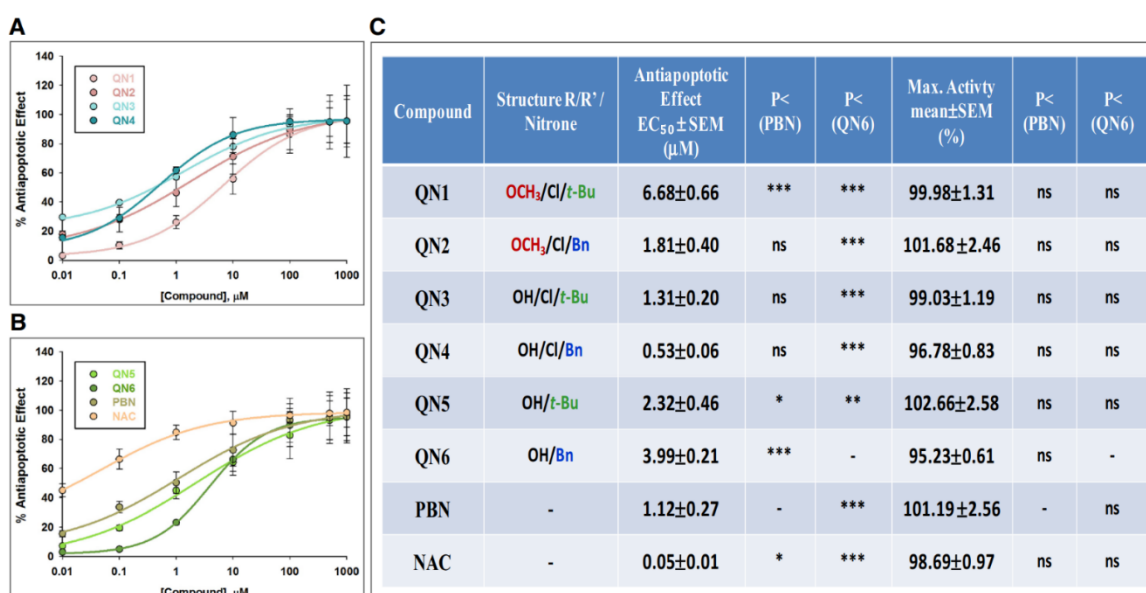


Figura 58. Efectos neuroprotectores de las QNs 1-6, PBN y NAC frente a la muerte apoptótica inducida por el tratamiento de OGD-IR en células de neuroblastoma humano SH-SY5Y. (A, B) Curvas dosis-respuesta que muestran el porcentaje de neuroprotección de distintos compuestos: QNs 1-4 (A) y QNs 5-6, PBN y NAC (B) a concentraciones de 0,1-1000 μ M. El ajuste de la curva para estimar los valores de EC_{50} y MNA se realizó como se describe en el apartado 2.7. de "Materiales y métodos". Los datos representan la media \pm SEM de 3 experimentos, repetidos por triplicado. El análisis se implementó con el software SigmaPlot v.12. (C) Valores de EC_{50} y MNA de los compuestos. La estadística compara las diferencias en EC_{50} y MNA de los distintos compuestos frente a PBN o QN6 a * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$ y ns = no significativo (ANOVA de una vía y test de Holm-Sidak).

Como se muestra en la Figura 58C, en base a los valores de EC_{50} , de menor a mayor, las nitronas siguen el orden:

$$NAC \lll QN4 \leq PBN \leq QN3 \leq QN2 \leq QN5 \leq QN6 \leq QN1.$$

En cambio, no se encontraron diferencias significativas en cuanto a MNA, aunque se aprecia la siguiente tendencia, de mayor a menor actividad anti-apoptótica máxima:

$$\text{QN5} \geq \text{QN2} \geq \text{PBN} \geq \text{QN1} \geq \text{QN3} \geq \text{NAC} \geq \text{QN4} \geq \text{QN6}.$$

En otras palabras, todas las nitronas tuvieron una MNA muy elevada, siendo **QNs 4, 3 y 2** las más elevadas, similares a **PBN**, aunque con mayor EC_{50} que **NAC**, que mostró el valor de EC_{50} más bajo de todos.

Teniendo en cuenta todos estos resultados, y desde el punto de vista de la SAR, encontramos las siguientes diferencias frente al efecto anti-necrótico y de actividad metabólica:

- Los efectos anti-necróticos y anti-apoptóticos de las distintas **QNs** influyen en el estado metabólico celular de distinta manera. Por ello, las **QNs** con el mayor efecto anti-necrótico (menor EC_{50} y mayor actividad máxima), **QN1**, **QN3**, **QN4** y **QN6**, también demostraron ser las mejores en la recuperación de la actividad metabólica, y por ello, pueden ser consideradas como las nitronas más neuroprotectoras. En cambio, las **QNs** con menor actividad anti-necrótica, **QN2** y **QN5**, demostraron ser las peores neuroprotectoras. Esta conclusión no es sorprendente, porque **QN2** y **QN5** tienen una muy buena capacidad anti-apoptótica, pero eso no se refleja en el efecto neuroprotector final. Por eso, el aumento en viabilidad celular inducida por las **QNs** parece más dependiente del efecto anti-necrótico que del anti-apoptótico.
- De manera similar a lo que ocurría con los ensayos de viabilidad y necrosis celular, los sustituyentes *N-t*-Bu y *N*-Bn no afectan significativamente a la actividad anti-apoptótica de las **QNs**. Sin embargo, entre las **QNs** con Cl en su estructura, el sustituyente *N*-Bn (**QN2** y **QN4**), y no *N-t*-Bu (**QN1** y **QN3**), confiere un mayor potencial anti-apoptótico (menor EC_{50}). Además, para las **QNs** sin Cl (**QN5** y **QN6**), al contrario de lo que apuntaban los resultados de viabilidad y anti-necrosis, es el sustituyente *N-t*-Bu (**QN5**), y no el *N*-Bn (**QN6**), el que confiere una menor EC_{50} y mayor MNA.

En resumen, todas las **QNs** tienen una buena actividad anti-apoptótica, siendo las **QNs 2, 4 y 5** las mejores de su grupo y las más balanceadas, con un poder anti-apoptótico similar al de **PBN**, aunque menor al de **NAC**. Así, los efectos anti-necróticos o anti-apoptóticos

de estos compuestos parecen tener un efecto clave sobre la actividad metabólica celular ejercida por los mismos.

5.3. Neurotoxicidad basal de las QNs 1-6

Dados los prometedores resultados obtenidos en cuanto a neuroprotección a distintos niveles (actividad metabólica, necrosis y apoptosis) por las QNs, se ensayó la neurotoxicidad de las QNs 1-6 empleando el test de viabilidad celular XTT (ver apartado 5.1. de “Resultados”), sin añadir ningún tratamiento tóxico.

Como se puede ver en la Figura 59, las QNs 3, 4 y 5, y PBN, presentaron una neurotoxicidad basal de un 5-10% a la máxima concentración empleada en los ensayos (1000 μ M), mientras que las QNs 4 y 5 también presentaron una disminución de la viabilidad celular en condiciones basales a 500 μ M. Este pequeño efecto neurotóxico se tuvo en cuenta para el cálculo del efecto neuroprotector que veíamos en apartados anteriores.

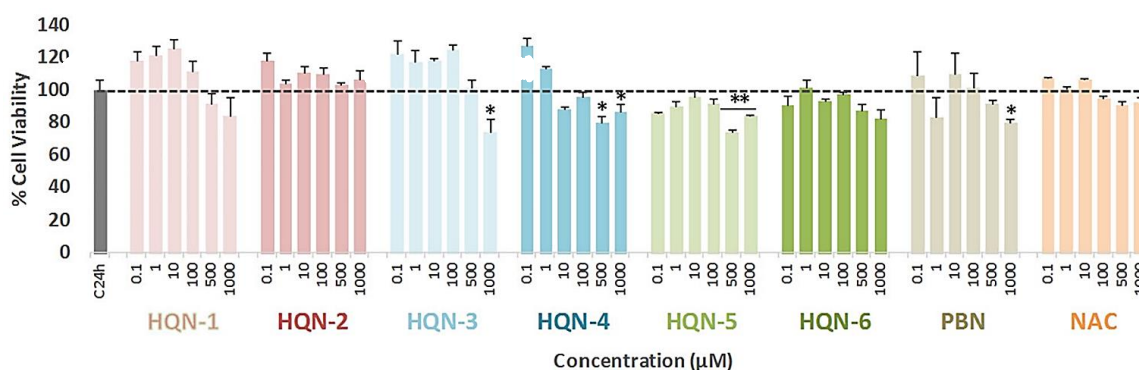


Figura 59. Efecto de las QNs 1-6, PBN y NAC en la viabilidad de células de neuroblastoma humano SH-SY5Y en condiciones basales. Las barras representan el porcentaje de viabilidad celular en presencia de los compuestos a concentraciones de 0,1-1000 μ M. La viabilidad de las células sin tratar (C24h) fue considerada el 100% ($100 \pm 5,52\%$, media \pm SEM). Los valores son la media \pm SEM de 5 experimentos, cada muestra repetida por triplicado. La estadística se realizó mediante ANOVA de una vía y posteriormente un test de comparaciones múltiples de Holm-Sidak, a * $P < 0,05$ y ** $P < 0,01$. No hay diferencias muy significativas respecto al control. El análisis estadístico de los resultados por encima del 100% no se muestra.

5.4. Capacidad antioxidante de QNs 1-6: producción de $O_2^{\cdot-}$ en células SH-SY5Y

Los resultados de las secciones anteriores nos llevaron a investigar si el efecto neuroprotector observado era consecuencia de la capacidad de estos compuestos de actuar como antioxidantes y eliminadores de ROS, particularmente de anión superóxido

(O₂[•]). La detección de O₂[•] se realizó mediante DHET, tras 3 h de OGD y 3 h de IR, con o sin **QNs 1-6**, **PBN** y **NAC**, empleando concentraciones de 0,1-1000 μM, durante IR.

Como se muestra en la Figura 60, el nivel de producción del ROS tras IR (0,277 ± 0,009 AFU/min/100.000 células, 100 ± 3,47% de liberación de ROS; media ± SEM; n = 6) fue menor, pero no significativamente, a la producción de ROS por OGD (0,297 ± 0,008 AFU/min/100.000 células, 107,55 ± 4,35% de liberación de ROS; media ± SEM; n = 6). Como cabía esperar, todas las **QNs** fueron capaces de reducir parcial o totalmente el incremento en los niveles de ROS, de forma dependiente de la concentración.

De acuerdo con el análisis de las curvas dosis-respuesta (Figura 61A, B) y los cálculos de los valores de EC₅₀ y actividad antioxidante máxima (MAA) de las **QNs**, **PBN** y **NAC** (Figura 61C), en base a los valores de EC₅₀, de menor a mayor, el orden de las nitronas de mayor a menor poder antioxidante es el siguiente:

$$\text{PBN} \leq \text{NAC} \leq \text{QN6} < \text{QN5} < \text{QN4} \leq \text{QN2} < \text{QN1} < \text{QN3}.$$

Por otro lado, se encontraron diferencias significativas en la MAA de las distintas nitronas, valores que mostraron el siguiente orden de potencia:

$$\text{NAC} \geq \text{QN6} \geq \text{PBN} \geq \text{QN3} > \text{QN5} > \text{QN1} \geq \text{QN4} \geq \text{QN2}.$$

Así, se aprecia que las **QNs** difieren bastante en cuanto a su capacidad antioxidante, tanto en términos de EC₅₀ como de MAA. En este caso, y a diferencia de lo que ocurría en apartados anteriores, las nitronas más antioxidantes fueron **QN6** y **QN5**, que no poseen un átomo de Cl en su estructura. En concreto, **QN6** demostró la mayor potencia antioxidante, en el mismo rango que **PBN** y **NAC**, dada su baja EC₅₀ y muy elevada MAA.

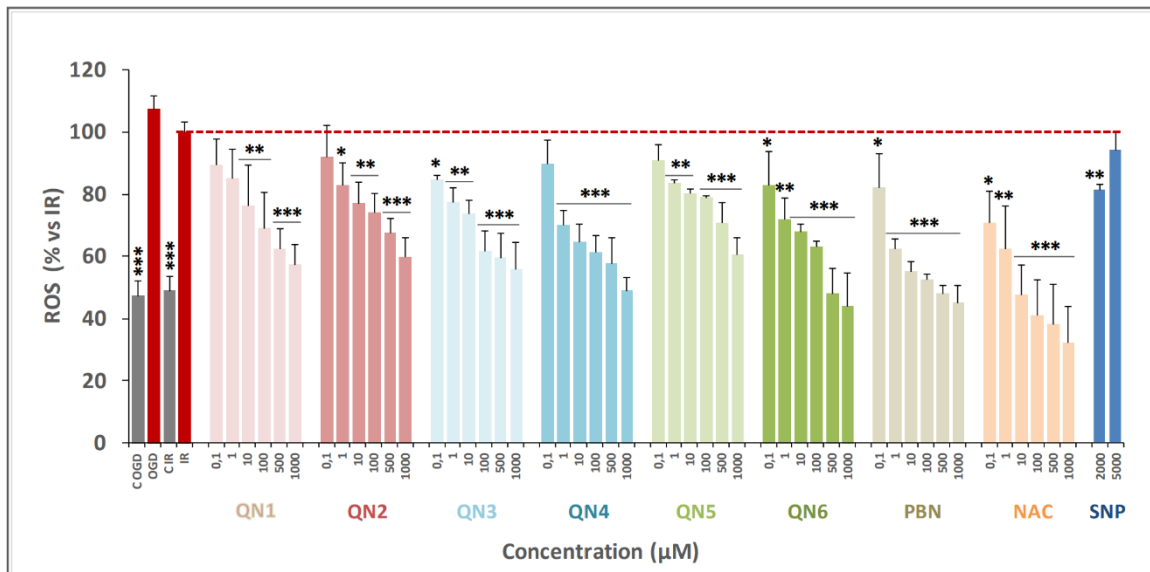


Figura 60. Efectos inhibitorios en la producción de ROS (superóxido) de QNs 1-6, PBN y NAC en las células SH-SY5Y expuestas a 3 h de OGD y 3 h de reperusión. Las barras muestran el porcentaje de ROS formado tras OGD e IR, con o sin las nitronas QN 1-6, PBN y NAC, a las concentraciones de 0,1-1000 μM. Los valores corresponden a la media ± SEM de 3 experimentos, cada muestra repetida por triplicado. El valor de ROS en condiciones basales (C IR) se calcularon como 0,135 ± 0,023 (mean ± SEM) AFU/min/100.000 célula. La estadística compara el efecto de IR frente a los controles o a los diferentes compuestos, a *P < 0,05, **P < 0,01, ***P < 0,001 (ANOVA de una vía, seguida del test de comparaciones múltiples de Holm-Sidak).

Teniendo en cuenta el punto de vista de la SAR, se puede concluir que la actividad antioxidante está íntimamente ligada a la estructura de las QNs, siendo las que no poseen Cl en su estructura (QN5 y QN6) las de mayor potencia, seguidas por aquellas que contienen OH y Cl (QN3 y QN4) en su estructura base, mientras que los peores antioxidantes son aquellos con grupos metoxi y Cl (QN1 y QN2). Además, respecto a la influencia de los sustituyentes *N-t*-Bu y *N-Bn*, son las nitronas con grupo *N-Bn* (QN6, QN4 y QN2) las que presentaron mayor capacidad antioxidante.

En resumen, de forma distinta a lo que ocurría con las actividades anti-necróticas y anti-apoptóticas de los compuestos, las MAA más elevadas se observaron en las QNs sin Cl en su estructura, en concreto en QN6, siendo esta nitrona la más balanceada en cuanto a las actividades ensayadas, con una buena capacidad neuroprotectora en cuanto a

metabolismo celular, a protección frente a necrosis y a efecto antioxidante por eliminación de $O_2^{\cdot-}$ en células de neuroblastoma humano SH-SY5Y.

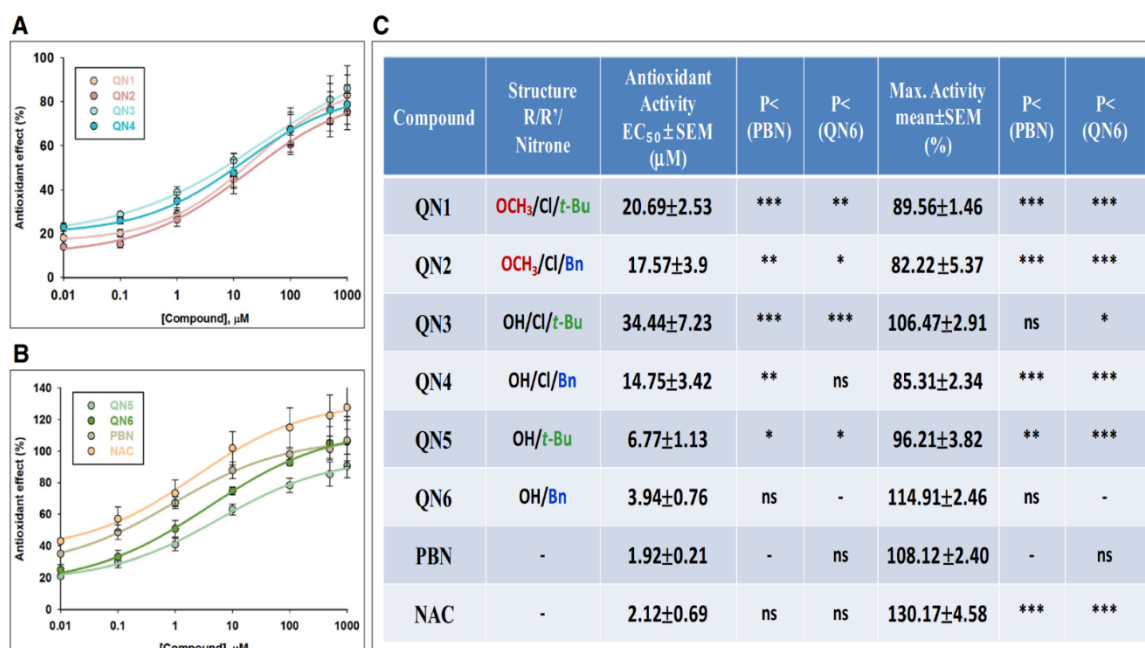


Figura 61. Efecto antioxidante de QNs 1-6, PBN y NAC tras el tratamiento con OGD e IR en células SH-SY5Y. (A, B) Curvas dosis-respuesta que muestran el porcentaje de efecto antioxidante de los distintos compuestos de 0,1-1000 μM. Los ajustes de la curva se realizaron como se describe en el apartado 2.7 de “Materiales y métodos”. Los datos representan la media ± SEM de 3 experimentos, cada muestra repetida por triplicado. El análisis se implementó usando el software SigmaPlot v.12. (C) Valores de EC₅₀ y actividades antioxidantes máximas (MAA) de los compuestos indicados, La estadística compara las diferencias en EC₅₀ y MAA de los distintos compuestos frente a PBN o QN6 a *P < 0,05, **P < 0,01, ***P < 0,001, y ns = no significativo (ANOVA de una vía y test de Holm-Sidak).

5.5. Contribución de QN6 a la prevención del daño cerebral

Para corroborar el efecto neuroprotector de la QN6 en modelos basados en isquemia, se indujo una Oclusión permanente de la Arteria Cerebral Media (pMCAO) (Colak et al., 2011), y se evaluó el tamaño del infarto en ratones tratados con inyección intraperitoneal de QN6 a las 48 h tras la pMCAO. El procedimiento pMCAO se llevó a cabo en colaboración con el grupo del Dr. Ricardo Martínez Murillo (Instituto Cajal, CSIC), y se analizó mediante Imágenes de Resonancia Magnética (MRI) para determinar la contribución de QN6 a la prevención del daño cerebral.

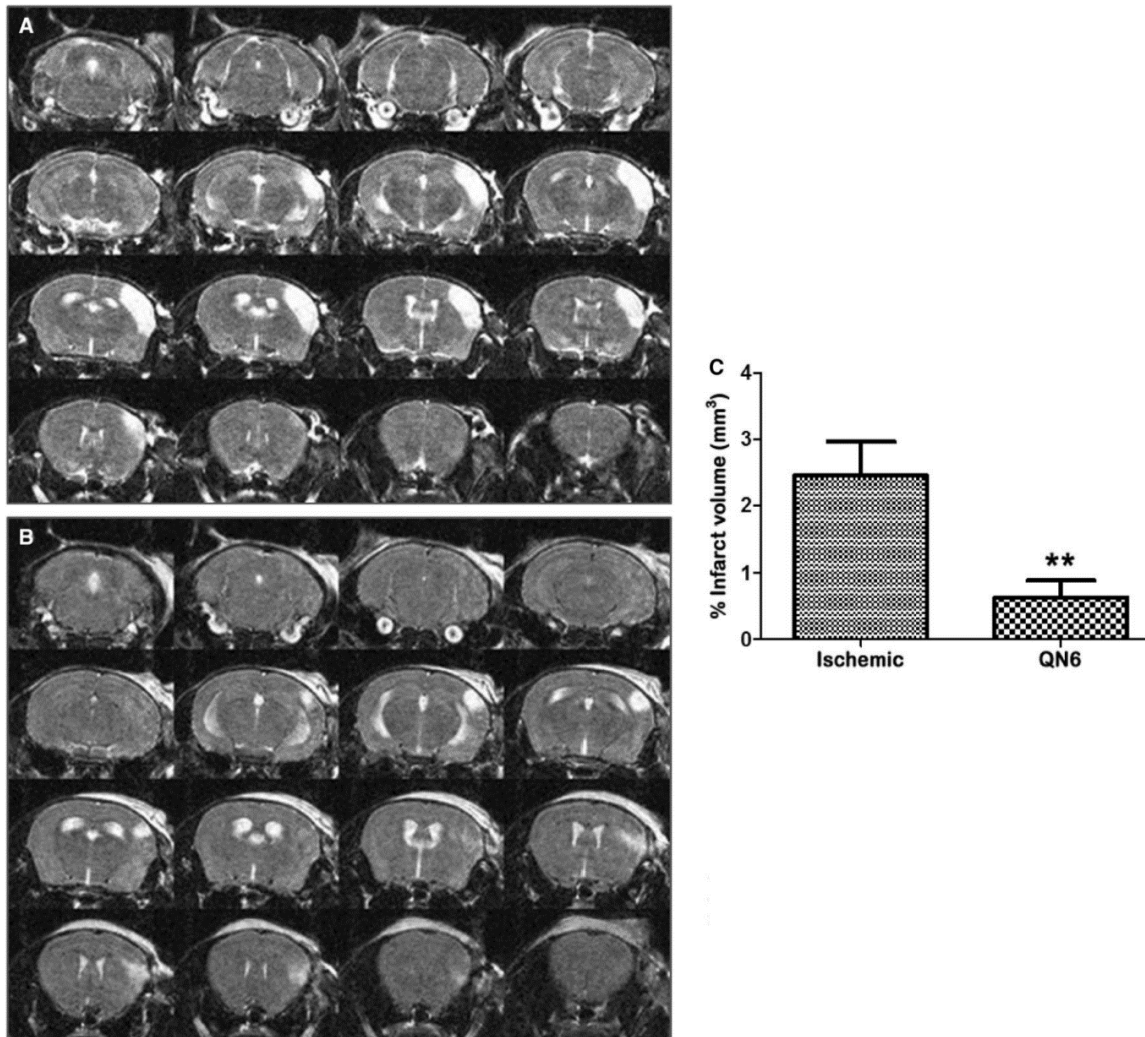


Figura 62. Estudio MRI de QN6 tras 48 h de la cirugía pMCAO. Se puede observar gracias al método de hiperintensidad T2WI que la lesión está restringida al lado izquierdo de la corteza cerebral. El tratamiento con QN6 disminuye el volumen de infarto tras pMCAO en ratones. Las imágenes T2WI (secuencia ponderada en T2) obtenidas del grupo tratado con vehículo (grupo b) (Figura 62A) y del grupo tratado con QN6 (grupo c) (Figura 62B) se seleccionaron de ratones isquémicos elegidos al azar. Los volúmenes de infarto se cuantificaron a partir de las imágenes secuenciales de T2WI, usando el software ImageJ (Figura 62C). El gráfico representa el porcentaje de volumen de infarto respecto al total de volumen del cerebro. Los datos corresponden a la media \pm SEM, de $n = 7-8$. La significación estadística se evaluó mediante el test de ANOVA de doble vía seguido del test de Bonferroni, para comparar los puntos experimentales pareados (** $P < 0,01$).

El experimento comparó el volumen de infarto resultante entre los grupos b y c (Figura 62A y B). El grupo de animales control de cirugía simulada o *sham* (grupo a) mostró que el ictus no se debía al procedimiento quirúrgico previo a la oclusión (datos no mostrados). Los volúmenes de infarto, mostrados en mm^3 , se obtuvieron integrando las áreas infartadas mediante el conteo de píxeles que contenían las regiones de interés. Se tomaron muestras de cada lado de las secciones coronales. Comparando los volúmenes de infarto

respecto a los animales tratados con vehículo (grupo b), el grupo tratado con **QN6** (grupo c) experimentó una reducción significativa en el porcentaje de volumen de infarto cerebral ($75,21 \pm 5,31\%$; $P < 0,01$) (Figura 62C). En relación al volumen cerebral total, el volumen de infarto del grupo b representó el 2,453%, mientras que el del grupo c descendió hasta el 0,6262%.

Estos resultados, por tanto, permiten afianzar las propiedades neuroprotectoras del compuesto **QN6** *in vivo*, y no solo en modelos celulares.

6. Propiedades neuroprotectoras y antioxidantes de la colesteronitrona ChN2 y la quinolil-nitrona QN23

En el grupo de investigación, se ha trabajado en la síntesis y caracterización biológica de numerosas nitronas para el tratamiento del ictus isquémico y otras enfermedades de la edad, entre ellas, la colesteronitrona 2 (**ChN2**) (Figura 16) (Martínez-Alonso et al., 2020; Ayuso et al., 2015), y la quinolil-nitrona 23 (**QN23**) (Figura 16) (Chioua et al., 2012; Chioua et al., 2019; Chamorro et al., 2023a; Martínez-Alonso et al., 2022), habiendo mostrado un alto potencial gracias a su habilidad para reducir el tamaño de la lesión cerebral en un modelo *in vivo* de isquemia focal transitoria. Así, **ChN2** reducía el volumen de infarto en un 21%, mientras que **QN23** lo disminuía en un 44%, cuando se administraban a distintas dosis (0,05-1 mg/kg de **ChN2**, y 1,5-2 mg/kg de **QN23**) en ratones que habían sido sometidos a oclusión transitoria de la arteria cerebral media (tMCAO) (Chioua et al., 2019; Martínez-Alonso et al., 2020). Además, estas nitronas mejoran la función neurológica y la capacidad motora en animales sometidos a este procedimiento de ictus isquémico (Martínez-Alonso et al., 2020; Chioua et al., 2019; Martínez-Alonso et al., 2022), actuando como atrapadores de ROS (Ayuso et al., 2015; Chioua et al., 2019), y aumentan la viabilidad celular reduciendo la apoptosis en cultivos primarios de neuronas (Ayuso et al., 2015) y en rodajas cerebrales de ratón (Martínez-Alonso et al., 2020).

Por otro lado, otra de las nitronas más prometedoras que además se ha caracterizado en este trabajo fue la homo-*bis*-nitrona 6 (**HBN6**), que además de presentar las mejores propiedades neuroprotectoras y antioxidantes *in vitro* de toda la serie de **HBNS**, reducía en un 90% el volumen de infarto cuando se administraba en un modelo de pMCAO ([Chamorro et al., 2020](#)). En particular, **HBN6** era capaz de revertir el descenso en la actividad metabólica neuronal causada por isquemia de forma muy eficaz ($EC_{50} = 1,24 \pm 0,39 \mu\text{M}$), actuaba como un potente atrapador de radical hidroxilo (OH^\cdot) *in vitro*, y reducía la producción de anión $\text{O}_2^{\cdot-}$ en cultivos de células de neuroblastoma humano ($EC_{50} = 5,91 \pm 1,09 \mu\text{M}$ y $\text{MAA} = 95,8 \pm 3,6\%$) ([Chamorro et al., 2020](#)).

Dados los prometedores resultados de estos compuestos en modelos de isquemia cerebral, en este trabajo de investigación se han investigado más a fondo las propiedades neuroprotectoras y antioxidantes de **ChN2**, **QN23** y **HBN6** para analizar

comparativamente su contribución a la inhibición de la muerte celular necrótica, apoptótica y de producción de ROS frente a isquemia cerebral, sin olvidar la comparación de dichas propiedades con las de **PBN**, la nitrona madre de todas ellas, y las de **NAC**, la molécula conocida por su elevado poder antioxidante. Los resultados neuroprotectores y antioxidantes obtenidos en este estudio se han publicado recientemente ([Chamorro et al., 2023b](#)).

6.1. Perfil neuroprotector de ChN2, QN23 y HBN6: efecto sobre la viabilidad celular o actividad metabólica

Para la evaluación de las propiedades neuroprotectoras de las nitronas designadas (**ChN2**, **QN23** y **HBN6**) más los compuestos de referencia (**PBN** y **NAC**), se empleó el modelo de estrés oxidativo (O/R) y el modelo de isquemia-reperfusión (IR), en el que las células sometidas a OGD después experimentan una perfusión. En ambos modelos se empleó el test de XTT para evaluar la actividad metabólica celular tras los tratamientos tóxicos y la adición de los compuestos de ensayo.

Tras el tratamiento con O/R, se produjo una reducción en la actividad metabólica (descenso en la viabilidad de un $33,10 \pm 2,90\%$, media \pm SEM; n = 4) (Figura 63A), mientras que tras la exposición de las células a OGD se produjo un mayor descenso en la viabilidad de las células SH-SY5Y ($57,55 \pm 2,88\%$, media \pm SEM; n = 4). Sin embargo, tras 24 h de perfusión, la viabilidad celular aumentó hasta llegar a un 72% aproximadamente ($72,12 \pm 2,88\%$ de viabilidad celular, media \pm SEM; n = 4) (Figura 63B).

Los cinco compuestos evaluados demostraron potentes efectos neuroprotectores, revirtiendo el descenso en la viabilidad celular producido por O/R y por OGD-IR de forma dosis-dependiente, prácticamente a todas las concentraciones de ensayo. Lo más interesante de estos resultados fue que **ChN2** y **QN23** demostraron los mayores efectos neuroprotectores frente a la toxicidad generada por O/R (Figura 63A), incluso a la menor concentración de ensayo, de $0,001 \mu\text{M}$. En el modelo de IR, **ChN2** y **QN23** mostraron un amplio rango de eficacia neuroprotectora ($0,1\text{-}1000 \mu\text{M}$), pero su efecto a altas concentraciones parecía ser menor al ejercido por el resto de compuestos ensayados (Figura 63B).

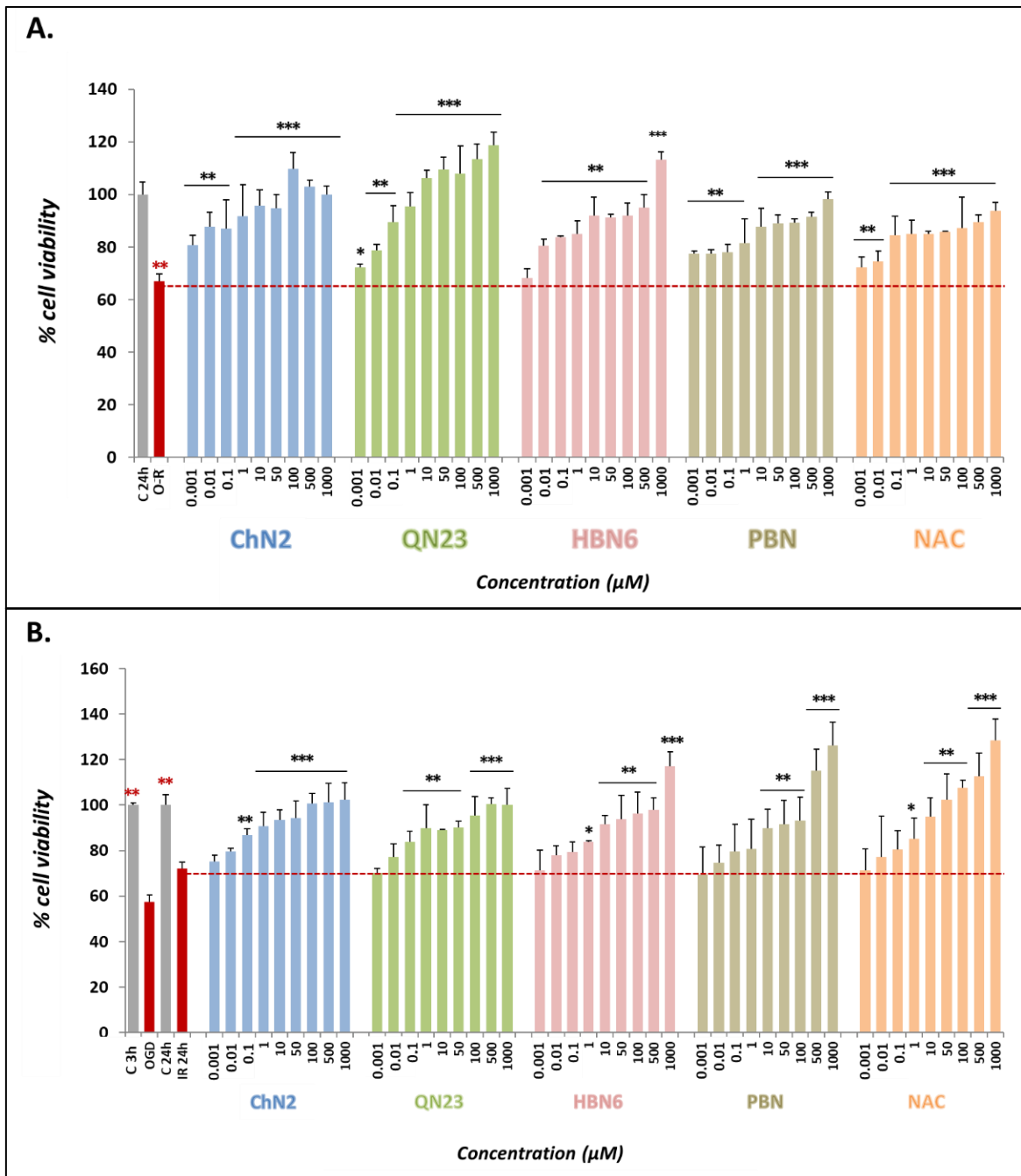


Figura 63. Efectos neuroprotectores de ChN2, QN23, HBN6, PBN y NAC frente a la pérdida de capacidad metabólica inducida por oligomicina-rotenona (O/R) (A) y privación de oxígeno y glucosa (OGD) de 3 h seguida de 24 h de reperusión (IR) (B) en células de neuroblastoma humano SH-SY5Y. Las barras representan el porcentaje de viabilidad celular a las concentraciones de 0,001-1000 µM. Los valores corresponden a la media ± SEM de cuatro experimentos, cuyas muestras se repitieron por triplicado. Los asteriscos negros (***) muestran las diferencias significativas en viabilidad entre los compuestos y la exposición a O/R (A) o IR (B), en ausencia de compuestos. Los asteriscos rojos (***) muestran las diferencias significativas en viabilidad celular entre los modelos de O/R (A), OGD e IR (B) respecto a sus respectivos controles (C3h y C24h). La significación se calculó mediante el test de ANOVA de una vía seguido del test de comparaciones múltiples de Holm-Sidak, a*P < 0,05, **P < 001 y ***P < 0,001.

A continuación, se determinó su EC₅₀ y actividad neuroprotectora máxima (MNA) como indicadores de su eficacia y potencia (Figura 64). En base a los valores de EC₅₀ de los compuestos frente a la toxicidad por O/R, el orden de las nitronas, de menor a mayor EC₅₀, y de más a menos neuroprotectoras, fue el siguiente:

$$\text{QN23} \leq \text{ChN2} \leq \text{NAC} \leq \text{HBN6} \lll \text{PBN}.$$

Estos datos muestran que en el modelo de estrés oxidativo, ChN2 y QN23 tienen valores EC₅₀ muy similares a los de NAC y HBN6, pero son significativamente menores al de PBN, por tanto se puede afirmar que PBN demuestra la menor eficacia neuroprotectora de todos los compuestos ensayados. Por otro lado, en base a los valores de MNA del modelo de O/R, el orden de las nitronas más neuroprotectoras a menos fue el siguiente:

$$\text{NAC} = \text{QN23} \geq \text{HBN6} \geq \text{ChN2} \geq \text{PBN}.$$

Este orden implica la ausencia de diferencias significativas en la potencia de los distintos compuestos.

Por otro lado, en condiciones de IR (Figura 64B y C), en base a los valores de EC₅₀, el orden de las nitronas, de menor a mayor EC₅₀, y mayor a menor capacidad neuroprotectora, fue el siguiente:

$$\text{ChN2} \leq \text{NAC} \leq \text{HBN6} \leq \text{QN23} \lll \text{PBN}.$$

Así se muestra que, de nuevo, ChN2, QN23, HBN6 y NAC tuvieron valores similares, y significativamente menores al de PBN. En cuanto a la comparación de MNA, el orden de potencia de mayor a menor fue el siguiente:

$$\text{NAC} > \text{PBN} \geq \text{HBN6} > \text{ChN2} > \text{QN23}.$$

Esto indica que, en condiciones de IR, ChN2 y QN23 son los compuestos menos potentes en términos de su MNA.

Todos estos resultados confirman la eficacia de ChN2 y QN23 a bajas concentraciones, mientras que su capacidad de aumentar la viabilidad celular disminuye a concentraciones altas. Además, esto demuestra que estas nitronas son agentes potentes y efectivos sobre todo frente a toxicidad por estrés oxidativo (O/R).

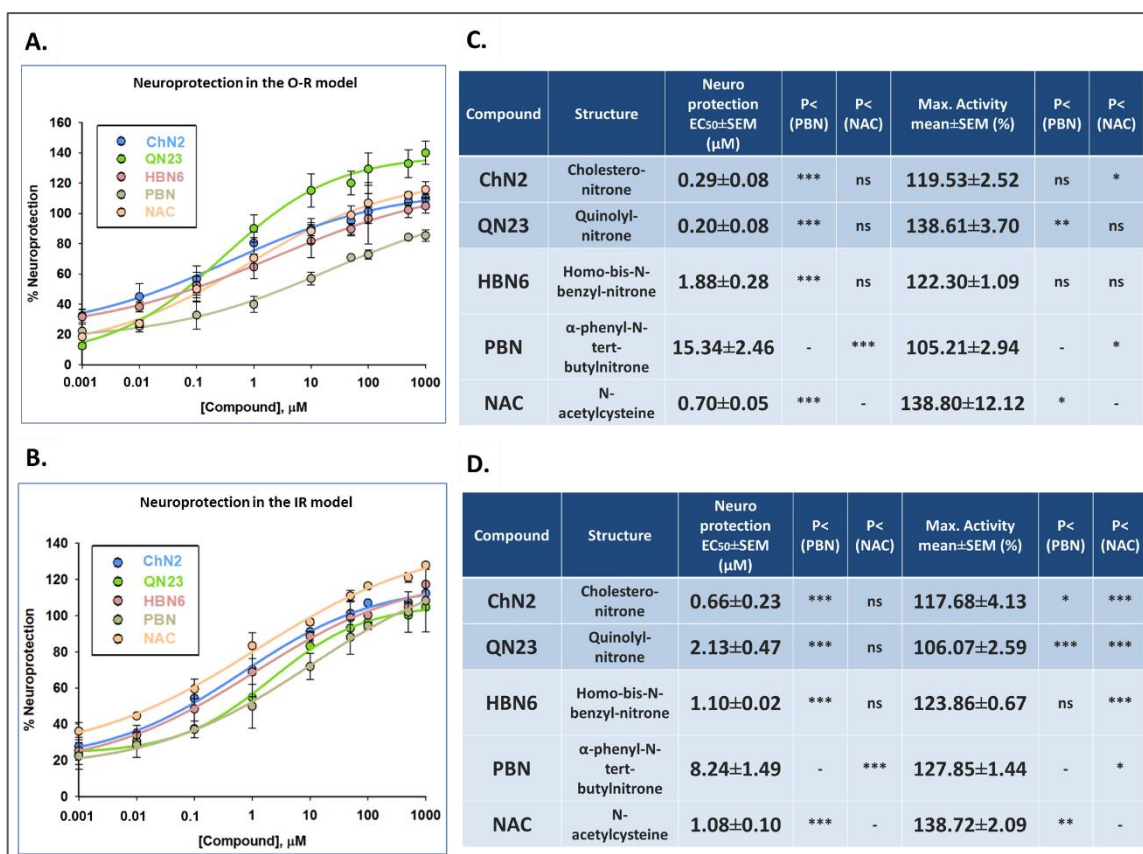


Figura 64. Efecto neuroprotector, dosis efectiva 50 (EC₅₀) y actividad máxima de ChN2, QN23, HBN6, PBN y NAC frente a la pérdida de capacidad metabólica inducida por O/R (A, C) e IR (B y D) en células de neuroblastoma humano SH-SY5Y. (A, B) Curvas dosis-respuesta que muestran el porcentaje de neuroprotección de los compuestos a concentraciones de 0,001-1000 μM. Las curvas se realizaron mediante regresión ponderada no lineal para estimar los valores de EC₅₀ y actividad neuroprotectora máxima (MNA). Los valores corresponden a la media ± SEM de cuatro experimentos, realizados por triplicado. (C, D) Valores de EC₅₀ y MNA de los compuestos de ensayo. La significación estadística compara los efectos de las nitronas ensayadas sobre los de PBN y a NAC, y se calculó mediante el test de ANOVA de una vía seguido del test de Holm-Sidak, *P < 0,05, **P < 001 y ***P < 0,001; ns = no significativo.

6.2. Efectos de ChN2, QN23 y HBN6 sobre la muerte celular necrótica y apoptótica

Para explorar más en profundidad el mecanismo de neuroprotección de los compuestos de estudio, se examinó su capacidad anti-necrótica, comparando las actividades intra y extracelulares de LDH. Como se muestra en la Figura 65, la exposición de las células a OGD induce un porcentaje de liberación de LDH de un 12% (12,35 ± 0,79%, media ± SEM; n=4), con una recuperación hasta el 7% tras 24 h de reperusión, mientras que bajo condiciones basales, el valor de LDH no superó el 5,5% (5,07 ± 0,92% para C3h y 2,54 ±

0,18% para C24h, media \pm SEM; n=4). Todos los compuestos ensayados disminuyeron significativamente la liberación de LDH de manera dependiente de la concentración, excepto a las concentraciones más bajas de **QN23** (0,001 μ M) y **PBN** (0,001-1 μ M) (Figura 65).

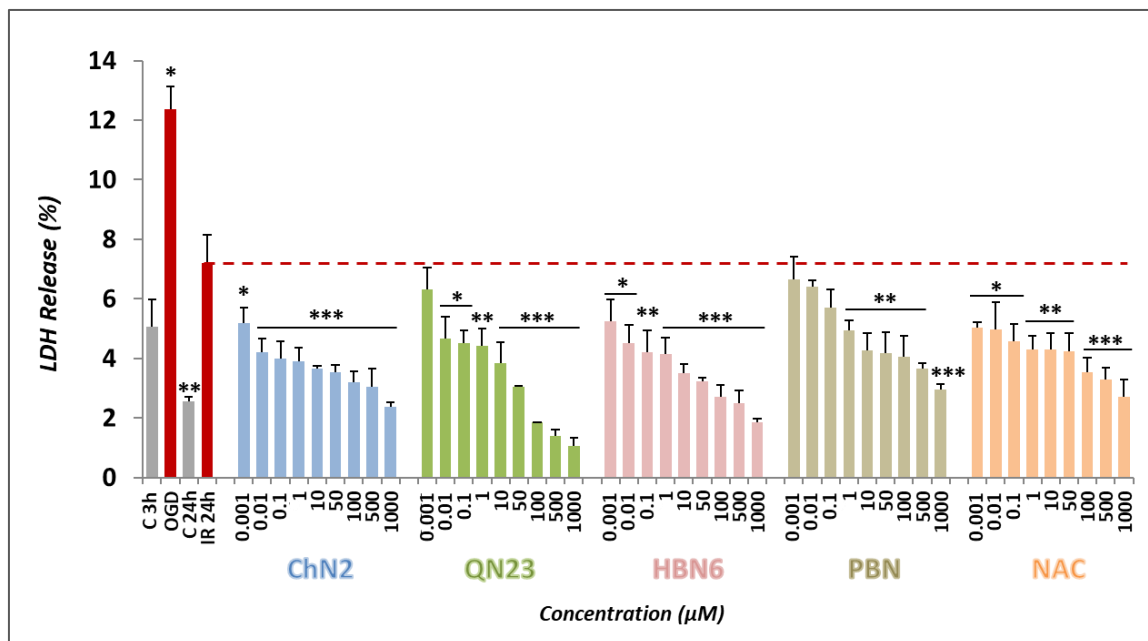


Figura 65. Efectos anti-neuróticos de ChN2, QN23, HBN6, PBN y NAC tras la exposición de células SH-SY5Y a 3 h de OGD y 24 h de IR. Las barras representan el porcentaje de liberación de LDH en presencia de los compuestos a concentraciones de 0,001-1000 μ M. Los datos se presentan como la media \pm SEM de cuatro experimentos realizados por triplicado. El análisis estadístico se realizó mediante el test de ANOVA de una vía y un test de comparaciones múltiples de Holm-Sidak, comparando la liberación de las células tratadas frente a las de IR24h, a *P < 0,05, **P < 0,01, y ***P < 0,001.

Las curvas dosis-respuesta de 0,001 a 1000 μ M se calcularon mediante una regresión no lineal, para a su vez obtener los valores de EC₅₀ y MNA (Figura 66). Los valores de EC₅₀ permitieron ordenar los compuestos de mayor a menor eficacia como se muestra a continuación:

$$\text{ChN2} \leq \text{PBN} \leq \text{NAC} \leq \text{HBN6} < \text{QN23}.$$

Así, **ChN2** presentó un valor de EC₅₀ muy similar a los de **HBN6**, **PBN** y **NAC**, y significativamente menor al de **QN23**. Por otro lado, en función de los valores de MNA, los compuestos ordenan de mayor a menor potencia, como sigue:

$$\text{QN23} \geq \text{NAC} \geq \text{HBN6} > \text{ChN2} \geq \text{PBN}.$$

Así, **QN23** mostró el mayor valor de MNA, similar a los de **HBN6** y **NAC**, y significativamente mayor a los valores de **ChN2** y **PBN**.

Estos resultados vuelven a subrayar los efectos anti-necróticos tan remarcables de **ChN2** a bajas concentraciones, y **QN23** a mayores concentraciones.

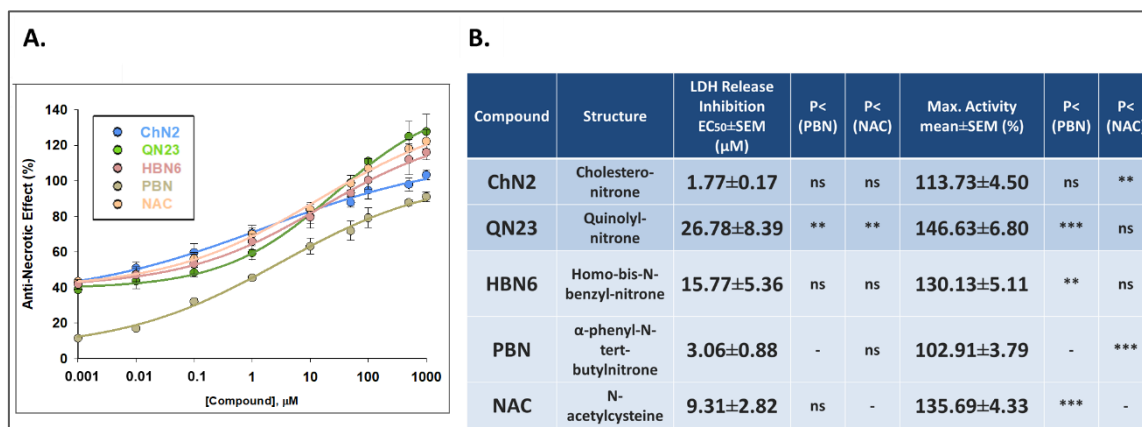


Figura 66. Efecto anti-necrótico de **ChN2**, **QN23**, **HBN6**, **PBN** y **NAC** tras exposición a IR en células de neuroblastoma humano *SH-SY5Y*. (A) Curvas dosis-respuesta que muestran el porcentaje de efecto anti-necrótico de los compuestos a concentraciones de 0,001-1000 µM. Las curvas se realizaron mediante regresión ponderada no lineal de mínimos cuadrados, usando curvas logísticas $f1 = \min + (\max - \min) / (1 + (x/EC_{50})^{-Pendiente})$, para estimar los valores de EC₅₀ y actividad máxima (MNA). Los valores corresponden a la media ± SEM de cuatro experimentos, realizados por triplicado. El análisis de las curvas se realizó mediante el programa SigmaPlot v.12. (B) Valores de EC₅₀ y MNA de los compuestos de ensayo. La significación estadística compara los datos frente a PBN y a NAC, y se calculó mediante una ANOVA de una vía seguida de un test de Holm-Sidak, *P < 0,05, **P < 001 y ***P < 0,001; ns = no significativo.

Por otro lado, para caracterizar el efecto neuroprotector de los compuestos estudiados, se examinaron sus propiedades anti-apoptóticas. Para ello, se determinó la actividad de la caspasa-3, implicada en las vías apoptóticas, empleando el sustrato fluorigénico Ac-DEVD-AMC.

Como se indica en la Figura 67, la exposición a OGD generó una actividad caspasa-3 de 27,33 ± 3,13 AFU/h x µg proteína (media ± SEM; n = 5), que descendió a 21.10±1.90 (media ± SEM; n = 5) tras la reperfusión. En condiciones basales de C3h y C24h, la actividad fue de 4,21±0.14 (media ± SEM; n = 5) y 5,69 ± 0,70 AFU/h x µg (media ± SEM; n = 5), respectivamente. A pesar de que las menores concentraciones del ensayo (0,01 y 0,1 µM) los compuestos no presentan efectos anti-apoptóticos, pero demostraron poseer distintos grados de actividad anti-apoptótica a mayores dosis (Figura 67). **ChN2** y **NAC** tuvieron

efectos anti-apoptóticos estadísticamente significativos a un intervalo bastante grande de concentraciones (1-1000 y 0,1-1000 μM , respectivamente); **QN6** y **HBN6** mostraron efectos bastante destacables a concentraciones de 50-1000 μM ; mientras **PBN** demostró actividad anti-apoptótica solamente de 100 a 1000 μM (Figura 67).

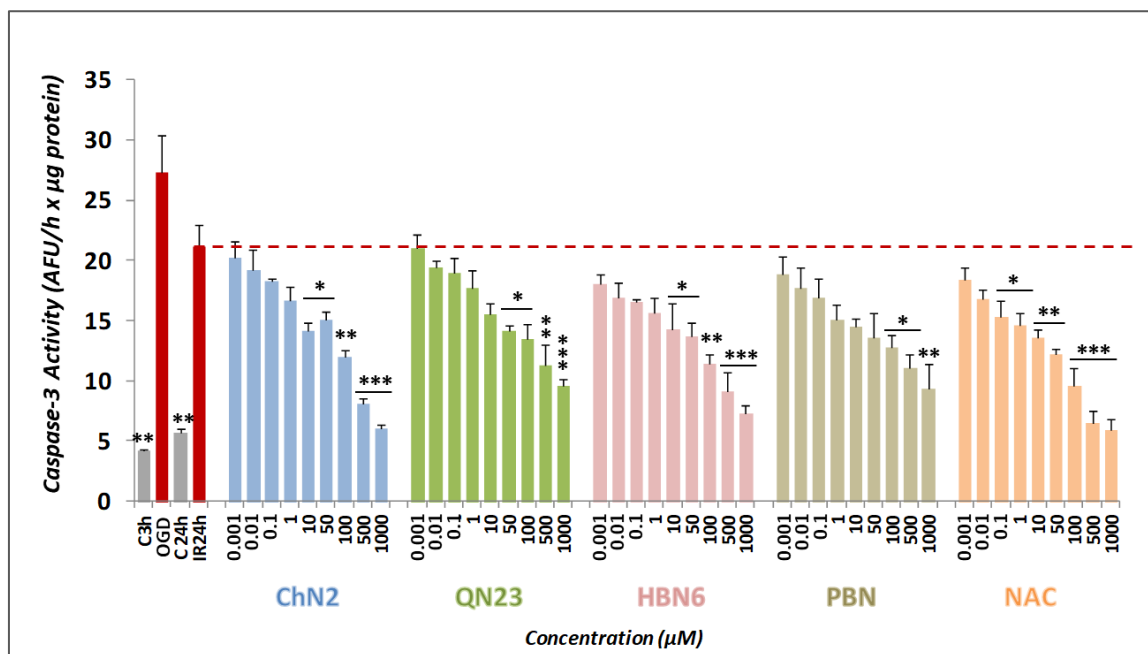


Figura 67. Efectos anti-apoptóticos de ChN2, QN23, HBN6, PBN y NAC tras la inducción de 3 h de OGD y 24 h de IR a células SH-SY5Y. Las barras representan la actividad de caspasa-3 ($\Delta\text{AFU}/\text{min} \times \mu\text{g}$ proteína) en presencia de los compuestos a concentraciones de 0,001-1000 μM . Los datos se presentan como la media \pm SEM de cinco experimentos realizados por triplicado. El análisis estadístico se realizó con una ANOVA de una vía y un test de Holm-Sidak, mostrando diferencias significativas en actividad de caspasa-3 de las células tratadas frente a las de IR24h, a * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, y *** $P < 0,001$. AFU = unidades arbitrarias de fluorescencia.

Las curvas dosis-respuesta del efecto anti-apoptótico se ajustaron a una regresión no lineal para calcular los valores de EC_{50} y MNA, con el objetivo de ordenar los compuestos en función de su potencia y eficacia anti-apoptótica (Figura 68A). En base a los valores de EC_{50} (Figura 68B), el orden de las nitronas, de mayor a menor capacidad anti-apoptótica, fue el siguiente:

$$\text{NAC} \leq \text{HBN6} \leq \text{ChN2} < \text{QN23} < \text{PBN}.$$

En cuanto a los valores de MNA (Figura 68B), los compuestos mostraron el siguiente orden de potencia:

$$\text{NAC} \geq \text{HBN6} \geq \text{ChN2} > \text{PBN} > \text{QN23}.$$

Así pues, **ChN2** mostró un valor de MNA similar a los de **HBN6**, **PBN** y **NAC** y, a pesar de que su EC_{50} era mayor al de **NAC** y **HBN6**, también era significativamente menor al de **PBN**. Por otro lado, **QN23** mostró un valor de EC_{50} comparable al de **ChN2**, pero a su vez tenía la menor MNA de todos los compuestos ensayados (aunque no inferior al 90%). De esa manera, **ChN2** exhibió unas buenas propiedades anti-apoptóticas, sobre todo en el rango de concentraciones medias a altas, mientras que **QN23** demostró una menor eficacia frente a este tipo de muerte celular, aunque mayor a la eficacia de **PBN**, la nitrona precursora.

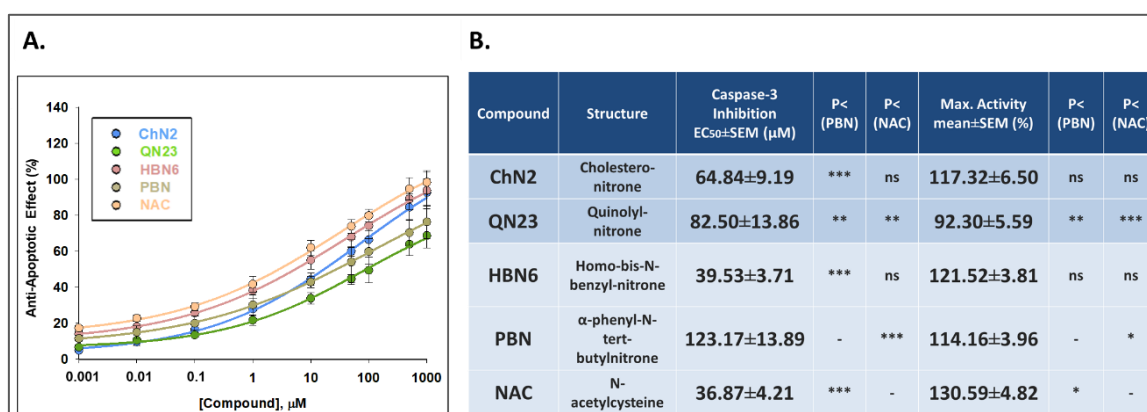


Figura 68. Efecto anti-apoptótico de **ChN2**, **QN23**, **HBN6**, **PBN** y **NAC** tras exposición a IR en células de neuroblastoma humano SH-SY5Y. (A) Curvas dosis-respuesta que muestran el porcentaje de efecto anti-apoptótico de los compuestos a concentraciones de 0,001-1000 μM . Las curvas se realizaron mediante regresión ponderada no lineal de mínimos cuadrados, usando curvas logísticas $f1 = \min + (\max - \min) / (1 + (x/EC_{50})^{-Pendiente})$, para estimar los valores de EC_{50} y actividad máxima (MNA). Los valores corresponden a la media \pm SEM de cinco experimentos, realizados por triplicado. El análisis de las curvas se realizó mediante el programa SigmaPlot v.12. (B) Valores de EC_{50} y MNA de los compuestos de ensayo. La significación estadística compara los datos frente a **PBN** y a **NAC**, y se calculó mediante una ANOVA de una vía seguida de test de comparaciones múltiples de Holm-Sidak, * $P < 0,05$, ** $P < 001$ y *** $P < 0,001$; ns = no significativo.

6.3. Neurotoxicidad basal de **ChN2** y **QN23** comparativa con **HBN6**, **PBN** y **NAC**

A continuación, se determinó la neurotoxicidad en condiciones basales, en ausencia de cualquier estímulo tóxico, empleando el ensayo de XTT.

Mientras que **ChN2** mostró un aumento en la muerte celular a partir de los 100 μM (inclusive), **QN23** demostró poseer efectos tóxicos a concentraciones de 500 y 1000 μM

(Figura 69). A 1 mM, **ChN2** y **QN23** mostraron una reducción muy significativa en la viabilidad celular, de aproximadamente el 50% y el 20%, respectivamente. Como consecuencia, la neurotoxicidad basal de estas dos nitronas se tuvo en cuenta al evaluar los resultados de los ensayos de neuroprotección (ver apartado 6.1. de “Resultados”). Por otro lado, no se encontraron efectos neurotóxicos para los otros tres compuestos empleados como referencia (**NAC**, **PBN** y **HBN6**) a ninguna de las concentraciones de ensayo. Esto indica que estos compuestos carecen de efectos neurotóxicos a un amplio rango de concentraciones, lo que les convierte en adecuados para su empleo como compuestos neuroprotectores, ya que además el rango típico de concentraciones usado en el descubrimiento de nuevos fármacos suele ser de 1-10 μ M.

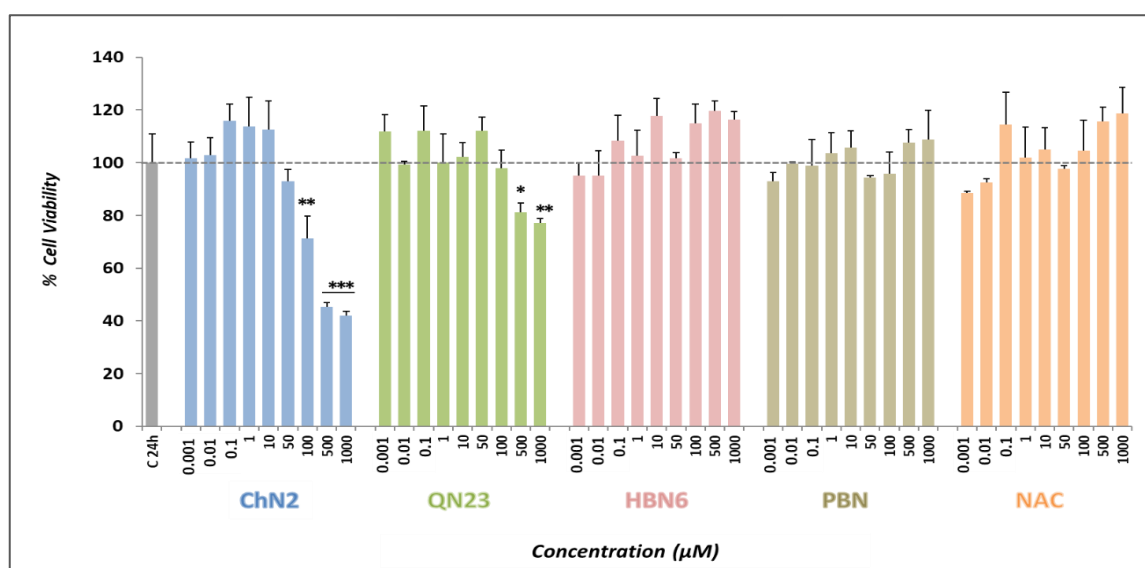


Figura 69. Efecto de **ChN2**, **QN23**, **HBN6**, **PBN** y **NAC** en la viabilidad de células de neuroblastoma humano SH-SY5Y en condiciones basales. Las barras representan el porcentaje de viabilidad celular a las concentraciones de los compuestos de 0,001-1000 μ M. La viabilidad de las células sin tratar (C24h) se definió como el 100% ($100 \pm 10,8\%$; media \pm SEM). Los datos mostrados corresponden a la media \pm SEM de cuatro experimentos realizados en triplicado. El análisis estadístico (ANOVA de una vía) revela diferencias significativas en la viabilidad comparada con C24h (* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$). El análisis estadístico de los datos que superaron el 100% no se muestra.

6.4. Efectos antioxidantes de **ChN2** y **QN23**

Para la evaluación del impacto que las propiedades antioxidantes de los compuestos de estudio generan en la capacidad neuroprotectora de los mismos, se examinó el nivel de

producción de ROS en células SH-SY5Y sometidas a 3 h de OGD y 3 h de IR. Para medir los niveles de anión $O_2^{\bullet-}$, se empleó la sonda fluorescente dihidroetidina (DHET).

Como se puede apreciar en la Figura 70, la producción de $O_2^{\bullet-}$ tras IR ($100 \pm 9,29\%$, media \pm SEM; n = 4) fue muy similar a la de OGD ($102,18 \pm 10,68\%$, media \pm SEM; n = 4). Los compuestos **ChN2** y **QN23** fueron efectivos a la mayoría de las concentraciones ensayadas, mientras que **HBN6**, **NAC**, pero especialmente **PBN**, tuvieron muy buena potencia antioxidante, pero a un rango menor de concentraciones. Sin embargo, estos últimos compuestos demostraron un mejor efecto dosis-dependiente y mayor efecto antioxidante a las concentraciones más elevadas (100-1000 μ M) (Figura 70).

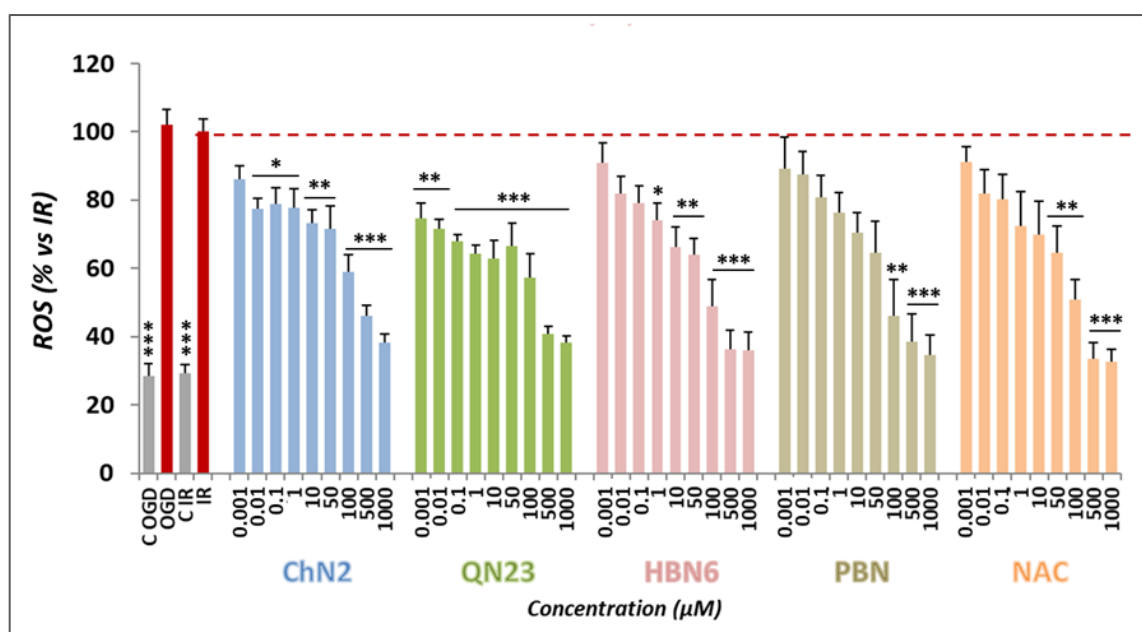


Figura 70. Efectos antioxidantes de ChN2, QN23, HBN6, PBN y NAC en células SH-SY5Y tras la exposición a OGD-IR. Las barras representan el porcentaje de superóxido $O_2^{\bullet-}$ formado tras 3 h de OGD y 3 h de IR, en ausencia (IR) o presencia de los compuestos a concentraciones de 0,001-1000 μ M. Los datos se presentan como la media \pm SEM de cuatro experimentos realizados por triplicado. El análisis estadístico se realizó con una ANOVA de una vía y un test de Holm-Sidak, mostrando diferencias significativas en actividad de caspasa-3 de las células tratadas frente a las de IR24h, a *P < 0,05, **P < 0,01, y ***P < 0,001.

Las curvas dosis-respuesta y los valores de EC_{50} y actividad antioxidante máxima (MAA) de los compuestos se muestran en la Figura 71. En base a los valores de EC_{50} , el orden de las nitronas de mayor a menor eficacia antioxidante, es el siguiente:

$$NAC \leq HBN6 \leq PBN \leq QN23 \leq ChN2.$$

En cuanto a valores de MAA, el orden de mayor a menor potencia fue:

HBN6 ≥ NAC ≥ QN23 ≥ PBN ≥ ChN2.

De esta forma, no se aprecian diferencias significativas entre los valores de EC₅₀ y MAA de los cinco compuestos ensayados.

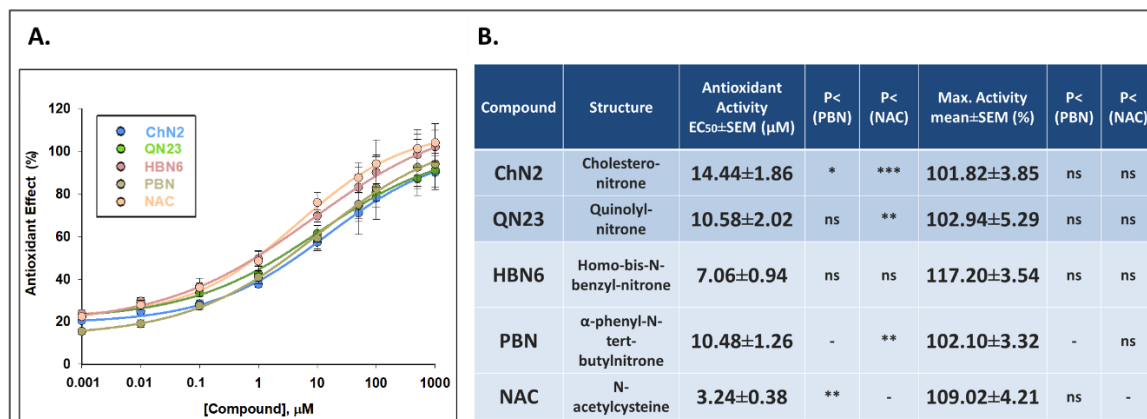


Figura 71. Efecto antioxidante de ChN2, QN23, HBN6, PBN y NAC tras exposición a IR en células de neuroblastoma humano SH-SY5Y. (A) Curvas dosis-respuesta que muestran el porcentaje de efecto antioxidante de los compuestos a concentraciones de 0,001-1000 μM. Las curvas se ajustaron mediante regresión ponderada no lineal de mínimos cuadrados, usando curvas logísticas $f1 = \min + (\max - \min) / (1 + (x/EC_{50})^{-Pendiente})$, para estimar los valores de EC₅₀ y actividad máxima (MNA). Los valores corresponden a la media ± SEM de cuatro experimentos, realizados por triplicado. El análisis de las curvas se realizó mediante el programa SigmaPlot v.12. (B) Valores de EC₅₀ y MNA de los compuestos de ensayo. La significación estadística compara los datos frente a PBN y a NAC, y se calculó mediante una ANOVA de una vía seguida de test de comparaciones múltiples de Holm-Sidak, *P < 0,05, **P < 001 y ***P < 0,001; ns = no significativo.

6.5. Correlación entre las diferentes propiedades neuroprotectoras de ChN2, QN23, HBN6, PBN y NAC

Tras haber comprobado la eficacia y potencia neuroprotectora y antioxidante de estas prometedoras nitronas, se ha analizado la relación comparativa entre los distintos tipos de actividades neuroprotectoras de las diferentes nitronas ensayadas y se determinó la contribución de estas actividades al efecto neuroprotector final, realizando análisis de correlación. El análisis individual de los datos correspondientes a las nueve concentraciones de cada compuesto (0,001-1000 μM) indicaron que existía una correlación significativa entre todos los mecanismos neuroprotectores (datos no mostrados). Por ello, y con objeto de encontrar las diferencias entre ellas, se realizaron análisis de correlación lineal entre la actividad neuroprotectora y las propiedades anti-necróticas, anti-

apoptóticas y antioxidantes de todos los compuestos, comparando sus EC₅₀ para agruparlos de acuerdo con sus mecanismos de acción (Figura 72).

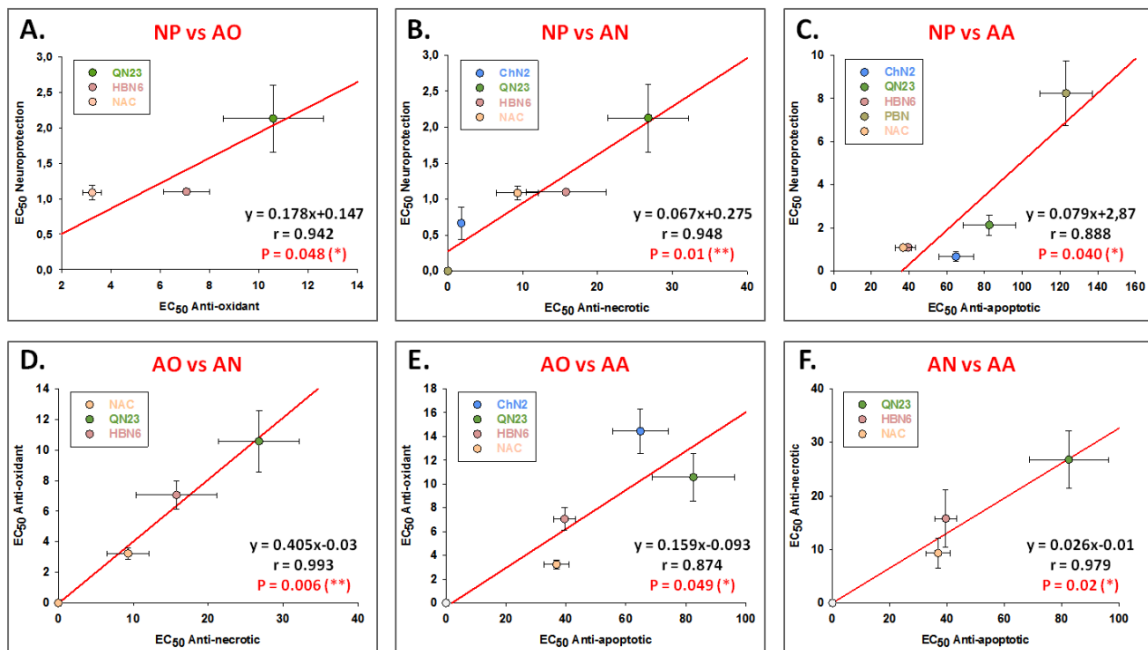


Figura 72. Análisis de correlación entre valores de EC₅₀ (μM) para las propiedades neuroprotectoras (NP, antioxidantes (AO), anti-necróticas (AN) y anti-apoptóticas (AA) para los compuestos ChN2, QN23, HBN6, PBN y NAC. Los análisis de regresión lineal muestran la correlación entre (A) NP y AO, (B) NP y AN, (C) NP y AA, (D) AO y AN, (E) AO y AA, y (F) AN y AA. Las ecuaciones de línea recta (ax+b), los coeficientes de correlación (r) y la significación estadística de los análisis de regresión están indicados en cada gráfica. Los análisis de regresión y la estadística se realizaron mediante el Test de Correlación de Pearson a *P < 0,05, **P < 001 y ***P < 0,001, utilizando el programa de SigmaPlot v.12.

En primer lugar, se observó una clara correlación entre el efecto neuroprotector y antioxidante de QN23, HBN6 y NAC (Figura 72A). Además, el efecto anti-necrótico de estos compuestos también estaba correlacionado significativamente con su actividad antioxidante (Figura 72D) y anti-apoptótica (Figura 72F). Por otro lado, ChN2, QN23, HBN6 y NAC demostraron poseer una correlación bastante significativa entre su efecto neuroprotector y actividad anti-necrótica (Figura 72B) y otra correlación entre su actividad antioxidante y anti-apoptótica (Figura 72E). Finalmente, se pudo observar una clara correlación entre el efecto neuroprotector y anti-apoptótico de todos los compuestos estudiados (Figura 72C).

Estos resultados indican que, mientras las propiedades antioxidantes, anti-necróticas y anti-apoptóticas de **QN23**, **HBN6** y **NAC** parecen ser igual de relevantes para la capacidad neuroprotectora total, las propiedades neuroprotectoras de **ChN2** parecen derivar especialmente de sus actividades anti-necrótica y anti-apoptótica, mientras que el efecto de **PBN** depende sobre todo de su capacidad para disminuir la muerte por apoptosis.

7. Implicación de la autofagia en la muerte celular inducida por el estrés oxidativo y la isquemia experimental, y en el efecto neuroprotector de las nitronas

7.1. Implicación de la autofagia en la muerte celular inducida por el estrés oxidativo y la isquemia experimental

Como ya se mencionó en el apartado 2.1.3.3. de “Introducción”, otro mecanismo que puede estar mediando la muerte celular inducida por la isquemia cerebral es la autofagia, cuya función recicladora de componentes celulares, así como su mecanismo molecular se describieron en el apartado 2.1.3.3. de esta tesis doctoral. La autofagia es una vía catabólica en la que los componentes celulares normales o disfuncionales que se acumulan durante el crecimiento y la diferenciación celular se degradan a través del lisosoma y se reciclan. Sin embargo, también es un importante modificador de la muerte celular. El estrés oxidativo y el estrés del ER subsiguiente a la isquemia-hipoxia cerebral pueden inducir autofagia, la cual inicialmente previene la necrosis, a través de la producción de energía catabólica, y aborta la apoptosis, eliminando el daño mitocondrial. Sin embargo, un alto nivel de “estrés autofágico” conduce a una activación lisosomal masiva y así a la muerte celular. Dependiendo de la relación entre necrosis, apoptosis y autofagia, las neuronas pueden mostrar características mezcladas de muerte celular en la isquemia, y presumiblemente en otros desórdenes neurológicos (Datta et al., 2020).

Así pues, y dada la naturaleza dual de la autofagia, nos interesó conocer si podría estar implicada en la muerte celular inducida por nuestros modelos de estrés oxidativo (O/R) y de isquemia experimental (IR) y si este mecanismo de protección/muerte podría estar implicado en el efecto neuroprotector de las nitronas sobre ambos modelos de daño estudiados.

La autofagia se estudió mediante la técnica de Western Blot, en células SH-SY5Y sometidas a O/R o IR, en ausencia o presencia de las nitronas bajo estudio, utilizando como herramientas farmacológicas de apoyo algunos compuestos moduladores de la misma, como:

- Cloroquina (CQ): como inhibidor de la bomba de protones (H⁺) lisosomal que bloquea el flujo autofágico.
- Rapamicina (Rapa): que inhibe a mTOR, activando así la autofagia.
- 3-metil adenina (3-MA): que inhibe a las PI3K de clase III y, con ello, inhibe la iniciación de la autofagia.

En primer lugar se midió la autofagia en ausencia de los compuestos de ensayo, mediante la medida, por Western Blot, del contenido de varias proteínas consideradas como **marcadores biológicos cruciales utilizados para identificar la autofagia** en los sistemas de mamíferos (Lin et al., 2021). Entre estas proteínas se encuentran:

- La proteína de cadena ligera asociada a microtúbulos 3 (**LC3**), una proteína citoplasmática (LC3-I) que durante la autofagia se lipida por la unión a fosfatidiletanolamina (PE) (LC3-II), y se recluta en las membranas autofagosómicas. Así pues, la medida de la cantidad de ambas formas de LC3, y más concretamente de la **ratio de LC3-II/LC3-I**, aumenta durante el proceso de autofagia (Tanida et al., 2004).
- La proteína **p62** (o secuestroma 1, SQSTM1). Es una proteína adaptadora, receptora de proteínas ubiquitinadas cuyo destino es ser degradadas por el autofagosoma, en un proceso en el que la propia p62 también es degradada, por lo que su concentración se ve disminuida durante la autofagia (Ndoye & Weeraratna, 2016).

La medida de la cantidad de ambas proteínas se complementa con la medida de **β-actina**, una proteína constitutiva y ubicua que sirve para normalizar la carga proteica (Zhang et al., 2012).

Así, se midieron los contenidos de LC3-II, LC3-I, p62 y β-actina en ambos modelos de daño y se calcularon las ratios LC3-II/LC3-I, indicador de la conversión de LC3-I soluble en el lipidado LC3-II. Los resultados mostrados en la Figura 73 indican que al igual que la Rapa, que aumentó muy significativamente la misma ($P < 0,001$), el tratamiento con O/R indujo un aumento significativo ($P < 0,05$) de la ratio LC3-II/LC3-I, el cual fue mayor en presencia de CQ, indicando, por tanto, la formación de autofagosomas, y con ello, la

activación de la autofagia en esta condición de O/R, acúmulo que fue mayor al inhibir el flujo autofágico con CQ. Por el contrario, y a diferencia del tratamiento con CQ, el acúmulo de LC3-II y formación de autofagosomas en condiciones de O/R fue inhibido significativamente por la presencia de 3-MA. Los datos obtenidos mediante la medida de la ratio LC3-II/ β -actina confirman los datos obtenidos con LC3-II/LC3-I. Por el contrario, el tratamiento O/R, y a diferencia de lo que cabía pensar, no inhibió la cantidad de p62 (medida por la ratio p62/ β -actina), aunque sí lo hizo el tratamiento con Rapa ($P < 0,05$). No obstante, el tratamiento con CQ sí aumentó esta ratio bajo el tratamiento con O/R, indicando que la inhibición del flujo autofágico aumentaba la acumulación de esta proteína, como cabía esperar. Por último, el tratamiento con 3-MA bajo la condición O/R disminuyó significativamente ($P < 0,05$) la cantidad de p62, como era de esperar, ya que experimentos posteriores lo confirman tanto con O/R, como con Rapa (resultados no mostrados). Por tanto, podemos deducir que la medida de p62 es relativamente poco fiable en la medida de la autofagia, siendo necesarios más experimentos para confirmar este resultado.

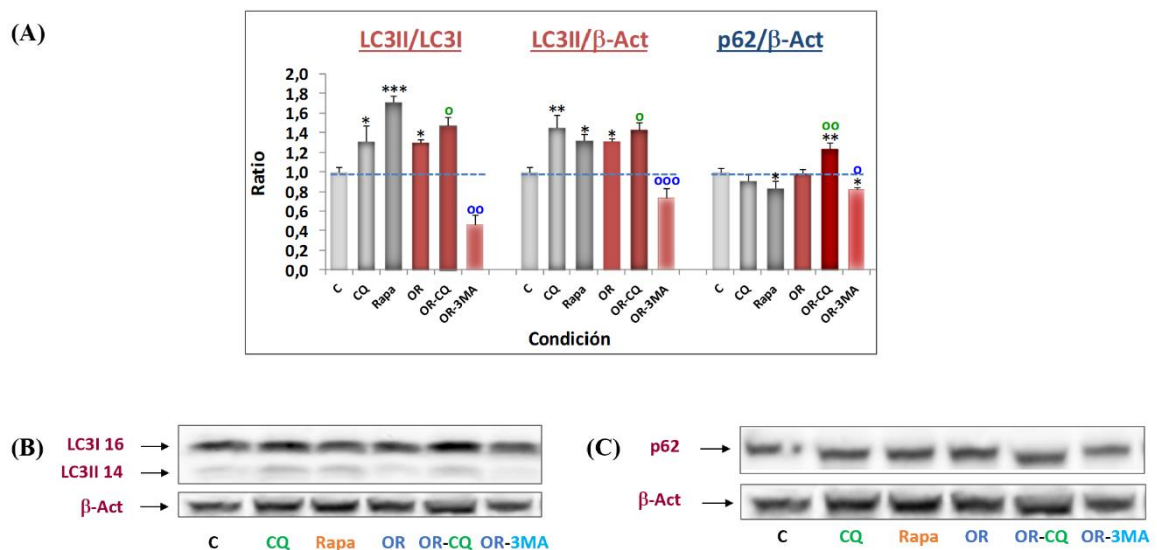


Figura 73. Efecto del tratamiento con oligomicina-rotenona (O/R) durante 24 h sobre la expresión de proteínas autofágicas LC3 y p62 en cultivos de células SH-SY5Y. (A) Cuantificación de la expresión de proteínas en forma de ratios LC3-II/LC3-I, LC3-II/ β -actina y p62/ β -actina. Los valores representados corresponden a la media \pm SEM de 2 experimentos, cada uno realizado por duplicado y en distintos cultivos celulares. (B) Imágenes del revelado de Western Blot tras la incubación de las membranas con el anticuerpo primario anti-LC3. (C) Imágenes del revelado de Western Blot tras la incubación con el anticuerpo primario anti-p62. La significación estadística se analizó mediante ANOVA de una vía, y evidencia el efecto significativo de O/R, Rapa y 3-MA respecto a los controles (asteriscos negros), entre con y sin CQ (círculos verdes) y entre con y sin 3-MA (círculos azules). (* $P < 0,05$; ^{oo} $P < 0,01$; ^{ooo} $P < 0,001$).

Por otro lado, en cuanto al efecto de la isquemia experimental y los fármacos moduladores de la autofagia, los resultados de la Figura 74 muestran que la OGD también induce un incremento en la ratio de LC3-II/LC3-I, que disminuye tras el re-suministro de oxígeno y glucosa (IR), así como un incremento en LC3-II/LC3-I inducida por OGD en presencia de CQ y con el tratamiento con Rapa respecto a las condiciones basales; lo que de nuevo queda ratificado con los resultados de la ratio LC3-II/ β -actina. La CQ no solo potencia el acúmulo de LC3-II inducido en OGD, sino también el inducido por IR. Por su parte, la expresión de p62 tampoco se modificó significativamente en las distintas condiciones experimentales, ni siquiera bajo el tratamiento con Rapa, aunque en los experimentos que se están realizando actualmente, se muestra una ligera inhibición de la ratio p62/ β -Act por Rapa, que es revertida por CQ e inhibida por 3-MA (resultados no mostrados).

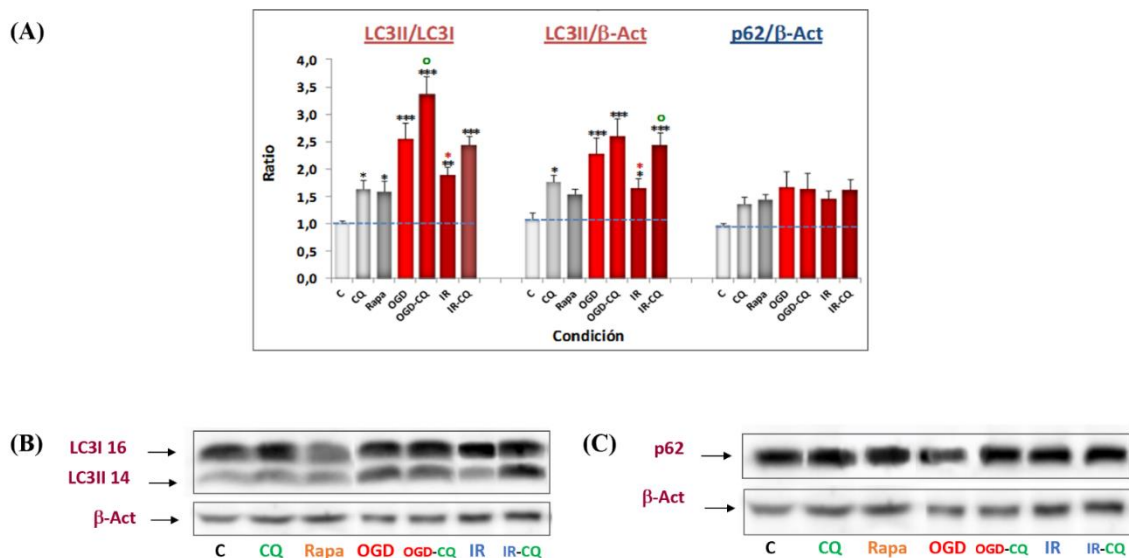


Figura 74. Efecto del tratamiento con OGD durante 3 h (OGD) y reperusión durante 24 h (IR) sobre la expresión de proteínas autofágicas LC3 y p62 en células SH-SY5Y. (A) Cuantificación de la expresión de proteínas en forma de ratios LC3-II/LC3-I, LC3-II/ β -actina y p62/ β -actina. Los valores representados corresponden a la media \pm SEM de dos experimentos, cada uno repetido por duplicado, y realizados en cultivos celulares diferentes. (B) Imágenes del revelado de Western Blot tras la incubación de las membranas con el anticuerpo primario anti-LC3. (C) Imágenes del revelado de Western Blot tras la incubación con el anticuerpo primario anti-p62. La significación estadística se analizó mediante el test de ANOVA de una vía, y evidencia el efecto significativo de OGD y Rapa respecto a los controles (asteriscos negros), frente a OGD (asteriscos rojos) y frente a CQ (círculos verdes). (○/*P < 0,05; ○○/***P < 0,01; ○○○/***P < 0,001).

Ya que se había encontrado que los tratamientos de O/R, OGD e IR modulaban el flujo autofágico, era necesario saber si esta modulación podría estar implicada en el efecto

neuroprotector de las nitronas estudiadas, o si por el contrario era un mecanismo que favorecía la muerte celular. Para ello, se estudió el efecto del estrés oxidativo, la isquemia y el tratamiento con fármacos moduladores de la autofagia sobre la viabilidad celular, medida mediante el test XTT. Los resultados mostrados en la Figura 75 muestran que, mientras que en condiciones basales la Rapa no afecta significativamente la viabilidad celular, y solo la CQ la disminuye, lo que indica que la activación de la autofagia protectora es responsable de la buena viabilidad celular observada en condiciones basales, en condiciones de O/R e IR la viabilidad celular disminuye, como era de esperar, en un 40 o 30% para OR e IR, respectivamente. En estas condiciones, tanto la inhibición del flujo autofágico con CQ o de la autofagia con 3-MA, como la activación de la autofagia por Rapa, revierten el efecto de muerte inducido por O/R e IR, lo que indica que en estas condiciones la **autofagia tiene un efecto promueve y no es protectora**, al contrario de lo que ocurría en condiciones basales. Además, en el caso del tratamiento con Rapa, este incremento observado en la viabilidad indicaría que la inhibición de mTOR por esta molécula tendría un efecto neuroprotector en las células. Por otro lado, el incremento de viabilidad provocado por Rapa en condiciones de daño es revertido por su combinación con CQ, 3 MA y su combinación, que eliminan el efecto neuroprotector de autofagia inducido por la Rapa sola.

En conjunto, estos resultados ponen de manifiesto la naturaleza dual de la autofagia, tanto promotora de la supervivencia, en el caso de su aumento por Rapa, como un mecanismo causante de muerte celular en el caso del estrés oxidativo y la isquemia.

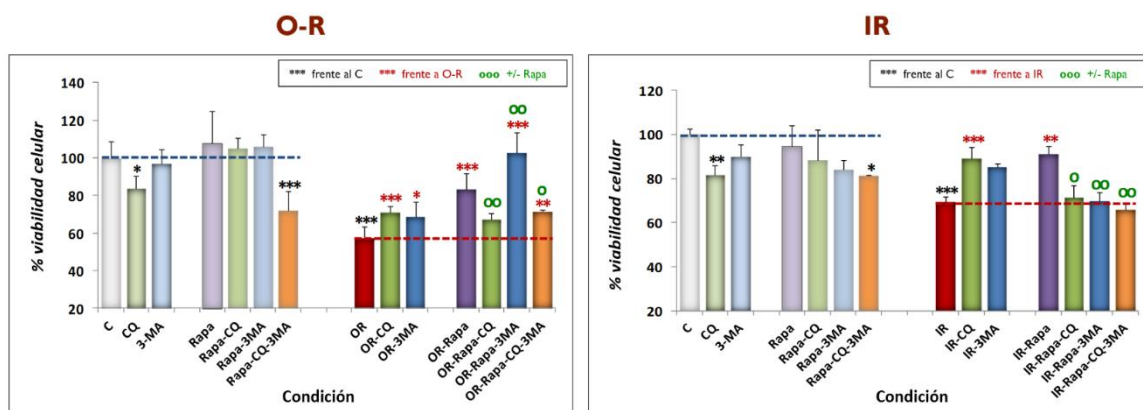


Figura 75. Efecto de los moduladores de autofagia CQ, 3-MA y Rapa en condiciones basales y con los tratamientos tóxicos de O/R y OGD sobre la viabilidad de las células SH-SY5Y. Los valores representados corresponden a la media \pm SEM de dos experimentos, cada uno realizado por duplicado y en distintos cultivos celulares. Las comparaciones estadísticas realizadas (test ANOVA de una vía) muestran las diferencias significativas existentes entre los tratamientos con los respectivos controles (asteriscos negros)

con los compuestos moduladores de autofagia, respecto a las condiciones de O/R u OGD solas (*asteriscos rojos*), y las diferencias frente a O/R o IR con Rapa (*círculos verdes*). (^o*P < 0,05; ^{oo}**P < 0,01; ^{ooo}***P < 0,001).

7.2. Implicación de la autofagia el efecto neuroprotector de ChN2, QN23, HBN6, PBN y NAC

Finalmente, se ensayó el efecto que ejercen los compuestos **ChN2**, **QN23**, **HBN6**, **PBN** y **NAC** sobre la autofagia en ambos modelos de daño celular. Comenzando con el modelo de O/R, se analizaron los niveles de expresión proteica a través de Western Blot, recogidos en la Figura 76, donde se puede observar que todos los compuestos reducen las ratios de LC3, salvo **ChN2** y **QN23** en el caso de LC3-II/ β -actina, pero no tienen efectos significativos sobre la expresión de p62. Además, la CQ provoca un aumento estadísticamente significativo en ambas ratios en tratamientos combinados con **PBN**, **NAC**, **HBN6** y **HBN5**, otro de los mejores compuestos descritos en este trabajo ([Chamorro et al., 2020](#)). Esto evidenciaría que, al menos a nivel de expresión de LC3-II, los compuestos **HBN6**, **HBN5**, **PBN** y **NAC** podrían ser capaces de modular la autofagia como mecanismo de neuroprotección.

Por otro lado, al analizar lo que ocurre en el modelo de OGD-IR en presencia de los compuestos de ensayo (Figura 77), se puede apreciar que todos los compuestos son capaces de reducir las ratios de LC3, y que **ChN2** incrementa significativamente la expresión de p62.

Además, como se aprecia en la Figura 77, la CQ provoca un aumento considerable en las ratios de LC3 en tratamientos combinados con todos los compuestos, a excepción de **ChN2**. En el caso de la ratio con p62/ β -actina, la CQ induce un incremento significativo solo en combinación con **QN23**, aunque con **NAC** y con **HBN6** también se observa una tendencia al aumento de p62.

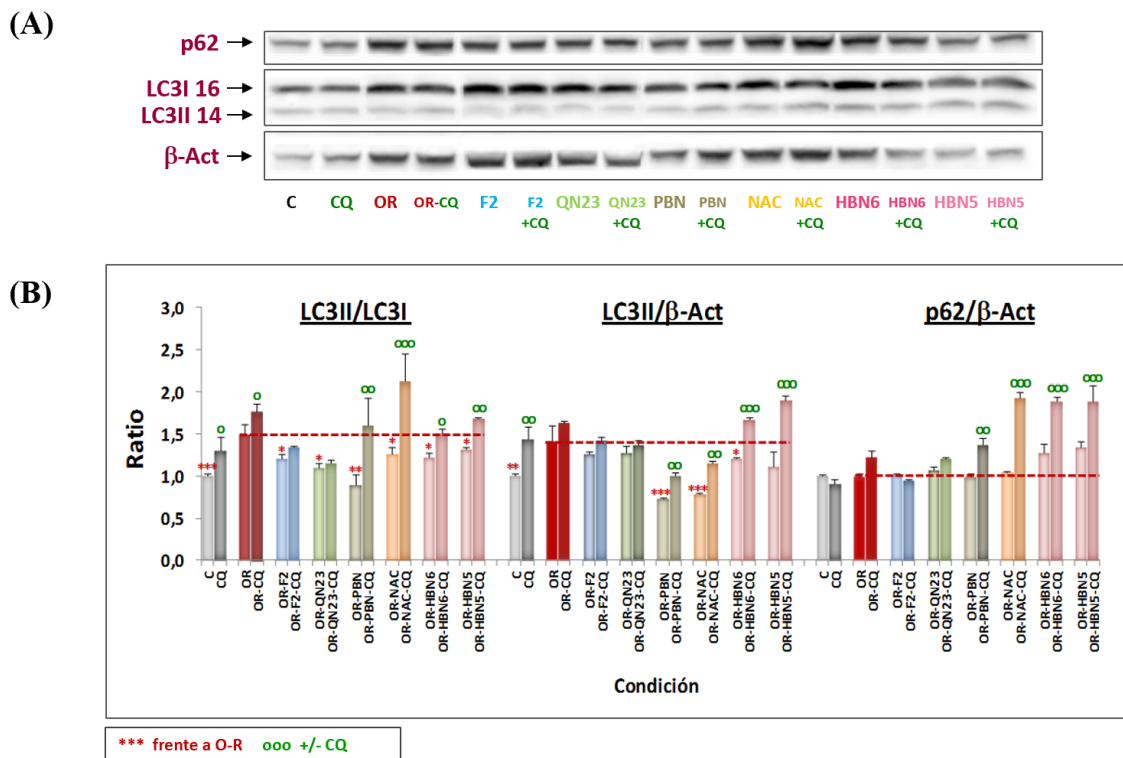


Figura 76. Efecto de los compuestos neuroprotectores ChN2, QN23, HBN6, HBN5, PBN y NAC sobre la expresión de las proteínas autofágicas LC3 y p62 en el modelo de O/R. (A) Imágenes del revelado de Western Blot tras la incubación de las membranas con los anticuerpos primarios anti-p62 y anti-LC3. (B) Cuantificación de la expresión de proteínas en forma de ratios LC3-III/LC3-I, LC3-III/ β -actina y p62/ β -actina, en presencia de los compuestos de ensayo. Los valores representados corresponden a la media \pm SEM de dos experimentos, cada uno realizado por duplicado y en distintos cultivos celulares. La evaluación estadística que se llevó a cabo (test ANOVA de una vía) muestra las diferencias significativas que existen entre los tratamientos con los distintos compuestos frente a O/R (asteriscos rojos), y las diferencias de la presencia de CQ frente a su ausencia (círculos verdes). (^o/_o*P < 0,05; ^{oo}/_{oo}**P < 0,01; ^{ooo}/_{ooo}***P < 0,001).

Con el objetivo de estudiar si los compuestos ensayados pudieran tener un efecto en la autofagia en células sanas, se analizó el efecto de las nitronas y NAC junto con la CQ en condiciones basales, obteniéndose el gráfico de la Figura 78A. En ella, se puede observar que, en condiciones basales y por tanto en ausencia de daño o lesión, el tratamiento con CQ solo reduce ligeramente la viabilidad en ausencia de compuestos neuroprotectores, y en presencia de HBN6.

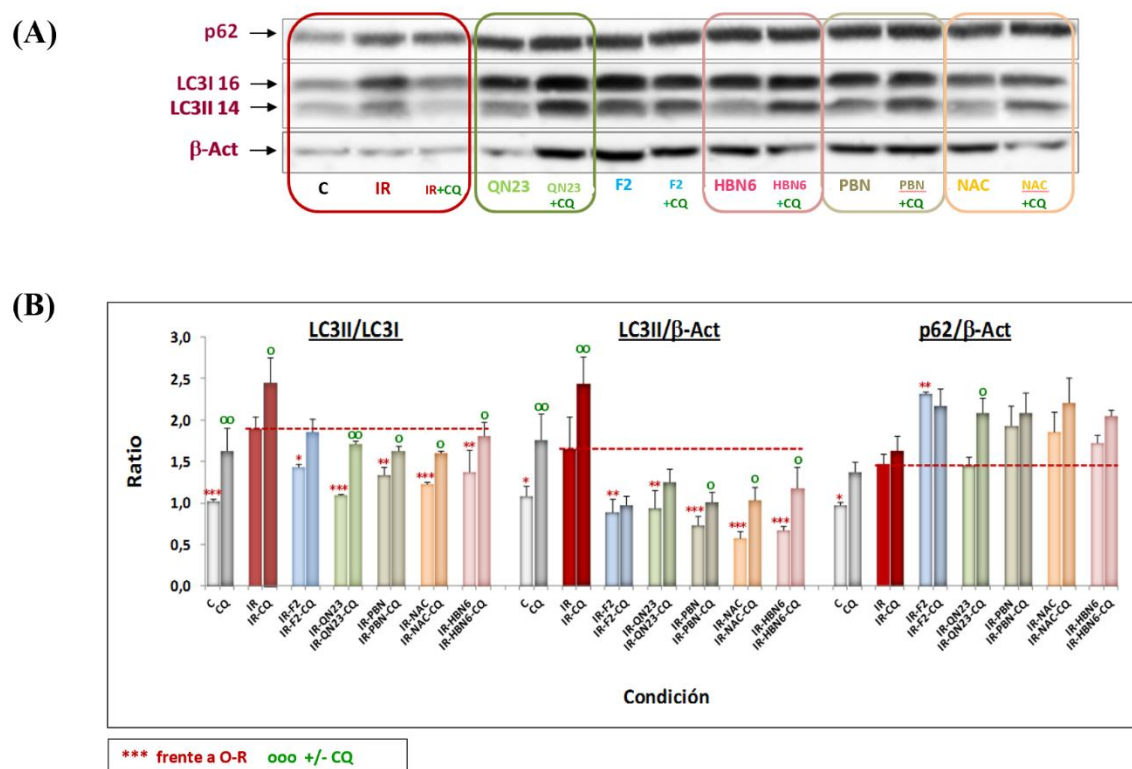


Figura 77. Efecto de los compuestos neuroprotectores ChN2, QN23, HBN6, HBN5, PBN y NAC sobre la expresión de las proteínas autofágicas LC3 y p62 en el modelo de OGD-IR. (A) Imágenes del revelado de Western Blot tras la incubación de las membranas con los anticuerpos primarios anti-LC3 y anti-p62. (B) Cuantificación de la expresión de proteínas en forma de ratios LC3-II/LC3-I, LC3-II/ β -actina y p62/ β -actina, en presencia de los compuestos de ensayo. Los valores representados corresponden a la media \pm SEM de dos experimentos, cada uno realizado por duplicado y en distintos cultivos celulares. La evaluación estadística que se llevó a cabo (test ANOVA de una vía) muestra las diferencias significativas que existen entre los tratamientos con los distintos compuestos frente a IR (asteriscos rojos), y las diferencias de la presencia de CQ frente a su ausencia (círculos verdes). (* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$).

El siguiente paso fue la evaluación del efecto de los compuestos y de la CQ sobre la viabilidad celular en condiciones de O/R y de OGD-IR, para finalmente poder responder a la pregunta de si el efecto neuroprotector de estos compuestos está relacionado con una modulación de la autofagia. Así, en la Figura 78B, se puede observar que, a pesar de que todos los compuestos del ensayo (ChN2, QN23, HBN6, NAC y PBN) presentaron un buen efecto neuroprotector, sólo PBN, NAC y HBN6 vieron su efecto significativamente revertido por el tratamiento con CQ (el efecto de PBN se revirtió solo parcialmente). Este último resultado implica que solo en el caso de HBN6, PBN y NAC tienen una modulación autofágica que esté directamente implicada en su mecanismo neuroprotector, aunque ya sabemos por el trabajo anterior descrito en esta tesis (ver apartado 1 de

“Resultados”) ([Chamorro et al., 2020](#)), que no es el único mecanismo que permite el efecto protector de estos compuestos sobre la viabilidad celular en la línea SH-SY5Y.

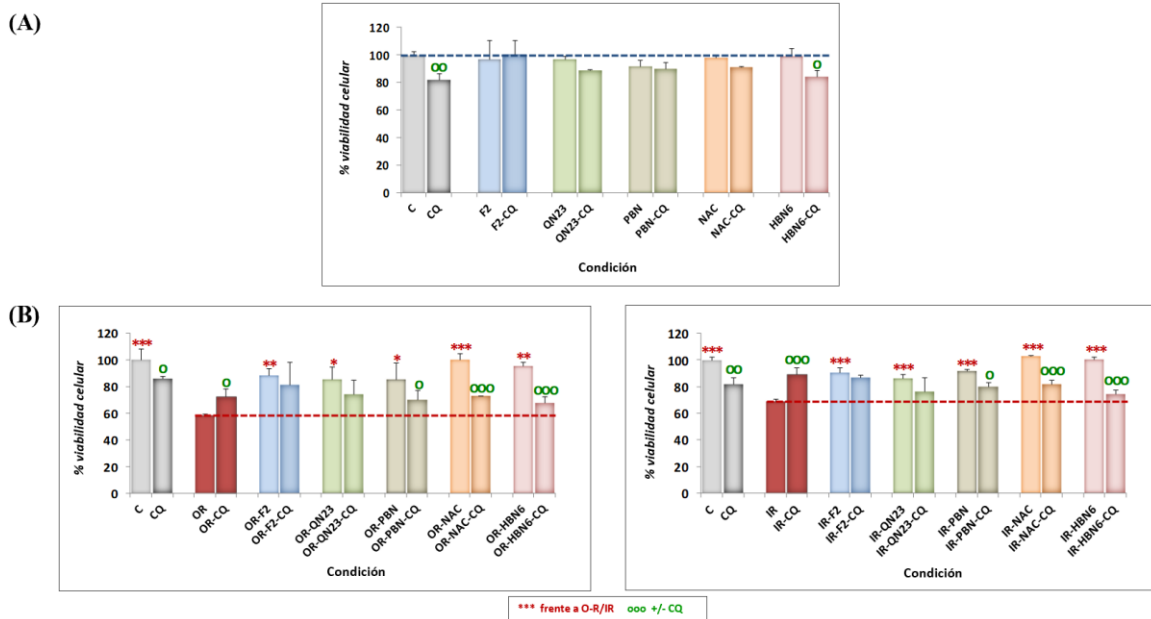


Figura 78. Efecto de los compuestos neuroprotectores ChN2, QN23, HBN6, PBN y NAC sobre la viabilidad celular de las SH-SY5Y tras los tratamientos de O/R y OGD, en ausencia o presencia de CQ. (A) Porcentaje de viabilidad celular en condiciones basales con los compuestos ChN2, QN23, HBN6, PBN y NAC con o sin CQ. (B) Porcentaje de viabilidad celular tras los tratamientos de O/R (izqda.) y OGD (dcha.), en presencia de ChN2, QN23, HBN6, PBN y NAC con o sin CQ. Los valores representados corresponden a la media \pm SEM de dos experimentos, cada uno realizado por duplicado y en distintos cultivos celulares. La evaluación estadística que se llevó a cabo (test ANOVA de una vía) muestra las diferencias significativas que existen entre los tratamientos con los distintos compuestos frente a O/R o IR, respectivamente (asteriscos rojos), y las diferencias de la presencia de CQ frente a su ausencia (círculos verdes). (* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$).



Discusión

V. DISCUSIÓN

El presente estudio pretendía profundizar en el análisis de los mecanismos neuroprotectores y antioxidantes de nuevas nitronas de síntesis, con el fin de examinar su potencial terapéutico para el tratamiento del ictus isquémico. Para ello, comenzamos nuestro trabajo con el estudio de varias nitronas derivadas de la PBN, la nitrona base, muy estudiada en trabajos anteriores del grupo (Samadi et al., 2011; Chioua et al., 2012; Chioua et al., 2019; Piotrowska et al., 2019).

Nuestros objetivos se dirigieron a profundizar en el conocimiento de los efectos neuroprotectores de las nitronas diseñadas, ensayados a un amplio rango de concentraciones, para tener los resultados de sus EC_{50} y capacidades neuroprotectora máximas y poder compararlos entre sí. Además, este estudio incluyó, no solo el conocimiento de su efecto neuroprotector sobre la capacidad metabólica celular general, sino sobre los dos tipos más importantes de muerte celular que subyacen a la isquemia cerebral, que son la necrosis (propia del *core* isquémico) y la apoptosis (propia de la penumbra isquémica). Utilizamos en todos los casos para efectos comparativos la nitrona base PBN, así como el agente antioxidante NAC.

1. Efecto neuroprotector y antioxidante de las homo-bis-nitronas (HBNs), las homo-tris-nitronas (HTNs) y las bi-fenil-nitronas (BPNs)

El estudio se inició con el análisis de compuestos conteniendo dos (HBNs) o tres grupos nitrona (HTNs), con el fin de testar la hipótesis de si cuanto mayor fuera el número de motivos nitrona en la misma estructura, mayor sería la capacidad protectora de estos compuestos. Dentro de estos compuestos los grupos nitrona se localizaron en distintas posiciones, *para-*, *meta-* y *orto-*, del anillo aromático. Paralelamente se diseñó el estudio para nitronas sustituidas con tres tipos de sustituyentes, *N*-Me, *N*-*t*-Bu y *N*-Bn, con el fin de conocer la influencia de los mismos en la capacidad neuroprotectora de las distintas HBNs y HTNs, al mismo tiempo que se analizaba también el efecto del sistema aromático bi-fenilo (BPNs), por si pudiera proporcionar mejores resultados que un simple anillo bencénico, tanto en *mono*-nitronas (BPMNs) como en *bis*-nitronas (BPHBNs).

A la vista de los resultados obtenidos, descritos en esta tesis, se puede deducir que, a pesar de que prácticamente todos los compuestos nitrona demostraron poseer mejor actividad neuroprotectora, antioxidante, anti-necrótica y anti-apoptótica que la molécula de referencia **PBN**, se apreciaron algunas diferencias entre los distintos tipos de nitronas.

Así, en cuanto a la evaluación biológica *in vitro* de la capacidad neuroprotectora de las **HBNs 1-9**, resultado de la incorporación de una segunda nitrona idéntica en las posiciones *para-* (**HBNs 1-3**), *meta-* (**HBNs 4-6**) y *orto-* (**HBNs 7-9**), y con sustituyentes metilo, *tert*-butilo o bencilo como grupos *N*-alquilo en el motivo nitrona, los resultados de la neuroprotección permitieron identificar a la *bis*-nitrona (1*Z*,1'*Z*)-1,1'-(1,3-fenileno)-*bis*-(óxido de *N*-bencil-*meta*-animina) (**HBN6**), con los dos motivos de nitrona en posición *meta-* y dos grupos *N*-bencilo en el esqueleto de la nitrona, como la nitrona más potente ($EC_{50} = 1,24 \pm 0,39 \mu\text{M}$). **HBN6** posee además un gran poder de eliminación de radicales hidroxilo (81%), en el mismo rango que Trolox (83%), y una gran capacidad para reducir la producción de superóxido en células de neuroblastoma humano ($EC_{50} = 5,91 \pm 1,09 \mu\text{M}$), que supera ampliamente las capacidades neuroprotectoras y antioxidantes de **PBN**. Este efecto podría estar relacionado con la exergonicidad de la adición del radical centrado en el oxígeno al átomo de carbono de la fracción nitrona ([Chamorro et al., 2020](#)). Los resultados del análisis ADME (Administración, Distribución, Metabolismo, Eliminación) *in silico* nos permitieron, además, predecir que **HBN6** podría ser administrado por vía oral, debido a su perfil farmacológico, biodisponibilidad, excelente liposolubilidad y adecuada farmacocinética, incluida la permeabilidad al CNS ([Chamorro et al., 2020](#)). En resumen, todas estas observaciones confirmaron que nuestra hipótesis de diseño inicial era correcta ("*dos grupos nitrona mejor que uno*"), y que ésta podría servir de guía para diseñar nuevos agentes neuroprotectores más eficaces para la terapia del ictus.

Posteriormente se diseñó el estudio de la neuroprotección y capacidad antioxidante de tres nuevas *tris*-nitronas de síntesis, las **HTNs 1-3** derivadas de la **PBN**, comparándolas con la **HBN6**, nuestra potente homo-*bis*-nitrona neuroprotectora más recientemente descubierta, y con las otras dos *meta*-**HBNs**, **HBN4** y **HBN5**. Nuestro diseño, respaldado por nuestros resultados anteriores, se basó en la hipótesis de que tres motivos nitrona instalados en el mismo esqueleto deberían proporcionar un mayor poder neuroprotector que dos grupos nitrona. En otras palabras, cuanto mayor fuese el número de grupos

nitrona eliminadores de radicales libres, mayores serán las propiedades antioxidantes y neuroprotectoras del compuesto.

La neuroprotección de las **HTNs 1-3**, tanto sobre el modelo O/R, como OGD-IR, mostró que **HTN2** y **HTN3**, con sustituyentes *N-t*-Bu y *N*-Bn, respectivamente, fueron los mejores agentes neuroprotectores a una dosis más baja (sus EC_{50} se encuentran en el rango de 50-80 μ M), pero mucho peores que las EC_{50} para sus dos HBNs homólogas, **HBN5** y **HBN6** (cuyas EC_{50} están en el rango de 1-2 μ M), es decir, el poder neuroprotector de las HTNs es unas 50 veces menor al de las HBNs. No obstante, ambas **HTNs 2** y **3** mostraron tener un muy buen perfil antinecrótico (IC_{50} del orden de 3-4 μ M), antiapoptótico y antioxidante (con valores de EC_{50} en el rango de 5-7 μ M), muy similar al de sus **HBNs** análogas, **HBN5** y **HBN6**. Además, **HTN3** fue capaz de inhibir en un 92% LP, LOX (70 μ M), y ABTS+ (10%), mostrando una elevada capacidad de secuestro de radicales hidroxilo (83%) y exhibiendo así la capacidad antioxidante equilibrada más potente entre las nitronas aquí investigadas ([Diez-Iriepa, Chamorro et al., 2020](#)). Por tanto, estos resultados muestran que, en general, las **HTNs 1-3** no presentan mejores propiedades que **HBN5** y **HBN6**, aunque superan claramente las de **PBN**. Desde el punto de vista de nuestro diseño de fármacos, está claro, por tanto, que la introducción de un tercer grupo nitrona adicional no parece proporcionar un beneficio adicional y acumulativo a la actividad neuroprotectora y antioxidante observada previamente para **HBN5**, pero sobre todo para **HBN6**, que poseen dos grupos nitrona. En otras palabras, *"más es mejor, pero mucho más es peor"* (Figura 79).

El presente resultado no es necesariamente negativo, ya que se trataba de un desarrollo necesario obvio en nuestro programa actual para identificar nitronas nuevas y más eficaces con fines terapéuticos, y posiblemente se trate de una tendencia general que debería tenerse en cuenta en los proyectos de descubrimiento de fármacos. En consecuencia, nuestros esfuerzos actuales en este campo se dirigen ahora a la modificación estructural racional y sensata de **HBN6**, y posiblemente también **HBN5**, para mejorar sus propiedades neuroprotectoras y antioxidantes.

Con este fin, y para con el objetivo de confirmar o desechar nuestra hipótesis anterior, estudiamos la capacidad neuroprotectora y antioxidante de cinco **BPNs** de nueva síntesis, que poseen un *core* aromático de bis-fenilo, y que son tanto *mono*- como *bis*-nitronas.

Los resultados obtenidos con estas nitronas **BPNs 1-5**, derivadas de la **PBN**, muestran que todas son más potentes que ésta, y tienen una actividad neuroprotectora y antioxidante bastante similar a la de **NAC**. Sin embargo, en general, son menos potentes en su capacidad neuroprotectora y antioxidante que las homo-*bis*-nitronas investigadas anteriormente, como las **HBNs 5 y 6**, o las homo-*tris*-nitronas **HTN2 y HTN3** ([Chamorro et al., 2021](#)).

Nuestros resultados sobre las **BPNs 1-5**, *mono*- (**BPMN 1-3**) y *bis*-nitronas (**BPHBN 4-5**), ponen de relieve una vez más, que la presencia de radicales *N-tert*-Bu y *N-Bn* en el motivo nitrona aumenta la capacidad neuroprotectora y antioxidante de estos compuestos, pero que la de un grupo *N-Me* produce efectos mucho más débiles en las actividades de las **BPNs** resultantes.

En cuanto a la conclusión de nuestros resultados anteriores de que "dos grupos nitrona son mejores que uno", los resultados del presente trabajo sólo la corroboran parcialmente. Así, aunque esta hipótesis se confirma y apoya por los buenos efectos anti-necróticos y anti-apoptóticos de la *N-t*-Bu *bis*-nitrona **BPHBN5** con respecto a la *N-t*-Bu *mono*-nitrona **BPMN2**, la *N-Me* *mono*-nitrona **BPMN1** muestra mejores efectos neuroprotectores y antioxidantes que la *N-Me* *bis*-nitrona **BPHBN4**. Por lo tanto, se puede concluir que, aunque como se ha descrito previamente en este trabajo, el número de grupos nitrona mejora el perfil neuroprotector de los compuestos, éste no es el único factor que puede afectar a su actividad, ya que la incorporación de un nuevo grupo fenilo en C4 en la estructura del **PBN**, unido al efecto final de la introducción de un segundo grupo nitrona en el nuevo anillo fenilo en la posición C4', dependerá del sustituyente que éste incorpore, mejorando el perfil de neuroprotección en el caso de la introducción de un segundo grupo *N-t*-Bu, pero no en el caso de un segundo sustituyente *N-Me*. Por último, cabe destacar que el **BPMN3** sustituido con un solo radical *N-Bn* es tan bueno como el **BPHBN5** con dos grupos *N-t*-Bu. Así pues, cabría esperar que el **BPHBN6**, con dos grupos *N-Bn*, tuviera aún mejores propiedades neuroprotectoras que su correspondiente *mono*-nitrona **BPMN3**.

Sin embargo, debido a su insolubilidad, no se pudieron realizar estas pruebas para comprobarlo.

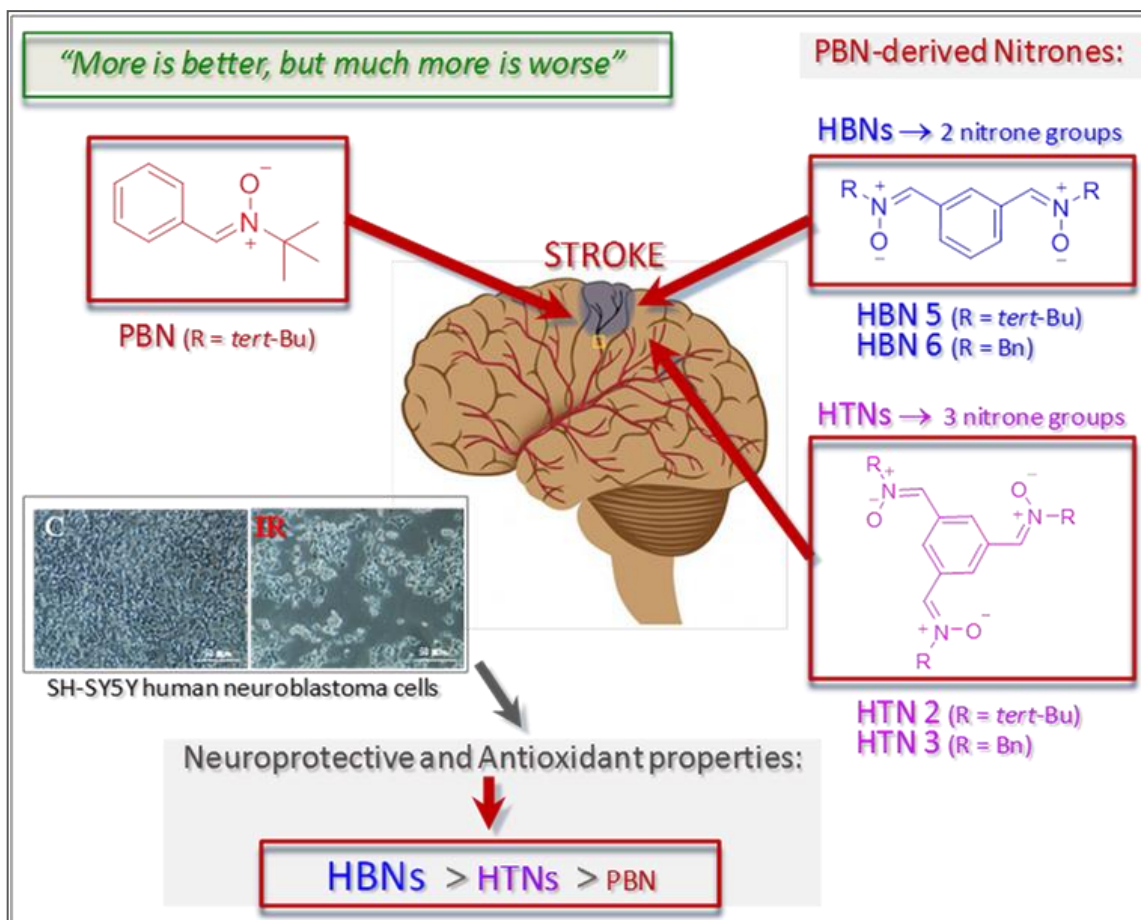


Figura 79. Diagrama gráfico que muestra las conclusiones más importantes de este trabajo. Las HTNs 2 y 3 tienen una buena actividad antioxidante y neuroprotectora frente a la muerte celular necrótica y apoptótica, muy similares a las de sus bis-nitronas homólogas HBN5 y HBN6. Sin embargo, tienen peor capacidad que sus homólogas para revertir las alteraciones metabólicas celulares inducidas por oligomicina A-rotenona y por isquemia-reperfusión in vitro en células de neuroblastoma humano SH-SY5Y. Por lo tanto, aunque las HTNs 2 y 3 superan las propiedades antioxidantes y neuroprotectoras de PBN, la adición de un tercer grupo nitrona no mejora, sino que empeora, la capacidad neuroprotectora observada en HBN5 y HBN6. En otras palabras, "más es mejor, pero mucho más es peor".

En cuanto al mecanismo de acción de todas estas nitronas, cabe destacar que una parte importante de su acción neuroprotectora recae en su buena actividad anti-necrótica, que habitualmente es mayor a su actividad anti-apoptótica, salvo en el caso de HTN3 que demostró un buen perfil anti-apoptótico, similar al de su efecto anti-necrótico. Dado que una de las formas más tempranas de muerte celular en la isquemia cerebral es la necrosis (apartado 2.1. de "Introducción"), el hecho de que estas nitronas tengan un buen perfil

anti-necrótico favorece su posible empleo como moléculas neuroprotectoras para el tratamiento del ictus isquémico en etapas tempranas del mismo.

Por otro lado, los efectos beneficiosos de estas nitronas se han observado en otros estudios *in vitro* ([Chamorro et al., 2020](#); [Diez-Iriepa, Chamorro et al., 2021](#); y [Chamorro et al., 2021](#)), analizando la actividad antioxidante de las **HBNs**, **HTNs** y **BPNs**, en diversos ensayos en ausencia de células. En ellos, se pudo comprobar que las mejores nitronas de cada grupo (**HBN5**, **HBN6**, **HTN2**, **HTN3**, **BPMN3** y **BPHBN5**), junto con **HBN7-9** que también demostraron una potente actividad antioxidante en nuestros ensayos en SH-SY5Y, demostraron poseer una potente capacidad para atrapar radicales hidroxilo, de entorno a un 80%, al mismo nivel que el compuesto de referencia Trolox (83%). Además, aquellos compuestos con sustituyente *N*-Bn, como **HBN9**, **HTN3** y **BPMN3** destacaron especialmente por presentar una gran inhibición de la peroxidación lipídica, ya sea en el ensayo de peroxidación del ácido linoleico con dihidrocloruro de 2,2'-azobis (2-amidinopropano) (AAPH) donde conseguían una inhibición del 88-100%, como en el ensayo de inhibición de la enzima lipooxigenasa (LOX), consiguiendo unas IC₅₀ de 57,5 μM (**BPMN3**), 70 μM (**HTN3**) y 85 μM (**HBN9**). Esto indica que los compuestos con sustituyente *N*-Bn tienen como mecanismo antioxidante adicional la capacidad de inhibir la peroxidación lipídica, lo que aumenta su rango de acción antioxidante.

Adicionalmente, se realizó el análisis de las propiedades farmacocinéticas de Absorción, Distribución, Metabolismo y Excreción (ADME) de las **homo-bis-nitronas** en el artículo científico de [Chamorro et al., 2020](#), permitiendo concluir que solo las tres HBNs con sustituyente *N*-Bn (**HBN3**, **HBN6** y **HBN9**) podrían ser fármacos oralmente activos, ya que solo violaban una de las reglas de Lipinski (Lipinski et al., 2012), lo que predice que son compuestos con buenas propiedades de absorción y permeabilidad *in vivo*, así como que se garantiza su biodisponibilidad y su potencial para atravesar correctamente la barrera hematoencefálica (BBB). En resumen, el sustituyente *N*-Bn parece conferir unas buenas propiedades farmacocinéticas a las nitronas donde se inserte.

Todas estas evidencias prometedoras de las nitronas derivadas de PBN estudiadas, especialmente de las **HBNs**, culminaron con la demostración de la eficacia neuroprotectora *in vivo* de **HBN6** (el mejor compuesto de toda la serie de **HBNs**), que

consiguió reducir en más de un 90% el volumen de infarto de ratones sometidos a una pMCAO a las 48 horas. Todo ello demuestra que la nitrona más prometedora de toda la gama HBN tiene efectos muy neuroprotectores *in vivo*, no solo *in vitro*, lo que la convierte en una de las principales moléculas hit de este trabajo de investigación.

2. Efecto neuroprotector y antioxidante de las nitronas derivadas de nucleótidos (NDNs)

En la búsqueda de nuevos compuestos con potencial antitumorigénico y antiviral, el grupo de la Dra. D. Piotrowska (Gotkowska et al., 2012), sintetizó cinco nitronas con estructura de isoxazolidín homonucleósidos, con la idea inicial de aunar el potencial antiviral de las nucleobases con el potencial antioxidante de las nitronas. Esas nitronas con alto poder antioxidante fueron las nitronas derivadas de nucleobases pirimidínicas **9a**, **9b**, **9c** y **9d**, y la nitrona derivada de nucleobases purínicas **9f**, que se han estudiado en este trabajo de tesis doctoral. En estudios previos (Piotrowska et al., 2016), se había examinado su posible efecto antiviral frente a una gran variedad de virus de DNA y RNA a concentraciones inocuas para las células, menores a 250 μM , así como su actividad anti-proliferativa frente a distintos tipos de líneas celulares cancerígenas. Sin embargo, no se encontraron signos de actividad antiviral ni anti-proliferativa, lo que llevó a los investigadores a explorar otras aplicaciones de estos compuestos. Así nació la colaboración, en este trabajo de tesis doctoral, con el grupo de la Dra. Dorota G. Piotrowska (Facultad de Farmacia, Universidad Médica de Lodz, Polonia), gracias a la cual se pudo evaluar la capacidad neuroprotectora de estas cinco nitronas derivadas de nucleobases (NDNs), así como de cuatro nuevas NDNs de síntesis, de tipo pirimidínica (las nitronas **9e**, **9h** y **9i**) y de tipo purínica (**9g**), aportando así una mayor variabilidad estructural al estudio ([Chamorro et al., 2022](#)).

La mayor parte de las NDNs demostraron tener un mejor perfil neuroprotector y antioxidante que la PBN, salvo las nitronas **9b** (R = Me), **9d** (R = Br) y **9e** (R = Cl), lo que queda reflejado en su capacidad de recuperación de la viabilidad celular, sus actividades anti-necróticas y anti-apoptóticas, y su actividad antioxidante en ensayos *in vitro*. Este

hecho puede estar vinculado al tamaño del sustituyente R, ya que cuanto mayor es su tamaño (Me > Br > Cl), peores son sus propiedades neuroprotectoras y antioxidantes. Éste también es el motivo de que, dentro del grupo de *mono*-nitronas pirimidínicas, los compuestos más neuroprotectores y antioxidantes fueran **9a** (R = H) y **9c** (R = F).

Por otro lado, las NDNs tienen un rango bastante amplio de efectividad neuroprotectora en cuanto al aumento de la viabilidad celular, muy similar al rango de las HBNs, que en ambos casos depende de la estructura de la nitrona. En general, las nitronas pirimidínicas (**9a-9e**, **9h** y **9i**) poseen un mejor perfil neuroprotector y antioxidante que las nitronas purínicas (**9f**, **9g**), salvo en el caso de la actividad anti-necrótica, donde las nitronas purínicas **9f** y **9g** destacaron sobre muchas de las pirimidínicas. Como ya ocurría con las nitronas derivadas de PBN (HBNs, HTNs y BPNs), la acción neuroprotectora de las NDNs se debe en gran parte a su actividad anti-necrótica, más que a su actividad anti-apoptótica, al menos para las nitronas pirimidínicas **9c** y **9a** y para las purínicas **9f** y **9g**. Sin embargo, curiosamente, las *bis*-nitronas pirimidínicas **9h** y **9i** destacaron sobre todo en cuanto a su actividad anti-apoptótica, sugiriendo que éstas podrían tener unos efectos neuroprotectores más útiles en etapas más tardías de recuperación tras un ictus isquémico, en las que el principal tipo de muerte es la apoptosis.

Como era de esperar, otro de los factores que influyen en la capacidad neuroprotectora de las NDNs es su actividad antioxidante. Ésta se analizó mediante el estudio de sus efectos sobre la producción y eliminación del radical superóxido en células de neuroblastoma humano SH-SY5Y. Una vez más, las nitronas pirimidínicas **9a** y **9c** y en este caso también **9b**, y las nitronas purínicas **9f** y **9g** mostraron mejores propiedades antioxidantes, lo que concuerda con sus propiedades neuroprotectoras sobre la capacidad metabólica neuronal y con su capacidad anti-necrótica, y no con su actividad anti-apoptótica. En resumen, se podría concluir que, de nuevo, **la presencia de dos grupos nitrona favorece significativamente la actividad antioxidante del compuesto**, ya que fueron las *bis*-nitronas pirimidínicas **9h** y **9i** los compuestos que mayor actividad antioxidante demostraron en estos ensayos, muy parecida a la de las HBNs **5-9**, que fueron los compuestos más antioxidantes de entre los derivados de PBN, confirmando las buenas propiedades antioxidantes de las nitronas derivadas de nucleobases.

Esta actividad antioxidante también quedó reflejada en los estudios *in vitro* que se recogen en el artículo de [Chamorro et al., 2022](#). Estos estudios incluyen diferentes ensayos antioxidantes, como la inhibición de la LOX, la inhibición de la peroxidación lipídica inducida por el AAPH, la interacción con el radical libre estable 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH), el atrapamiento de radicales hidroxilo, y la eliminación del radical catiónico ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS^{•+}) en comparación con la PBN. La mayoría de estas nitronas compiten fuertemente con el DMSO por los radicales hidroxilo, considerándose, por tanto, como potentes agentes atrapadores de ROS, que además también inhiben la peroxidación lipídica *in vitro*.

Las nitronas **9c**, **9f** y **9g** poseen los mejores valores de IC₅₀ para la inhibición de la lipoxigenasa, dentro de las NDNs. Un perfil antioxidante favorable puede considerarse un factor conveniente para el desarrollo de moléculas bioactivas funcionales para el tratamiento de la AD o el ictus, enfermedades del envejecimiento relacionadas con un exceso de ROS, y con la neuroinflamación.

En resumen, la combinación de bases nucleotídicas de purina y pirimidina, incorporando uno o dos grupos nitrona, da lugar a nuevas nitronas que contienen nucleobases con mejores capacidades antioxidantes y neuroprotectoras que nitronas, como la PBN o las **homo-bis-nitronas** derivadas de PBN (HBNs), por sí solas. Esto podría deberse a la combinación de las propiedades antioxidantes de las nitronas con la activación de la síntesis de los nucleótidos de uracilo y adenina, que, al fosforilarse en el interior de la célula, mejoran la capacidad energética y metabólica de la célula mediante la síntesis de moléculas de alta energía como el ATP o de transportadores de azúcares como el UTP, o la síntesis de ácidos nucleicos por el aumento de la actividad de enzimas como la ribonucleótido-reductasa (Greene et al. 2020). En este trabajo hemos descubierto las nitronas pirimidínicas **9a** y **9c** y las purínicas **9f** y **9g**, como nitronas con mejores propiedades antioxidantes y neuroprotectoras que la PBN, e incluso que las HBNs, también estudiadas en esta tesis ([Diez-Iriepa, Chamorro et al., 2021](#)), que podrían ser buenas candidatas para la terapia del ictus.

Se ha descrito que la combinación de un derivado de la tetrametilpirazina con un potente capturador de ROS como el grupo nitrona disminuye el tamaño del infarto cerebral y el

déficit neurológico en modelos de ictus en ratas y primates no humanos a través de mecanismos de acción multifactoriales (Zhang et al, 2016). Por lo tanto, sería muy interesante seguir investigando la actividad de estas nitronas derivadas de nucleobases en modelos *in vivo* de isquemia cerebral.

3. Efecto neuroprotector y antioxidante de las quinolil-nitronas (QNs)

En el afán de nuestro grupo de investigación por sintetizar y describir nuevos compuestos nitrona de posible aplicación al tratamiento de las enfermedades relacionadas con la edad (ARDs), y especialmente en la isquemia cerebral, en el artículo de Chioua et al., 2012 se sintetizaron y evaluaron dos QNs, en concreto de estructura 2-cloro-6-metil-QN: **RP18** (R = *N-t*-Bu) y **RP19** (R = *N*-Bn). Ambos compuestos demostraron una actividad antioxidante muy potente, ya que eran altamente eficaces en la eliminación de OH \cdot , y una elevada actividad neuroprotectora, siendo capaces de recuperar el 70% de viabilidad celular, actividad debida en gran parte a su efecto reductor de la muerte por necrosis. Además, **RP18** demostró ser un potente inhibidor de la peroxidación lipídica no dependiente de enzimas y poseer la capacidad de atravesar la BBB. Por otro lado, **RP19** (Ayuso et al., 2017) presenta un buen perfil neuroprotector y antioxidante de esta molécula en cultivos primarios de neuronas, ya que era capaz, a concentraciones moderadas, de inducir neuroprotección a largo plazo de hasta 5 días tras la OGD. Este efecto neuroprotector estaba respaldado por un claro efecto antioxidante de **RP19**, que fue capaz de disminuir la formación de O $_2^{\cdot-}$ y OH \cdot , así como de reducir considerablemente el volumen de infarto en ratones en ensayos *in vivo* de tMCAO, y de disminuir la apoptosis neuronal *in vivo*, consiguiendo, en consecuencia, una mejoría en los test neurológicos de los animales a 48 h o 5 días después de la isquemia. Estos resultados, recogidos en ambos trabajos, llevaron a las QNs **RP18** y **RP19** a convertirse en buenos candidatos para el tratamiento de la CI, aunque se precisaban estudios adicionales para confirmarlo.

Dados los prometedores resultados neuroprotectores y antioxidantes de estas QNs, se quiso ampliar la gama de QNs y explorar así las capacidades de nuevos compuestos con distintas estructuras. De esa manera, se sintetizaron nuevas QNs recogidas en el artículo

de Chioua et al., 2019, y se observó que todas ellas mejoraron significativamente la viabilidad celular de cultivos primarios de neuronas 24 horas después de la inducción de OGD. Este descubrimiento constató la eficacia de algunas QNs, lo que animó a nuestro grupo a diseñar, sintetizar y evaluar nuevas QNs diferentes a las que se habían estudiado hasta ese momento.

Estos fueron los antecedentes que llevaron a la síntesis y evaluación biológica de las QNs de este trabajo de investigación, las QNs 1-6, que son 2 8-metoxi-QNs (QN1 y QN2) y 4 8-hidroxi-QNs (QN3-QN6), cuyos resultados se recogieron en el artículo de [Chamorro et al., 2023a](#). Estos derivados de quinolina mostraron un efecto neuroprotector muy destacable, bastante similar al ejercido por las HBNs 4-6, que, como comentamos en el apartado 1 de esta discusión, fueron unas de las mejores nitronas que habíamos estudiado. Además, este efecto neuroprotector se debió en parte a las excelentes actividades anti-necróticas y anti-apoptóticas de los mismos, lo que sugiere que las nitronas QNs 8-sustituidas podrían emplearse para el tratamiento temprano (actividad anti-necrótica) y más tardío (actividad-anti-apoptótica) del ictus isquémico. Por otro lado, es necesario destacar que, como ya observamos en el caso de las HBNs o las NDNs, el tipo de estructura del compuesto es bastante relevante, ya que, en general, los compuestos sustituidos con cloro (QNs 1-4) obtuvieron mejores resultados anti-necróticos y anti-apoptóticos. Sin embargo, en cuanto a su poder antioxidante *in vitro* frente a $O_2^{\bullet-}$, los compuestos 2-cloro-QN fueron significativamente menos antioxidantes, de forma que las 8-hidroxi-QNs 6 y 5 fueron los compuestos con mayor eficacia en la eliminación de radical $O_2^{\bullet-}$. Además, solo en el caso de las 8-hidroxi-QNs se pudo constatar la influencia del tipo de N-sustituyente de las nitronas, ya que QN6, con sustituyente *N*-Bn es significativamente más neuroprotectora y antioxidante que QN5, con sustituyente *N*-*t*-Bu.

A pesar de las diferencias en actividad antioxidante frente a $O_2^{\bullet-}$ asociadas a la estructura de los compuestos, cabe destacar que estas QNs tuvieron un poder antioxidante de un orden de magnitud similar al de las NDNs, y que la más antioxidante de todas, QN6, mostró una actividad muy similar a la de las HBNs 4-6, HTNs 2-3 y las NDNs *bis*-nitronas pirimidínicas 9h y 9i. Además, tal y como se observó en los ensayos antioxidantes *in vitro* descritos en [Chamorro et al., 2023a](#), QN6 demostró un potente poder reductor del catión radical ABTS^{•+} (81,4%), en el mismo rango que la molécula de referencia Trolox (91%).

Este resultado fue interesante, ya que el catión ABTS^{•+} no se había correlacionado anteriormente con efectos biológicos y, por consiguiente, se desconocía su relevancia real para la eficacia antioxidante *in vivo*. Por tanto, el potente efecto reductor de QN6 de este catión-radical fue un punto adicional de interés, y un reto para probar QN6 en el modelo de accidente cerebrovascular *in vivo*. Con todas estas evidencias previas, en este trabajo se estudió el potencial neuroprotector de QN6 *in vivo*, demostrando que fue capaz de reducir el volumen de infarto en un 75% en ratones sometidos a pMCAO. Así pues, QN6 es una de las mejores nitronas neuroprotectoras estudiadas en este trabajo de tesis doctoral (Figura 80).

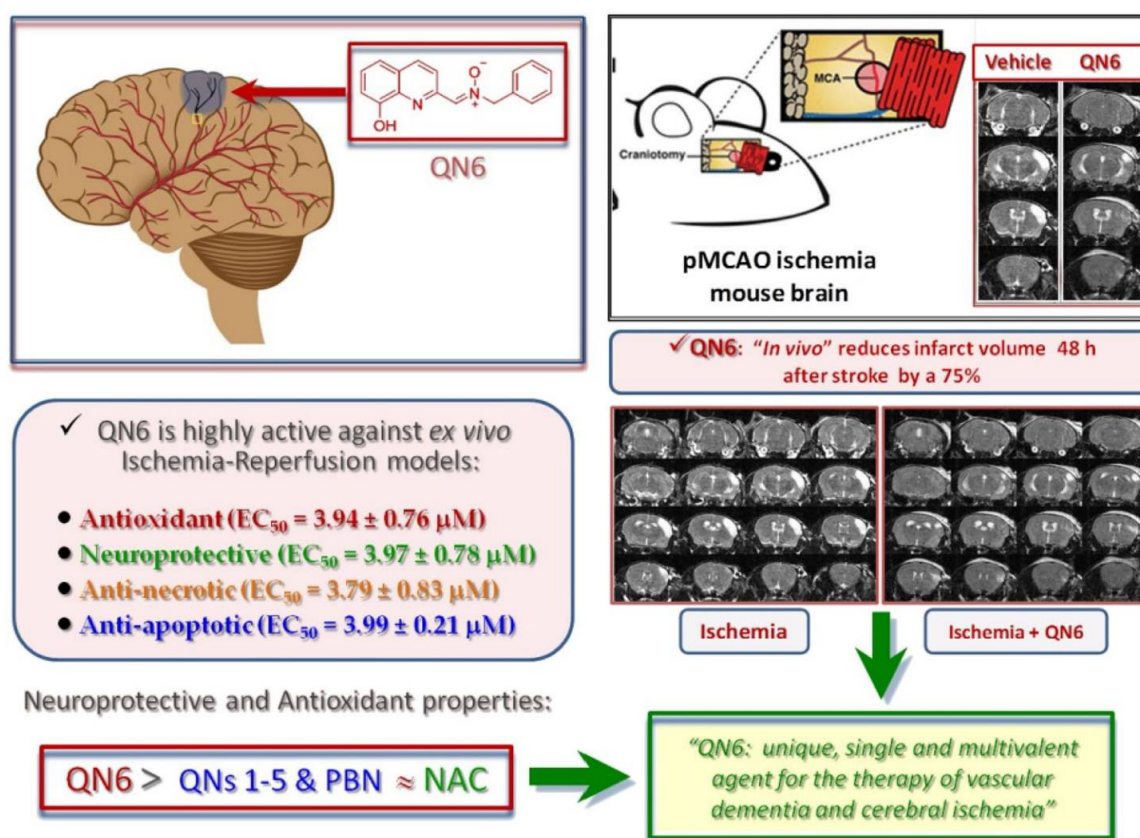


Figura 80. QN6 como agente único y multivalente para la terapia de la demencia vascular y la isquemia cerebral.

En paralelo a nuestro trabajo, QN6 se estudió junto con otras 18 QNs, identificándose como un posible compuesto multifuncional para la terapia de varias enfermedades neurodegenerativas. Así, QN6, sin tener ningún elemento farmacóforo típico que sugiriese la inhibición de la ChE o la MAO, inesperadamente demostró inhibir de forma

muy eficaz, tanto a la hBChE ($IC_{50} = 1.06 \pm 0.31$ nM), como a la hMAO-B ($IC_{50} = 4,46 \pm 0,18$ μ M), uniéndose 1 molécula de QN6 en conformación extendida al sitio activo de la enzima (Knez et al., 2023). Además, dosis pequeñas de QN6 tuvieron efectos neuroprotectores significativos en células SH-SY5Y tratadas con 6-OH-dopamina (6-OHDA). Estos resultados apuntan a la posibilidad de emplear QN6 para el tratamiento de la Enfermedad de Parkinson (PD), ya que la enzima hMAO-B es una de las dianas farmacológicas actuales de la PD (Riederer & Laux, 2011) y la 6-OHDA es ampliamente empleada en modelos experimentales celulares de PD. Por otro lado, QN6 también manifestó aptitud para su empleo en la enfermedad neurodegenerativa y demencia más común, la Enfermedad de Alzheimer (AD), debido a su gran efectividad en la inhibición de las colinesterasas humanas (hAChE y hBChE), con una IC_{50} de orden nanomolar, encontrándose en el mismo rango de inhibición que uno de los tratamientos actuales de la AD, el Donepezilo. Por último, QN6 demostró importantes efectos anti-amnésicos en modelos murinos de AD inducida por escopolamina, mejorando el aprendizaje y la memoria de los ratones en las tarea de evitación pasiva y de reconocimiento de nuevos objetos. En suma, teniendo en cuenta la eficacia neuroprotectora y antioxidante de QN6 sobre el ictus isquémico, demostrada en este trabajo de investigación, y su elevada capacidad de neuroprotección en los modelos de AD (Knez et al., 2023), así como su capacidad para atravesar la BBB con facilidad, podemos considerar a QN6 como un compuesto único y polivalente para el tratamiento de diversas ARDs, entre las que destacarían el ictus isquémico y la AD, pero también podría ser útil para la terapia de la demencia vascular, otra de las demencias más frecuentes en personas de edad avanzada (Figura 80).

4. Efecto neuroprotector y antioxidante de la ChN2 y QN23

Dado que los esteroides son compuestos neuroprotectores debido a su capacidad para prevenir la inflamación en el sistema nervioso central (Stein, 2011), en nuestro grupo de trabajo se ha diseñado, sintetizado y evaluado biológicamente la colesteronitrona ChN2 (Ayuso et al., 2015), como potente híbrido nitrona-esteroide, neuroprotector y antioxidante, frente al daño isquémico en modelos experimentales *in vitro* e *in vivo*, aumentando de forma significativa la viabilidad celular en cultivos primarios de neuronas

a corto y a largo plazo, y disminuyendo los déficits neurológicos de las ratas sometidas a tMCAO.

Por otro lado, como ya hemos mencionado previamente (ver apartado 3 de “Discusión”), en el grupo de investigación se habían sintetizado y evaluado numerosas QNs (Chioua et al., 2012; Ayuso et al., 2017; Chioua et al., 2019) que consiguieron mejorar la viabilidad neuronal 24 h después del tratamiento de OGD. Entre ellas, destacó el óxido de (Z)-N-tert-butil-1-(2-cloro-6-metoxiquinolin-3-il) metanimina (QN23) que demostró ser un potente agente neuroprotector y antioxidante en cultivos primarios de neuronas, con una gran capacidad para atrapar OH⁻ y O₂[•] *in vitro*, y una buena capacidad neuroprotectora, de reducción del tamaño de infarto y de la muerte celular por apoptosis en el modelo de isquemia experimental *in vivo* por tMCAO (Chioua et al., 2019).

Estos trabajos sirvieron de precedentes para realizar en esta tesis una evaluación biológica más amplia de los compuestos ChN2 y QN23, cuyas actividades sobre distintos tipos de muerte neuronal se compararon con HBN6, una de nuestras “nitronas hit” descritas en este trabajo de investigación, en el artículo [Chamorro et al., 2023b](#), además de con PBN y NAC. Las nitronas ChN2 y QN23 demostraron una buena actividad neuroprotectora en los dos modelos de daño celular empleados en este trabajo, O/R y OGD, a pesar de detectarse una actividad neurotóxica a nivel basal muy relevante a partir de los 100 y 500 μM para ChN2 y QN23, respectivamente. Este efecto neurotóxico podría ser parte del motivo por el que ChN2 y QN23 son especialmente eficaces en la neuroprotección a concentraciones muy bajas, incluso de 0,001 μM, pero no consiguen alcanzar los niveles de neuroprotección tan elevados como los de HBN6 a concentraciones altas (de 100-1000 μM). Su efecto neuroprotector está ligado al buen efecto anti-necrótico y anti-apoptótico de ChN2 y QN23, a pesar de que HBN6 es ligeramente más anti-apoptótica que las otras dos nitronas. Además, a pesar de que la actividad antioxidante de ChN2 y QN23 está en un rango similar a la de HBN6, este último compuesto parece ser ligeramente más antioxidante que ellos. También se puede destacar el hecho de que la estructura esteroide de ChN2 favorece su actividad neuroprotectora, anti-necrótica y anti-apoptótica respecto a QN23, aunque ambos compuestos están a niveles muy similares entre sí. En concreto, el efecto neuroprotector de ChN2 depende principalmente de sus actividades anti-necrótica y anti-apoptótica (ésta última influye en su actividad antioxidante), mientras que el efecto

neuroprotector de **QN23** es dependiente en la misma medida de su actividad antioxidante, anti-necrótica y anti-apoptótica, estando estas dos últimas ligadas a la actividad antioxidante de la molécula. Estos resultados son muy similares a los obtenidos con **HBN6** y **NAC**, cuyas actividades antioxidantes, anti-necróticas y anti-apoptóticas contribuyen de igual manera a sus efectos neuroprotectores. Como ya ocurría con el resto de nitronas estudiadas en este trabajo de investigación, **ChN2** y **QN23** presentaron también un mejor perfil neuroprotector y antioxidante que **PBN**, cuyo efecto neuroprotector está principalmente relacionado con su efecto anti-apoptótico (Figura 81).

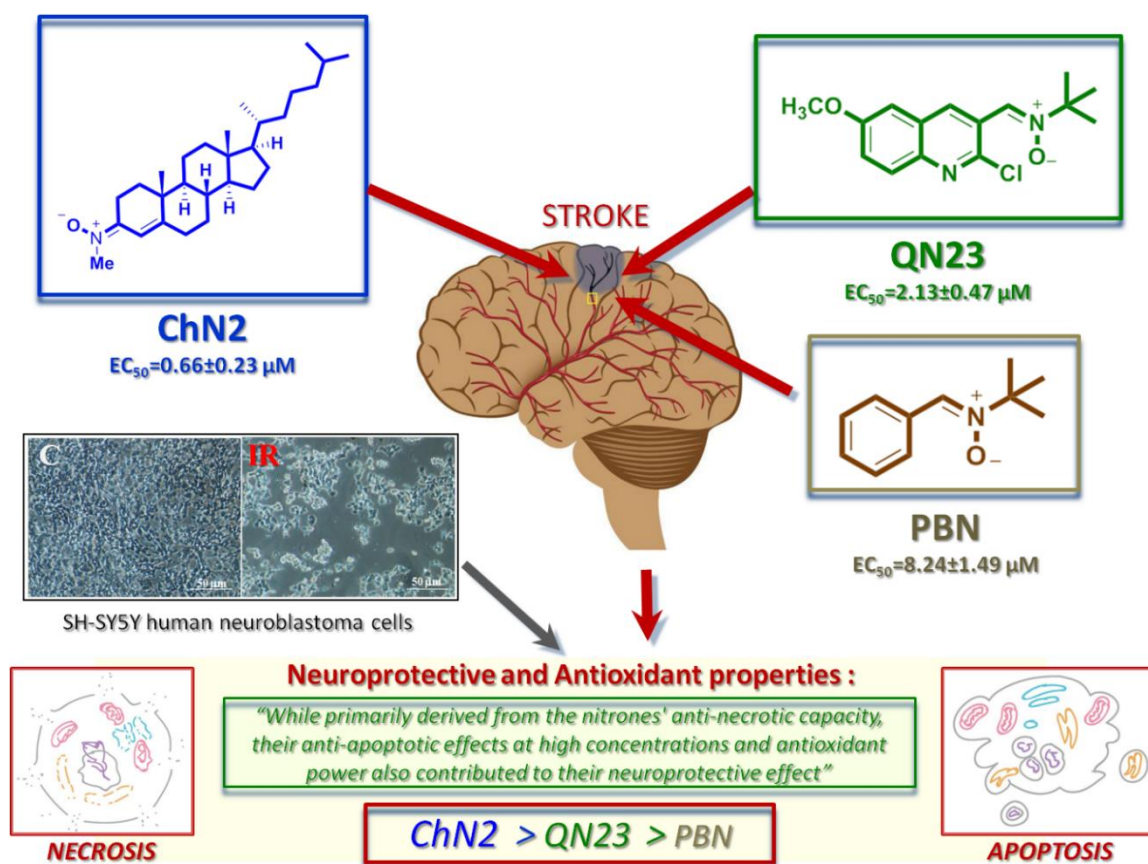


Figura 81. Diagrama gráfico que muestra las conclusiones más importantes de este trabajo sobre el efecto neuroprotector de **ChN2** y **QN23**. Nuestros resultados destacan el prometedor potencial terapéutico de **ChN2** y **QN23** como agentes neuroprotectores, especialmente a bajas concentraciones. En particular, **ChN2** y **QN23** mostraron propiedades anti-necróticas significativas, actuaron como moléculas antioxidantes eficaces y mostraron efectos anti-apoptóticos, aunque con eficacias más limitadas y sólo a altas concentraciones. Además, el efecto neuroprotector de **ChN2** se basó principalmente en sus actividades anti-necrótica y anti-apoptótica, mientras que en el de **QN23**, el efecto antioxidante juega un papel tan importante como su efecto anti-necrótico y anti-apoptótico. La autofagia no parece jugar ningún papel importante sobre su efecto neuroprotector, especialmente en el caso de la **ChN2**. Estos resultados proponen a **ChN2** y **QN23** como candidatos prometedores para el tratamiento del ictus isquémico, ya que sus efectos neuroprotectores son evidentes incluso a bajas concentraciones.

Asimismo, otro mecanismo que parece estar influyendo en la muerte celular inducida por estrés oxidativo (O/R) o por privación de oxígeno y glucosa (OGD) es la autofagia, aunque en condiciones basales esté implicada en supervivencia celular. Gracias al análisis de la expresión de proteínas autofágicas, como LC3-I y II, y p62 en este trabajo, pudimos observar que **ChN2** y **QN23** podrían modular el flujo autofágico, pero esta modulación parece no influir en su mecanismo neuroprotector; hecho que sí ocurre en el caso de **HBN6**, **NAC** y **PBN**, cuya modulación de la autofagia parece ser uno de sus mecanismos de neuroprotección frente a la isquemia experimental.

Actualmente, con idea de profundizar en el estudio de la participación de la autofagia en el efecto neuroprotector de estas nitronas, se está ensayando el papel que diversas rutas de señalización pudieran tener en su efecto neuroprotector. Por último, y para tener una visión más clara sobre el mecanismo de neuroprotección de estas nitronas, actualmente se estudia su efecto sobre otros mecanismos de muerte neuronal, como la piroptosis (inflamasona NLRP3) y la ferroptosis, mecanismos de muerte celular que también subyacen a la isquemia cerebral (Gao et al., 2017; Bai et al., 2020) y cuyo mecanismo de señalización pudiese entrecruzarse con el de la autofagia (Liu et al., 2020).



Conclusiones

VI. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en este estudio han conducido a las siguientes conclusiones.

- 1) **HBN6**, con dos motivos de nitrona en posición *meta*- y dos grupos *N*-bencilo, es el agente neuroprotector más potente de todas las **homo-bis-nitronas** ensayadas en una línea celular de neuroblastoma humano sometida a modelos *in vitro* de isquemia-reperfusión (OGD-IR) y de estrés oxidativo (O/R), ya que previene la disminución de la actividad metabólica celular, presenta importantes efectos anti-necróticos y anti-apoptóticos y muestra un gran poder antioxidante *in vitro*, superando a la nitrona madre **PBN** en todos estos parámetros. Además, en un modelo *in vivo* de pMCAO en ratón, **HBN6** reduce muy significativamente el volumen del infarto ($\approx 90\%$).
- 2) Dentro de las **bi-fenil-nitronas** estudiadas, las **BPHBNs** – y en concreto la **BPHBN5**, con dos radicales *N-tert*-Bu en cada motivo nitrona – presentan mayor capacidad neuroprotectora *in vitro* que las **BPMNs**, tanto ante la reducción de la viabilidad celular, como frente a la muerte celular por necrosis y apoptosis, y ante la producción de anión superóxido.
- 3) **HTN2** y **HTN3**, con tres motivos nitrona y sustituyentes *N-tert*-Bu y *N*-Bn, muestran efectos anti-necróticos, anti-apoptóticos y antioxidantes similares a los de sus *bis*-nitronas homólogas **HBN5** y **HBN6**, pero una menor capacidad para revertir las alteraciones metabólicas celulares inducidas por los modelos *in vitro* de isquemia cerebral.
- 4) Las nitronas derivadas de nucleobases (**NDNs**) tienen mejores propiedades neuroprotectoras y antioxidantes *in vitro* las que **PBN**, destacando especialmente las derivadas de purina (**9f** y **9g**), seguidas de las de pirimidina con sustituyentes H o F (**9a** y **9c**). Sin embargo, la introducción de un sustituyente metilo o de sustituyentes halógenos pesados, como Br o Cl, empeora su potencial neuroprotector.
- 5) **QN6**, una 8-hidroxi-quinolil-nitrona con un sustituyente *N*-bencilo, es la más equilibrada de todas las **QNs** estudiadas *in vitro*, revirtiendo significativamente la disminución de la actividad metabólica neuronal, protegiendo frente a necrosis y apoptosis, y demostrando la mayor capacidad antioxidante. Asimismo, el tratamiento con **QN6** en un modelo *in vivo* de pMCAO en ratón disminuye notablemente el volumen de

la lesión cerebral ($\approx 75\%$). Todo esto se suma a su eficacia neuroprotectora demostrada previamente en modelos de AD y PD.

6) **ChN2** y **QN23** muestran efectos neuroprotectores significativos, comparables a los de **HBN6** y **NAC**, y superiores a los de **PBN**. Su actividad neuroprotectora parece derivar de su poder anti-necrótico a bajas concentraciones y de sus efectos anti-apoptóticos y antioxidantes a concentraciones más altas. Sin embargo, ni la activación ni la inhibición de la autofagia parecen estar implicadas en su capacidad neuroprotectora, a diferencia de lo que ocurre con **HBN6**, cuyo papel modulador de la autofagia subyace a sus mecanismos neuroprotectores y podría explicar su elevada eficacia en modelos *in vivo* de isquemia cerebral.

Conclusión final y perspectivas futuras:

Las cinco familias nuevas de nitronas de síntesis ensayadas en modelos *in vitro* de isquemia cerebral presentan destacables efectos antioxidantes y neuroprotectores frente al daño neuronal y, principalmente, frente a la muerte celular necrótica y apoptótica. Los buenos resultados obtenidos en el estudio de las **HBNs** y las **BPNs** confirman que la capacidad neuroprotectora de los compuestos con dos motivos nitrona insertados en el mismo *core* es mayor que la de aquellos con un solo motivo nitrona, lo cual podría servir de guía para diseñar agentes neuroprotectores más eficaces para la terapia del ictus. Sin embargo, este trabajo también evidencia que la adición de un tercer grupo nitrona no sólo no mejora, sino que empeora, la actividad neuroprotectora de las nitronas.

Cabe destacar el gran potencial neuroprotector de **HBN6** y de **QN6**, ya que además de que ambas resultan muy efectivas en modelos *in vivo* de ictus, **HBN6** es capaz de modular la muerte celular por autofagia y **QN6** presenta efectos neuroprotectores en modelos celulares de distintas ARDs.

Actualmente se están realizando experimentos para determinar con más exactitud el papel que juega la modulación de la autofagia en la acción neuroprotectora de estas nitronas, y el tipo concreto de muerte celular necrótica frente al que protegen (p. ej.

necroptosis, piroptosis), y sus vías de señalización, para tener una imagen más completa de los mecanismos de acción moleculares que asemejan y diferencian a estas neuronas.



Bibliografía

VII. BIBLIOGRAFÍA

- Abubakar, M. B., Sanusi, K. O., Ugusman, A., Mohamed, W., Kamal, H., Ibrahim, N. H., Khoo, C. S., & Kumar, J. (2022). Alzheimer's disease: An update and insights into pathophysiology. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 14. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2022.742408>
- Adams, L., Franco, M. C., & Estevez, A. G. (2015). Reactive nitrogen species in cellular signaling. *Experimental Biology and Medicine*, 240(6), 711–717. <https://doi.org/10.1177/1535370215581314>
- Adam-Vizi, V., & Chinopoulos, C. (2006). Bioenergetics and the formation of mitochondrial reactive oxygen species. *Trends in Pharmacological Sciences*, 27(12), 639–645. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2006.10.005>
- Adhami, F., Liao, G., Morozov, Y. M., Schloemer, A., Schmithorst, V. J., Lorenz, J. N., Dunn, R. S., Vorhees, C. V., Wills-Karp, M., Degen, J. L., Davis, R. J., Mizushima, N., Rakic, P., Dardzinski, B. J., Holland, S. K., Sharp, F. R., & Kuan, C.-Y. (2006). Cerebral ischemia-hypoxia induces intravascular coagulation and autophagy. *The American Journal of Pathology*, 169(2), 566–583. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2006.051066>
- Agnello, L., & Ciaccio, M. (2022). Neurodegenerative Diseases: From molecular basis to therapy. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(21), 12854. <https://doi.org/10.3390/ijms232112854>
- Ahmed, N., Wahlgren, N., Grond, M., Hennerici, M., Lees, K. R., Mikulik, R., Parsons, M., Roine, R. O., Toni, D., & Ringleb, P. (2010). Implementation and outcome of thrombolysis with Alteplase 3–4·5 H after an acute stroke: An updated analysis from sits-ISTR. *The Lancet Neurology*, 9(9), 866–874. [https://doi.org/10.1016/s1474-4422\(10\)70165-4](https://doi.org/10.1016/s1474-4422(10)70165-4)
- Anderson, M. F., Nilsson, M., Eriksson, P. S., & Sims, N. R. (2004). Glutathione monoethyl ester provides neuroprotection in a rat model of stroke. *Neuroscience Letters*, 354(2), 163–165. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2003.09.067>
- Antunes, M., & Biala, G. (2012). The novel Object recognition memory: Neurobiology, test procedure, and its modifications. *Cognitive Processing*, 13(2), 93–110. <https://doi.org/10.1007/s10339-011-0430-z>
- Astrup, J., Siesjö, B. K., & Symon, L. (1981). Thresholds in cerebral ischemia - the ischemic penumbra. *Stroke*, 12(6), 723–725. <https://doi.org/10.1161/01.str.12.6.723>
- Ayuso, M. I., Chioua, M., Martínez-Alonso, E., Soriano, E., Montaner, J., Masjuán, J., Hadjipavlou-Litina, D. J., Marco-Contelles, J., & Alcázar, A. (2015). Cholesteronitrones for stroke. *Journal of Medicinal Chemistry*, 58(16), 6704–6709. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.5b00755>
- Ayuso, M. I., Martínez-Alonso, E., Chioua, M., Escobar-Peso, A., Gonzalo-Gobernado, R., Montaner, J., Marco-Contelles, J., & Alcázar, A. (2017). Quinolinylnitrene RP19 induces neuroprotection after transient brain ischemia. *ACS Chemical Neuroscience*, 8(10), 2202–2213. <https://doi.org/10.1021/acscchemneuro.7b00126>
- Bai, Q., Liu, J., & Wang, G. (2020). Ferroptosis, a regulated neuronal cell death type after intracerebral hemorrhage. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 14. <https://doi.org/10.3389/fncel.2020.591874>

- Baker, W. L., Anglade, M. W., Baker, E. L., White, C. M., Kluger, J., & Coleman, C. I. (2009). Use of N-acetylcysteine to reduce post-cardiothoracic surgery complications: A meta-analysis. *European Journal of Cardio-Thoracic Surgery*, 35(3), 521–527. <https://doi.org/10.1016/j.ejcts.2008.11.027>
- Balaganapathy, P., Baik, S.-H., Mallilankaraman, K., Sobey, C. G., Jo, D.-G., & Arumugam, T. V. (2017). Interplay between notch and p53 promotes neuronal cell death in ischemic stroke. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 38(10), 1781–1795. <https://doi.org/10.1177/0271678x17715956>
- Baltan, S. (2006). Surviving Anoxia: A tale of two white matter tracts. *Critical ReviewsTM in Neurobiology*, 18(1–2), 95–103. <https://doi.org/10.1615/critrevneurobiol.v18.i1-2.100>
- Barba, R., Martínez-Espinosa, S., Rodríguez-García, E., Pondal, M., Vivancos, J., & Del Ser, T. (2000). Poststroke dementia: clinical features and risk factors. *Stroke*, 31(7), 1494–1501. <https://doi.org/10.1161/01.str.31.7.1494>
- Becker, D. A., Ley, J. J., Echegoyen, L., & Alvarado, R. (2002). Stilbazulenylnitron (Stazn): a nitronyl-substituted hydrocarbon with the potency of classical phenolic chain-breaking antioxidants. *Journal of the American Chemical Society*, 124(17), 4678–4684. <https://doi.org/10.1021/ja011507s>
- Belikov, A. V. (2019). Age-related diseases as vicious cycles. *Ageing Research Reviews*, 49, 11–26. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2018.11.002>
- Birben, E., Sahiner, U. M., Sackesen, C., Erzurum, S., & Kalayci, O. (2012). Oxidative stress and Antioxidant Defense. *World Allergy Organization Journal*, 5(1), 9–19. <https://doi.org/10.1097/wox.0b013e3182439613>
- Broussalis, E., Killer, M., McCoy, M., Harrer, A., Trinkka, E., & Kraus, J. (2012). Current therapies in ischemic stroke. part A. recent developments in acute stroke treatment and in stroke prevention. *Drug Discovery Today*, 17(7-8), 296–309. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2011.11.005>
- Butterfield, D. A. (2018). Perspectives on oxidative stress in Alzheimer's disease and predictions of future research emphases. *Journal of Alzheimer's Disease*, 64(s1). <https://doi.org/10.3233/jad-179912>
- Cao, X., & Phillis, J. W. (1994). α -phenyl-tert-butyl-nitron reduces cortical infarct and edema in rats subjected to focal ischemia. *Brain Research*, 644(2), 267–272. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(94\)91689-6](https://doi.org/10.1016/0006-8993(94)91689-6)
- Carvajal, C. C. (2019). Especies Reactivas del Oxígeno: Formación, Función y Estrés Oxidativo. *Revista Medicina legal de Costa Rica*, 36, 91-100.
- Cascales, M. (2003). Bases moleculares de la apoptosis. *Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia*, 69 (1), 36-64.
- Chamorro, Á., Meisel, A., Planas, A. M., Urra, X., van de Beek, D., & Veltkamp, R. (2012). The immunology of Acute Stroke. *Nature Reviews Neurology*, 8(7), 401–410. <https://doi.org/10.1038/nrneuro.2012.98>
- Chamorro, B., Diez-Iriepa, D., Merás-Sáiz, B., Chioua, M., García-Vieira, D., Iriepa, I., Hadjipavlou-Litina, D., López-Muñoz, F., Martínez-Murillo, R., González-Nieto, D., Fernández, I., Marco-Contelles, J., & Oset-Gasque, M. J. (2020). Synthesis, antioxidant properties and neuroprotection of α -phenyl-tert-butyl nitron derived homobisnitrones in in vitro and in vivo ischemia models. *Scientific Reports*, 10(1), 14150-14167. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-70690-y>

- Chamorro, B., García-Vieira, D., Diez-Iriepa, D., Garagarza, E., Chioua, M., Hadjipavlou-Litina, D., López-Muñoz, F., Marco-Contelles, J., & Oset-Gasque, M. J. (2021). Synthesis, neuroprotection, and antioxidant activity of 1,1'-biphenylnitrones as α -phenyl-*n*-tert-butyl nitrone analogues in in vitro ischemia models. *Molecules*, 26(4), 1127-1145. <https://doi.org/10.3390/molecules26041127>
- Chamorro, B., Głowacka, I. E., Gotkowska, J., Gulej, R., Hadjipavlou-Litina, D., López-Muñoz, F., Marco-Contelles, J., Piotrowska, D. G., & Oset-Gasque, M. J. (2022). Nucleobase-derived nitrones: Synthesis and antioxidant and neuroprotective activities in an in vitro model of ischemia-reperfusion. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(6), 3411-3432. <https://doi.org/10.3390/ijms23063411>
- Chamorro, B., Izquierdo-Bermejo, S., Serrano, J., Hadjipavlou-Litina, D., Chioua, M., López-Muñoz, F., Marco-Contelles, J., Martínez-Murillo, R., & Oset-Gasque, M. J. (2023a). Neuroprotective and antioxidant properties of new quinolylnitrones in in vitro and in vivo cerebral ischemia models. *Scientific Reports*, 13(1), 2865-2879. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-29929-7>
- Chamorro, B., Izquierdo-Bermejo, S., Martín-de-Saavedra, M. D., López-Muñoz, F., Chioua, M., Marco-Contelles, J., & Oset-Gasque, M. J. (2023b). Neuroprotective and Antioxidant Properties of Cholesterone Nitronone ChN2 and Quinolylnitronone QN23 in an Experimental Model of Cerebral Ischemia: Involvement of Necrotic and Apoptotic Cell Death. *Antioxidants* 12, 1364-1382. <https://doi.org/10.3390/antiox12071364>
- Chandrasekaran, A., Idelchik, M. del, & Melendez, J. A. (2017). Redox control of senescence and age-related disease. *Redox Biology*, 11, 91-102. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2016.11.005>
- Chen, A., Lin, Z., Lan, L., Xie, G., Huang, J., Lin, J., Peng, J., Tao, J., & Chen, L. (2012). Electroacupuncture at the Quchi and zusanli acupoints exerts neuroprotective role in cerebral ischemia-reperfusion injured rats via activation of the PI3K/akt pathway. *International Journal of Molecular Medicine*, 30(4), 791-796. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2012.1074>
- Chioua, M., Sucunza, D., Soriano, E., Hadjipavlou-Litina, D., Alcázar, A., Ayuso, I., Oset-Gasque, M. J., González, M. P., Monjas, L., Rodríguez-Franco, M. I., Marco-Contelles, J., & Samadi, A. (2012). α -aryl-*n*-alkyl nitrones, as potential agents for stroke treatment: Synthesis, theoretical calculations, antioxidant, anti-inflammatory, neuroprotective, and brain-blood barrier permeability properties. *Journal of Medicinal Chemistry*, 55(1), 153-168. <https://doi.org/10.1021/jm201105a>
- Chioua, M., Pérez-Peña, J., García-Font, N., Moraleda, I., Iriepa, I., Soriano, E., Marco-Contelles, J., & Oset-Gasque, M. J. (2015). Pyranopyrazolotacrine as nonneurotoxic, AB-anti-aggregating and neuroprotective agents for Alzheimer's disease. *Future Medicinal Chemistry*, 7(7), 845-855. <https://doi.org/10.4155/fmc.15.41>
- Chioua, M.; Martínez-Alonso, E.; Gonzalo-Gobernado, R.; Ayuso, M.I.; Escobar-Peso, A.; Infantes, L.; Hadjipavlou-Litina, D.; Montoya, J.J.; Montaner, J.; Alcázar, A.; Marco-Contelles, J. (2019). New Quinolylnitrones for Stroke Therapy: Antioxidant and Neuroprotective (Z)-N-tert-Butyl-1-(2-chloro-6-methoxyquinolin-3-yl)methanimine Oxide as a New Lead-Compound for Ischemic Stroke Treatment. *Journal of Medicinal Chemistry*, 62, 2184-2201. doi: [10.1021/acs.jmedchem.8b01987](https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.8b01987)

- Chung, C.-Y., & Duchon, M. R. (2022). A plate reader-based measurement of the cellular ROS production using dihydroethidium and mitoxox. *Methods in Molecular Biology*, 333–337. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-2309-1_24
- Colak, G., Filiano, A. J., & Johnson, G. V. W. (2011). The application of permanent middle cerebral artery ligation in the mouse. *Journal of Visualized Experiments*, (53). <https://doi.org/10.3791/3039>
- Collins, R., Reith, C., Emberson, J., Armitage, J., Baigent, C., Blackwell, L., Blumenthal, R., Danesh, J., Smith, G. D., DeMets, D., Evans, S., Law, M., MacMahon, S., Martin, S., Neal, B., Poulter, N., Preiss, D., Ridker, P., Roberts, I., Rodgers, A., Sandercock, P., Schulz, K., Sever, P., Simes, J., Smeeth, L., Wald, N., Yusuf, S., & Peto, R. (2016). Interpretation of the evidence for the efficacy and safety of Statin Therapy. *The Lancet*, 388(10059), 2532–2561. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(16\)31357-5](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(16)31357-5)
- Cortese, B., Micheli, A., Picci, A., & Limbruno, U. (2009). Combined, superselective pharmacological management of large coronary thrombus burden. *Journal of Invasive Cardiology*, 21, 168–171.
- Cui, J., Zhao, S., Li, Y., Zhang, D., Wang, B., Xie, J., & Wang, J. (2021). Regulated Cell Death: Discovery, features and implications for Neurodegenerative Diseases. *Cell Communication and Signaling*, 19(1). <https://doi.org/10.1186/s12964-021-00799-8>
- Culmsee, C., & Kriegelstein, J. (2007). Ischaemic brain damage after stroke: New insights into efficient therapeutic strategies. *EMBO Reports*, 8(2), 129–133. <https://doi.org/10.1038/sj.embor.7400892>
- Culot, M., Mysiorek, C., Renftel, M., Roussel, B. D., Hommet, Y., Vivien, D., Cecchelli, R., Fenart, L., Berezowski, V., Dehouck, M.-P., & Lundquist, S. (2009). Cerebrovascular protection as a possible mechanism for the protective effects of NXY-059 in preclinical models: An in vitro study. *Brain Research*, 1294, 144–152. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2009.07.035>
- Curcio, M., Salazar, I. L., Mele, M., Canzoniero, L. M. T., & Duarte, C. B. (2016). Calpains and neuronal damage in the ischemic brain: The Swiss knife in synaptic injury. *Progress in Neurobiology*, 143, 1–35. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2016.06.00>
- Daniele, S. G., Trummer, G., Hossmann, K. A., Vrselja, Z., Benk, C., Gobeske, K. T., Damjanovic, D., Andrijevic, D., Pooth, J.-S., Dellal, D., Beyersdorf, F., & Sestan, N. (2021). Brain vulnerability and viability after ischaemia. *Nature Reviews Neuroscience*, 22(9), 553–572. <https://doi.org/10.1038/s41583-021-00488-y>
- D’Arcy, M. S. (2019). Cell death: A review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. *Cell Biology International*, 43(6), 582–592. <https://doi.org/10.1002/cbin.11137>
- Das, N., Raymick, J., & Sarkar, S. (2021). Role of metals in alzheimer’s disease. *Metabolic Brain Disease*, 36(7), 1627–1639. <https://doi.org/10.1007/s11011-021-00765-w>
- Datta, A., Sarmah, D., Mounica, L., Kaur, H., Kesharwani, R., Verma, G., Veeresh, P., Kotian, V., Kalia, K., Borah, A., Wang, X., Dave, K. R., Yavagal, D. R., & Bhattacharya, P. (2020). Cell death pathways in ischemic stroke and targeted pharmacotherapy. *Translational Stroke Research*, 11(6), 1185–1202. <https://doi.org/10.1007/s12975-020-00806-z>

- De Meyer, S. F., Denorme, F., Langhauser, F., Geuss, E., Fluri, F., & Kleinschnitz, C. (2016). Thromboinflammation in stroke brain damage. *Stroke*, 47(4), 1165–1172. <https://doi.org/10.1161/strokeaha.115.011238>
- Decker, T., & Lohmann-Matthes, M.-L. (1988). A quick and simple method for the quantitation of lactate dehydrogenase release in measurements of cellular cytotoxicity and tumor necrosis factor (TNF) activity. *Journal of Immunological Methods*, 115(1), 61–69. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(88\)90310-9](https://doi.org/10.1016/0022-1759(88)90310-9)
- Deb, P., Sharma, S., & Hassan, K. M. (2010). Pathophysiologic mechanisms of acute ischemic stroke: An overview with emphasis on therapeutic significance beyond thrombolysis. *Pathophysiology*, 17(3), 197–218. <https://doi.org/10.1016/j.pathophys.2009.12.001>
- Dice, J. F. (2007). Chaperone-mediated autophagy. *Autophagy*, 3(4), 295–299. <https://doi.org/10.4161/auto.4144>
- Diener, H.-C., Lees, K. R., Lyden, P., Grotta, J., Davalos, A., Davis, S. M., Shuaib, A., Ashwood, T., Wasiewski, W., Alderfer, V., Hårdemark Hans-Goran, & Rodichok, L. (2008). NXY-059 for the treatment of acute stroke. *Stroke*, 39(6), 1751–1758. <https://doi.org/10.1161/strokeaha.107.503334>
- Diez-Iriepa, D., Chamorro, B., Talaván, M., Chioua, M., Iriepa, I., Hadjipavlou-Litina, D., López-Muñoz, F., Marco-Contelles, J., & Oset-Gasque, M. J. (2020). Homo-tris-nitrones derived from α -phenyl-n-tert-butyl nitron: Synthesis, neuroprotection and antioxidant properties. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(21), 7949–7969. <https://doi.org/10.3390/ijms21217949>
- Ding, Y., Zhang, Y., Zhang, W., Shang, J., Xie, Z., & Chen, C. (2021). Effects of lipoic acid on ischemia-reperfusion injury. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2021, 1–15. <https://doi.org/10.1155/2021/5093216>
- Dringen, R. (2000). Metabolism and functions of glutathione in brain. *Progress in Neurobiology*, 62(6), 649–671. [https://doi.org/10.1016/s0301-0082\(99\)00060-x](https://doi.org/10.1016/s0301-0082(99)00060-x)
- Duffy, E. M., & Jorgensen, W. L. (2000). Prediction of properties from simulations: free energies of solvation in hexadecane, octanol, and water. *Journal of the American Chemical Society*, 122(12), 2878–2888. <https://doi.org/10.1021/ja993663t>
- Dugan, L. L., & Choi, D. W. (1994). Excitotoxicity, free radicals, and cell membrane changes. *Annals of Neurology*, 35(S1). <https://doi.org/10.1002/ana.410350707>
- Dutta, S., Rutkai, I., Katakam, P. V., & Busija, D. W. (2015). The mechanistic target of rapamycin (mTOR) pathway and S6 kinase mediate diazoxide preconditioning in primary rat cortical neurons. *Journal of Neurochemistry*, 134(5), 845–856. <https://doi.org/10.1111/jnc.13181>
- Eastin, T. M., Dye, J. A., Pillai, P., Lopez-Gonzalez, M. A., Huang, L., Zhang, J. H., & Boling, W. W. (2023). Delayed revascularization in acute ischemic stroke patients. *Frontiers in Pharmacology*, 14. <https://doi.org/10.3389/fphar.2023.1124263>
- Edaravone Acute Brain Infarction Study Group. (2003). Effect of a novel free radical scavenger, Edaravone (MCI-186), on acute brain infarction. *Cerebrovascular Diseases*, 15(3), 222–229. <https://doi.org/10.1159/000069318>
- Edinger, A. L., & Thompson, C. B. (2004). Death by design: Apoptosis, necrosis and autophagy. *Current Opinion in Cell Biology*, 16(6), 663–669. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2004.09.011>

- Esquivias-Pérez, M., Maalej, E., Romero, A., Chabchoub, F., Samadi, A., Marco-Contelles, J., & Oset-Gasque, M. J. (2013). Nontoxic and neuroprotective β -naphthothacridines for Alzheimer's disease. *Chemical Research in Toxicology*, 26(6), 986–992. <https://doi.org/10.1021/tx400138s>
- Estaquier, J., Vallette, F., Vayssiere, J.-L., & Mignotte, B. (2011). The mitochondrial pathways of apoptosis. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 157–183. https://doi.org/10.1007/978-94-007-2869-1_7
- Farr, S. A., Poon, H. F., Dogrukol-Ak, D., Drake, J., Banks, W. A., Eyerman, E., Butterfield, D. A., & Morley, J. E. (2003). The antioxidants α -lipoic acid and N-acetylcysteine reverse memory impairment and brain oxidative stress in aged samp8 mice. *Journal of Neurochemistry*, 84(5), 1173–1183. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2003.01580.x>
- Feigin, V. L., Brainin, M., Norrving, B., Martins, S., Sacco, R. L., Hacke, W., Fisher, M., Pandian, J., & Lindsay, P. (2022). World Stroke Organization (WSO): Global stroke fact sheet 2022. *International Journal of Stroke*, 17(1), 18–29. <https://doi.org/10.1177/17474930211065917>
- Feng, D., Wang, B., Wang, L., Abraham, N., Tao, K., Huang, L., Shi, W., Dong, Y., & Qu, Y. (2017). Pre-ischemia melatonin treatment alleviated acute neuronal injury after ischemic stroke by inhibiting endoplasmic reticulum stress-dependent autophagy via Perk and ire1 signalings. *Journal of Pineal Research*, 62(3). <https://doi.org/10.1111/jpi.12395>
- Fenton, H. J. (1894). LXXIII. — oxidation of tartaric acid in presence of iron. *J. Chem. Soc., Trans.*, 65, 899–910. <https://doi.org/10.1039/ct8946500899>
- Ferrer, I., & Planas, A. M. (2003). Signaling of cell death and cell survival following focal cerebral ischemia: Life and death struggle in the penumbra. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, 62(4), 329–339. <https://doi.org/10.1093/jnen/62.4.329>
- Festjens, N., Vanden Berghe, T., & Vandenabeele, P. (2006). Necrosis, a well-orchestrated form of cell demise: Signalling cascades, important mediators and concomitant immune response. *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1757(9-10), 1371–1387. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2006.06.014>
- Finch, C. (2010). Evolution of the human lifespan and diseases of aging: roles of infection, inflammation, and nutrition. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(suppl1):1718–1724. <https://doi.org/10.1073/pnas.0909606106>
- Floyd, R. A. (1990). Role of oxygen free radicals in carcinogenesis and brain ischemia. *The FASEB Journal*, 4(9), 2587–2597. <https://doi.org/10.1096/fasebj.4.9.2189775>
- Fourie, P., & Duncan, IC. (2003). Microsnare-assisted mechanical removal of intraprocedural distal middle cerebral arterial thromboembolism. *American Journal of Neuroradiology*, 24 (4), 630 – 632.
- Fridovich, I. (1978). The biology of Oxygen Radicals. *Science*, 201(4359), 875–880. <https://doi.org/10.1126/science.210504>
- Fuente, M., & Miquel, J. (2009). An update of the oxidation-inflammation theory of aging: The involvement of the immune system in oxi-Inflamm-Aging. *Current Pharmaceutical Design*, 15(26), 3003–3026. <https://doi.org/10.2174/138161209789058110>

- Fukai, T., & Ushio-Fukai, M. (2011). Superoxide dismutases: Role in Redox Signaling, vascular function, and diseases. *Antioxidants & Redox Signaling*, 15(6), 1583–1606. <https://doi.org/10.1089/ars.2011.3999>
- Gao, L., Dong, Q., Song, Z., Shen, F., Shi, J., & Li, Y. (2017). NLRP3 inflammasome: A promising target in ischemic stroke. *Inflammation Research*, 66(1), 17–24. <https://doi.org/10.1007/s00011-016-0981-7>
- García-Font, N., Hayour, H., Belfaitah, A., Pedraz, J., Moraleda, I., Iriepa, I., Bouraiou, A., Chioua, M., Marco-Contelles, J., & Oset-Gasque, M. J. (2016). Potent anticholinesterasic and neuroprotective pyranotacrines as inhibitors of beta-amyloid aggregation, oxidative stress and tau-phosphorylation for Alzheimer's disease. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 118, 178–192. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2016.04.023>
- Garg, G., Singh, S., Singh, A. K., & Rizvi, S. I. (2018). N-acetyl-l-cysteine attenuates oxidative damage and neurodegeneration in rat brain during aging. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 96(12), 1189–1196. <https://doi.org/10.1139/cjpp-2018-0209>
- Gilman, S., Koller, M., Black, R. S., Jenkins, L., Griffith, S. G., Fox, N. C., Eisner, L., Kirby, L., Rovira, M. B., Forette, F., & Orgogozo, J.-M. (2005). Clinical effects of a immunization (AN1792) in patients with AD in an interrupted trial. *Neurology*, 64(9), 1553–1562. <https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000159740.16984.3c>
- Ginet, V., Spiehlmann, A., Rummel, C., Rudinskiy, N., Grishchuk, Y., Luthi-Carter, R., Clarke, P. G. H., Truttmann, A. C., & Puyal, J. (2014). Involvement of autophagy in hypoxic-excitotoxic neuronal death. *Autophagy*, 10(5), 846–860. <https://doi.org/10.4161/auto.28264>
- Glick, D., Barth, S., & Macleod, K. F. (2010). Autophagy: Cellular and Molecular Mechanisms. *The Journal of Pathology*, 221(1), 3–12. <https://doi.org/10.1002/path.2697>
- Golstein, P., & Kroemer, G. (2007). Cell death by necrosis: Towards a molecular definition. *Trends in Biochemical Sciences*, 32(1), 37–43. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2006.11.001>
- Gotkowska, J., Balzarini, J., & Piotrowska, D. G. (2012). Synthesis of novel isoxazolidine analogues of homonucleosides. *Tetrahedron Letters*, 53(52), 7097–7100. <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2012.10.074>
- Gottlieb, R. A. (2011). Cell death pathways in acute ischemia/reperfusion injury. *Journal of Cardiovascular Pharmacology and Therapeutics*, 16(3-4), 233–238. <https://doi.org/10.1177/1074248411409581>
- Green, D. R., & Llambi, F. (2015). Cell death signaling. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 7(12). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a006080>
- Greenberg, S. M., Bacskai, B. J., Hernandez-Guillamon, M., Pruzin, J., Sperling, R., & van Veluw, S. J. (2019). Cerebral amyloid angiopathy and Alzheimer disease — one peptide, two pathways. *Nature Reviews Neurology*, 16(1), 30–42. <https://doi.org/10.1038/s41582-019-0281-2>
- Greenberg, S. M., Gurol, M. E., Rosand, J., & Smith, E. E. (2004). Amyloid angiopathy-related vascular cognitive impairment. *Stroke*, 35(11_suppl_1), 2616–2619. <https://doi.org/10.1161/01.str.0000143224.36527.44>

- Greene, V. W. (2001). Personal hygiene and life expectancy improvements since 1850: Historic and Epidemiologic Associations. *American Journal of Infection Control*, 29(4), 203–206. <https://doi.org/10.1067/mic.2001.115686>
- Greene, B. L., Kang, G., Cui, C., Bennati, M., Nocera, D. G., Drennan, C. L., & Stubbe, J. (2020). Ribonucleotide reductases: Structure, chemistry, and metabolism suggest new therapeutic targets. *Annual Review of Biochemistry*, 89(1), 45–75. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-013118-111843>
- Grosse, G., Schulz-Schaeffer, W., Teebken, O., Schuppner, R., Dirks, M., Worthmann, H., Lichtinghagen, R., Maye, G., Limbourg, F., & Weissenborn, K. (2016). Monocyte subsets and related chemokines in carotid artery stenosis and ischemic stroke. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(4), 433. <https://doi.org/10.3390/ijms17040433>
- Gupta, R., Luxami, V., & Paul, K. (2021). Insights of 8-hydroxyquinolines: A novel target in medicinal chemistry. *Bioorganic Chemistry*, 108, 104633. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2021.104633>
- Gürer, G., Gursoy-Ozdemir, Y., Erdemli, E., Can, A., & Dalkara, T. (2009). Astrocytes are more resistant to focal cerebral ischemia than neurons and die by a delayed necrosis. *Brain Pathology*, 19(4), 630–641. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3639.2008.00226.x>
- Gusev, E. I., Skvortsova, V. I., Suslina, Z. A., Avakian, G. N., Iu Martynov, M., Temirbaeva, S. L., Tanashian, M. A., Kamchtnov, P. R., Stakhovskaia, L. V., & Efremova, N. M. (2006). Batroxobin in patients with ischemic stroke in the carotid system (the multicenter study). *Zhurnal nevrologii i psikiatrii imeni S.S. Korsakova*, 106, 31–34.
- Haber, F., & Weiss, J. (1932). Über Die Katalyse des Hydroperoxydes. *Die Naturwissenschaften*, 20(51), 948–950. <https://doi.org/10.1007/bf01504715>
- Hacke, W., Albers, G., Al-Rawi, Y., Bogousslavsky, J., Davalos, A., Eliasziw, M., Fischer, M., Furlan, A., Kaste, M., Lees, K. R., Soehngen, M., & Warach, S. (2005). The desmoteplase in acute ischemic stroke trial (dias). *Stroke*, 36(1), 66–73. <https://doi.org/10.1161/01.str.0000149938.08731.2c>
- Hardie, D. G. (2011). AMP-activated protein kinase—an energy sensor that regulates all aspects of cell function. *Genes & Development*, 25(18), 1895–1908. <https://doi.org/10.1101/gad.17420111>
- Harman, D. (1956). Aging: A theory based on free radical and radiation chemistry. *Journal of Gerontology*, 11(3), 298–300. <https://doi.org/10.1093/geronj/11.3.298>
- Harrison, F. E., & May, J. M. (2009). Vitamin C function in the brain: Vital role of the ascorbate transporter SVCT2. *Free Radical Biology and Medicine*, 46(6), 719–730. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2008.12.018>
- Hart, R. G., Pearce, L. A., & Aguilar, M. I. (2007). Meta-analysis: Antithrombotic therapy to prevent stroke in patients who have nonvalvular atrial fibrillation. *Annals of Internal Medicine*, 146(12), 857. <https://doi.org/10.7326/0003-4819-146-12-200706190-00007>
- Hartmann, J., Kiewert, C., Duysen, E. G., Lockridge, O., Greig, N. H., & Klein, J. (2007). Excessive hippocampal acetylcholine levels in acetylcholinesterase-deficient mice are moderated by butyrylcholinesterase activity. *Journal of Neurochemistry*, 100(5), 1421–1429. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2006.04347.x>

- Hasselblatt, M., Jeibmann, A., Riesmeier, B., Maintz, D., & Schäbitz, W.-R. (2006). Granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF) and G-CSF receptor expression in human ischemic stroke. *Acta Neuropathologica*, 113(1), 45–51. <https://doi.org/10.1007/s00401-006-0152-y>
- He, C., & Klionsky, D. J. (2009). Regulation mechanisms and signaling pathways of autophagy. *Annual Review of Genetics*, 43(1), 67–93. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-102808-114910>
- He, Q., Shi, X., Zhou, B., Teng, J., Zhang, C., Liu, S., Lian, J., Luo, B., Zhao, G., Lu, H., Xu, Y., Lian, Y., Jia, Y., & Zhang, Y. (2018). Interleukin 8 (CXCL8)-CXC chemokine receptor 2 (CXCR2) axis contributes to Mir-4437-associated recruitment of granulocytes and natural killer cells in ischemic stroke. *Molecular Immunology*, 101, 440–449. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2018.08.002>
- Heiss, W.-D. (2015). Malignant MCA infarction: Pathophysiology and imaging for early diagnosis and management decisions. *Cerebrovascular Diseases*, 41(1-2), 1–7. <https://doi.org/10.1159/000441627>
- Hernández-Jiménez, M., Abad-Santos, F., Cotgreave, I., Gallego, J., Jilma, B., Flores, A., Jovin, T. G., Vivancos, J., Hernández-Pérez, M., Molina, C. A., Montaner, J., Casariego, J., Dalsgaard, M., Liebeskind, D. S., Cobo, E., Castellanos, M., Portela, P. C., Masjuán, J., Moniche, F., Tembl, J. I., Terceño, M., Arenillas, J. F., Callejas, P., Olivot, J. M., Calviere, L., Henon, H., Mazighi, M., Piñeiro, D., Pugliese, M., González, V. M., Moro, M. A., García-Tornel, A., Lizasoain, I., & Ribo, M. (2023). Safety and efficacy of aptoll in patients with ischemic stroke undergoing endovascular treatment. *JAMA Neurology*, 80(8), 779. <https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2023.1660>
- Hirtz, D., Thurman, D. J., Gwinn-Hardy, K., Mohamed, M., Chaudhuri, A. R., & Zalutsky, R. (2007). How common are the "common" neurologic disorders? *Neurology*, 68(5), 326–337. <https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000252807.38124.a3>
- Hossmann, K.-A. (1994). Viability thresholds and the penumbra of focal ischemia. *Annals of Neurology*, 36(4), 557–565. <https://doi.org/10.1002/ana.410360404>
- Hou, Y., Dan, X., Babbar, M., Wei, Y., Hasselbalch, S. G., Croteau, D. L., & Bohr, V. A. (2019). Ageing as a risk factor for neurodegenerative disease. *Nature Reviews Neurology*, 15(10), 565–581. <https://doi.org/10.1038/s41582-019-0244-7>
- Høyer-Hansen, M., & Jäättelä, M. (2007). Connecting endoplasmic reticulum stress to autophagy by unfolded protein response and calcium. *Cell Death & Differentiation*, 14(9), 1576–1582. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4402200>
- Huang, H., Al-Shabrawey, M., & Wang, M.-H. (2016). Cyclooxygenase- and cytochrome P450-derived eicosanoids in stroke. *Prostaglandins & Other Lipid Mediators*, 122, 45–53. <https://doi.org/10.1016/j.prostaglandins.2015.12.007>
- Hwang, J.-Y., Gertner, M., Pontarelli, F., Court-Vazquez, B., Bennett, M. V., Ofengeim, D., & Zukin, R. S. (2016). Global ischemia induces lysosomal-mediated degradation of mtor and activation of autophagy in hippocampal neurons destined to die. *Cell Death & Differentiation*, 24(2), 317–329. <https://doi.org/10.1038/cdd.2016.140>
- Iancu, A., Buleu, F., Chita, D. S., Tutelca, A., Tudor, R., & Brad, S. (2023). Early hemorrhagic transformation after reperfusion therapy in patients with acute ischemic stroke: Analysis of risk factors and predictors. *Brain Sciences*, 13(5), 840. <https://doi.org/10.3390/brainsci13050840>

- Janzen, E. G., & Blackburn, B. J. (1968). Detection and identification of short-lived free radicals by an electron spin resonance trapping technique. *Journal of the American Chemical Society*, 90(21), 5909–5910. <https://doi.org/10.1021/ja01023a051>
- Jha, R. M., Raikwar, S. P., Mihaljevic, S., Casabella, A. M., Catapano, J. S., Rani, A., Desai, S., Gerzanich, V., & Simard, J. M. (2021). Emerging therapeutic targets for cerebral edema. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 25(11), 917–938. <https://doi.org/10.1080/14728222.2021.2010045>
- Jiang, X., Andjelkovic, A. V., Zhu, L., Yang, T., Bennett, M. V. L., Chen, J., Keep, R. F., & Shi, Y. (2018). Blood-brain barrier dysfunction and recovery after ischemic stroke. *Progress in Neurobiology*, 163-164, 144–171. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2017.10.001>
- Jiménez-Almarza, A., Diez-Iriepa, D., Chioua, M., Chamorro, B., Iriepa, I., Martínez-Murillo, R., Hadjipavlou-Litina, D., Oset-Gasque, M. J., & Marco-Contelles, J. (2019). Synthesis, neuroprotective and antioxidant capacity of PBN-related indanonitrones. *Bioorganic Chemistry*, 86, 445–451. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2019.01.071>
- Jin, Y. P., Di Legge, S., Ostbye, T., Feightner, J. W., & Hachinski, V. (2006). The reciprocal risks of stroke and cognitive impairment in an elderly population. *Alzheimer's & Dementia*, 2(3), 171–178. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2006.03.006>
- Jones, T. H., Morawetz, R. B., Crowell, R. M., Marcoux, F. W., FitzGibbon, S. J., DeGirolami, U., & Ojemann, R. G. (1981). Thresholds of focal cerebral ischemia in awake monkeys. *Journal of Neurosurgery*, 54(6), 773–782. <https://doi.org/10.3171/jns.1981.54.6.0773>
- Jorgensen, W. L., & Duffy, E. M. (2000). Prediction of drug solubility from Monte Carlo simulations. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 10(11), 1155–1158. [https://doi.org/10.1016/s0960-894x\(00\)00172-4](https://doi.org/10.1016/s0960-894x(00)00172-4)
- Kato, N., Yanaka, K., Nagase, S., Hirayama, A., & Nose, T. (2003). The antioxidant EPC-K1 ameliorates brain injury by inhibiting lipid peroxidation in a rat model of transient focal cerebral ischaemia. *Acta Neurochirurgica*, 145(6), 489–493. <https://doi.org/10.1007/s00701-003-0036-z>
- Kaur, J., & Debnath, J. (2015). Autophagy at the crossroads of catabolism and anabolism. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 16(8), 461–472. <https://doi.org/10.1038/nrm4024>
- Khan, M., Sekhon, B., Jatana, M., Giri, S., Gilg, A. G., Sekhon, C., Singh, I., & Singh, A. K. (2004). Administration of N-acetylcysteine after focal cerebral ischemia protects brain and reduces inflammation in a rat model of experimental stroke. *Journal of Neuroscience Research*, 76(4), 519–527. <https://doi.org/10.1002/jnr.20087>
- Kim, B. (2017). Western blot techniques. *Methods in Molecular Biology*, 133–139. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6990-6_9
- Kim, H., & Xue, X. (2020). Detection of total reactive oxygen species in adherent cells by 2',7'-Dichlorodihydrofluorescein diacetate staining. *Journal of Visualized Experiments*, (160). <https://doi.org/10.3791/60682>
- Kirkwood, T. B. (1977). Evolution of ageing. *Nature*, 270(5635), 301–304. <https://doi.org/10.1038/270301a0>
- Kirkwood, T. B. (2017). Why and how are we living longer? *Experimental Physiology*, 102(9), 1067–1074. <https://doi.org/10.1113/ep086205>

- Kist, M., & Vucic, D. (2021). Cell death pathways: Intricate connections and disease implications. *The EMBO Journal*, 40(5). <https://doi.org/10.15252/embj.2020106700>
- Kivipelto, M., Ngandu, T., Fratiglioni, L., Viitanen, M., Kåreholt, I., Winblad, B., Helkala, E.-L., Tuomilehto, J., Soininen, H., & Nissinen, A. (2005). Obesity and Vascular Risk Factors at midlife and the risk of dementia and Alzheimer's disease. *Archives of Neurology*, 62(10). <https://doi.org/10.1001/archneur.62.10.1556>
- Klinkenberg, I., & Blokland, A. (2010). The validity of scopolamine as a pharmacological model for cognitive impairment: A Review of Animal Behavioral Studies. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 34(8), 1307–1350. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2010.04.001>
- Knez, D., Diez-Iriepa, D., Chioua, M., Gottinger, A., Denic, M., Chantegreil, F., Nachon, F., Brazzolotto, X., Skrzypczak-Wiercioch, A., Meden, A., Pišlar, A., Kos, J., Žakelj, S., Stojan, J., Sałat, K., Serrano, J., Fernández, A. P., Sánchez-García, A., Martínez-Murillo, R., Binda, C., López-Muñoz, F., Gobec, S., Marco-Contelles, J. (2023). 8-hydroxyquinolyl nitrones as multifunctional ligands for the therapy of Neurodegenerative diseases. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 13(5), 2152–2175. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2023.01.013>
- Koike, M., Shibata, M., Tadakoshi, M., Gotoh, K., Komatsu, M., Waguri, S., Kawahara, N., Kuida, K., Nagata, S., Kominami, E., Tanaka, K., & Uchiyama, Y. (2008). Inhibition of autophagy prevents hippocampal pyramidal neuron death after hypoxic-ischemic injury. *The American Journal of Pathology*, 172(2), 454–469. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2008.070876>
- Kroemer, G., & Reed, J. C. (2000). Mitochondrial control of cell death. *Nature Medicine*, 6(5), 513–519. <https://doi.org/10.1038/74994>
- Kroemer, G., Galluzzi, L., Vandenabeele, P., Abrams, J., Alnemri, E. S., Baehrecke, E. H., Blagosklonny, M. V., El-Deiry, W. S., Golstein, P., Green, D. R., Hengartner, M., Knight, R. A., Kumar, S., Lipton, S. A., Malorni, W., Nuñez, G., Peter, M. E., Tschopp, J., Yuan, J., Piacentini, Zhicotovsky, B., & Melino, G. (2008). Classification of Cell Death: Recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death & Differentiation*, 16(1), 3–11. <https://doi.org/10.1038/cdd.2008.150>
- Krysko, D. V., Vanden Berghe, T., D'Herde, K., & Vandenabeele, P. (2008). Apoptosis and necrosis: Detection, discrimination and phagocytosis. *Methods*, 44(3), 205–221. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2007.12.001>
- Kunz, A., Dimagl, U., & Mergenthaler, P. (2010). Acute pathophysiological processes after ischaemic and traumatic brain injury. *Best Practice & Research Clinical Anaesthesiology*, 24(4), 495–509. <https://doi.org/10.1016/j.bpa.2010.10.001>
- Kurisu, K., & Yenari, M. A. (2018). Therapeutic hypothermia for ischemic stroke; pathophysiology and future promise. *Neuropharmacology*, 134, 302–309. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2017.08.025>
- Kuroda, S., Tsuchidate, R., Smith, M.-L., Maples, K. R., & Siesjö, B. K. (1999). Neuroprotective effects of a novel Nitrone, NXY-059, after transient focal cerebral ischemia in the rat. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 19(7), 778–787. <https://doi.org/10.1097/00004647-199907000-00008>
- Kwon, H. S., & Koh, S.-H. (2020). Neuroinflammation in neurodegenerative disorders: The roles of microglia and astrocytes. *Translational Neurodegeneration*, 9(1). <https://doi.org/10.1186/s40035-020-00221-2>

- Kyriazis, M. (2019). Ageing throughout history: The evolution of human lifespan. *Journal of Molecular Evolution*, 88(1), 57–65. <https://doi.org/10.1007/s00239-019-09896-2>
- Lan, D., Song, S., Liu, Y., Jiao, B., & Meng, R. (2021). Use of batroxobin in central and peripheral ischemic vascular diseases: A systematic review. *Frontiers in Neurology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fneur.2021.716778>
- Lapchak, P. A. (2010). A critical assessment of Edaravone acute ischemic stroke efficacy trials: Is Edaravone an effective neuroprotective therapy? *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, 11(10), 1753–1763. <https://doi.org/10.1517/14656566.2010.493558>
- Lee, B. J., Egi, Y., van Leyen, K., Lo, E. H., & Arai, K. (2010). Edaravone, a free radical scavenger, protects components of the neurovascular unit against oxidative stress in vitro. *Brain Research*, 1307, 22–27. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2009.10.026>
- Lees, K. R., Bluhmki, E., von Kummer, R., Brott, T. G., Toni, D., Grotta, J. C., Albers, G. W., Kaste, M., Marler, J. R., Hamilton, S. A., Tilley, B. C., Davis, S. M., Donnan, G. A., & Hacke, W. (2010). Time to treatment with intravenous alteplase and outcome in stroke: An updated pooled analysis of ECASS, ATLANTIS, NINDS, and EPITHET trials. *The Lancet*, 375(9727), 1695–1703. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(10\)60491-6](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(10)60491-6)
- Ley, J. J., Belayev, L., Saul, I., Becker, D. A., & Ginsberg, M. D. (2007). Neuroprotective effect of Stazn, a novel azulenyl nitron antioxidant, in focal cerebral ischemia in rats: Dose–response and therapeutic window. *Brain Research*, 1180, 101–110. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2007.05.028>
- Li, X., Fang, P., Mai, J., Choi, E. T., Wang, H., & Yang, X.-feng. (2013). Targeting mitochondrial reactive oxygen species as novel therapy for inflammatory diseases and cancers. *Journal of Hematology & Oncology*, 6(1). <https://doi.org/10.1186/1756-8722-6-19>
- Li, P. A., He, Q. P., Nakamura, L., & Csiszar, K. (2001). Free radical spin trap α -phenyl-n-tert-butyl-nitron inhibits caspase-3 activation and reduces brain damage following a severe forebrain ischemic injury. *Free Radical Biology and Medicine*, 31(10), 1191–1197. [https://doi.org/10.1016/s0891-5849\(01\)00700-6](https://doi.org/10.1016/s0891-5849(01)00700-6)
- Li, P., Hu, X., Gan, Y., Gao, Y., Liang, W., & Chen, J. (2011). Mechanistic insight into DNA damage and repair in ischemic stroke: Exploiting the base excision repair pathway as a model of neuroprotection. *Antioxidants & Redox Signaling*, 14(10), 1905–1918. <https://doi.org/10.1089/ars.2010.3451>
- Li, W.-wen, Li, J., & Bao, J.-ku. (2012). Microautophagy: Lesser-known self-eating. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 69(7), 1125–1136. <https://doi.org/10.1007/s00018-011-0865-5>
- Li, G.-zheng, Tao, H.-L., Zhou, C., Wang, D.-dong, & Peng, C.-bin. (2017). Midazolam prevents motor neuronal death from oxidative stress attack mediated by JNK-Erk pathway. *Human Cell*, 31(1), 64–71. <https://doi.org/10.1007/s13577-017-0184-8>
- Li, Y., Wang, Y., Kim, E., Beemiller, P., Wang, C.-Y., Swanson, J., You, M., & Guan, K.-L. (2007). BNIP3 mediates the hypoxia-induced inhibition on mammalian target of rapamycin by interacting with Rheb. *Journal of Biological Chemistry*, 282(49), 35803–35813. <https://doi.org/10.1074/jbc.m705231200>

- Li, W., & Yang, S. (2016). Targeting oxidative stress for the treatment of ischemic stroke: Upstream and downstream therapeutic strategies. *Brain Circulation*, 2(4), 153. <https://doi.org/10.4103/2394-8108.195279>
- Li, J., Zhang, K., Zhang, Q., Zhou, X., Wen, L., Ma, J., Niu, L., & Li, C. (2020). PPAR- γ mediates ta-vns-induced angiogenesis and subsequent functional recovery after experimental stroke in rats. *BioMed Research International*, 2020, 1–12. <https://doi.org/10.1155/2020/8163789>
- Liang, J., Shao, S. H., Xu, Z.-X., Hennessy, B., Ding, Z., Larrea, M., Kondo, S., Dumont, D. J., Gutterman, J. U., Walker, C. L., Slingerland, J. M., & Mills, G. B. (2007). The energy sensing LKB1–AMPK pathway regulates p27kip1 phosphorylation mediating the decision to enter autophagy or apoptosis. *Nature Cell Biology*, 9(2), 218–224. <https://doi.org/10.1038/ncb1537>
- Liu, J., Guo, Z.-N., Yan, X.-L., Huang, S., Ren, J.-X., Luo, Y., & Yang, Y. (2020). Crosstalk between autophagy and ferroptosis and its putative role in ischemic stroke. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 14. <https://doi.org/10.3389/fncel.2020.577403>
- Liguori, I., Russo, G., Curcio, F., Bulli, G., Aran, L., Della-Morte, D., Gargiulo, G., Testa, G., Cacciatore, F., Bonaduce, D., & Abete, P. (2018). Oxidative stress, aging, and diseases. *Clinical Interventions in Aging*, Volume 13, 757–772. <https://doi.org/10.2147/cia.s158513>
- Lin, F., Zhu, Y.-T., & Qin, Z.-H. (2021). Biomarkers of autophagy. *Autophagy: Biology and Diseases*, 265–287. https://doi.org/10.1007/978-981-16-2830-6_12
- Liou, L., Joe, W., Kumar, A., & Subramanian, S. V. (2020). Inequalities in life expectancy: An analysis of 201 countries, 1950–2015. *Social Science & Medicine*, 253, 112964. <https://doi.org/10.1016/j.socscimed.2020.112964>
- Lipinski, C. A., Lombardo, F., Dominy, B. W., & Feeney, P. J. (2012). Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 64, 4–17. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2012.09.019>
- Lovelock, C. E., Redgrave, J. N., Briley, D., & Rothwell, P. M. (2009). Reliable estimation of the proportion of minor stroke due to intracerebral haemorrhage. *International Journal of Stroke*, 4(1), 6–10. <https://doi.org/10.1111/j.1747-4949.2009.00238.x>
- Luna-Ortiz, P., Flores-Chávez, P. L., Guarner-Lans, V., Machado-Díaz, A. M., Olivares-Sanromán, M. E., Martínez-Rosas, M. (2015). La memoria metabólica y las complicaciones cardiovasculares en el paciente diabético. *Revista Mexicana de Anestesiología*, 38(4), 249-263.
- Ma, Y., Wang, J., Wang, Y., & Yang, G.-Y. (2017). The biphasic function of microglia in ischemic stroke. *Progress in Neurobiology*, 157, 247–272. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2016.01.005>
- Mackenbach, J. P. (2012). Convergence and divergence of life expectancy in Europe: A centennial view. *European Journal of Epidemiology*, 28(3), 229–240. <https://doi.org/10.1007/s10654-012-9747-x>
- Maida, C. D., Norrito, R. L., Daidone, M., Tuttolomondo, A., & Pinto, A. (2020). Neuroinflammatory mechanisms in ischemic stroke: Focus on cardioembolic stroke, background, and therapeutic approaches. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(18), 6454. <https://doi.org/10.3390/ijms21186454>

- Manczak, M., Mao, P., Calkins, M. J., Cornea, A., Reddy, A. P., Murphy, M. P., Szeto, H. H., Park, B., & Reddy, P. H. (2010). Mitochondria-targeted antioxidants protect against amyloid- β toxicity in Alzheimer's disease neurons. *Journal of Alzheimer's Disease*, 20(s2). <https://doi.org/10.3233/jad-2010-100564>
- Martínez-Alonso, E., Escobar-Peso, A., Aliena-Valero, A., Torregrosa, G., Chioua, M., Fernández-Serra, R., González-Nieto, D., Ouahid, Y., Salom, J. B., Masjuan, J., Marco-Contelles, J., & Alcázar, A. (2022). Preclinical characterization of antioxidant quinolyl Nitron QN23 as a new candidate for the treatment of ischemic stroke. *Antioxidants*, 11(6), 1186. <https://doi.org/10.3390/antiox11061186>
- Martínez-Alonso, E., Escobar-Peso, A., Ayuso, M. I., Gonzalo-Gobernado, R., Chioua, M., Montoya, J. J., Montaner, J., Fernández, I., Marco-Contelles, J., & Alcázar, A. (2020). Characterization of a cholesteronitron (ISQ-201), a novel drug candidate for the treatment of ischemic stroke. *Antioxidants*, 9(4), 291. <https://doi.org/10.3390/antiox9040291>
- McCullough, L. D., Tarabishy, S., Liu, L., Benashski, S., Xu, Y., Ribar, T., Means, A., & Li, J. (2013). Inhibition of calcium/calmodulin-dependent protein kinase kinase β and calcium/calmodulin-dependent protein kinase IV is detrimental in cerebral ischemia. *Stroke*, 44(9), 2559–2566. <https://doi.org/10.1161/strokeaha.113.001030>
- McKhann, G. M., Knopman, D. S., Chertkow, H., Hyman, B. T., Jack, C. R., Kawas, C. H., Klunk, W. E., Koroshetz, W. J., Manly, J. J., Mayeux, R., Mohs, R. C., Morris, J. C., Rossor, M. N., Scheltens, P., Carrillo, M. C., Thies, B., Weintraub, S., & Phelps, C. H. (2011). The diagnosis of dementia due to Alzheimer's disease: Recommendations from the National Institute on aging-Alzheimer's association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimer's & Dementia*, 7(3), 263–269. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2011.03.005>
- McKnight, N. C., & Yue, Z. (2013). Beclin 1, an essential component and master regulator of PI3K-III in health and disease. *Current Pathobiology Reports*, 1(4), 231–238. <https://doi.org/10.1007/s40139-013-0028-5>
- Medawar, P. B. (1952). *An unsolved problem of Biology*. Published for the College by H.K. Lewis.
- Menon, S., Dibble, C. C., Talbott, G., Hoxhaj, G., Valvezan, A. J., Takahashi, H., Cantley, L. C., & Manning, B. D. (2014). Spatial control of the TSC complex integrates insulin and nutrient regulation of mtorc1 at the lysosome. *Cell*, 156(4), 771–785. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.11.049>
- Mercer, A. (2021). Protection against severe infectious disease in the past. *Pathogens and Global Health*, 115(3), 151–167. <https://doi.org/10.1080/20477724.2021.1878443>
- Milgram, N. W., Head, E., Zicker, S. C., Ikeda-Douglas, C. J., Murphey, H., Muggenburg, B., Siwak, C., Tapp, D., & Cotman, C. W. (2005). Learning ability in aged Beagle Dogs is preserved by behavioral enrichment and dietary fortification: A two-year longitudinal study. *Neurobiology of Aging*, 26(1), 77–90. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2004.02.014>
- Minuz, P. (2008). Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and cardiovascular risk. *Journal of the American College of Cardiology*, 52(20), 1637–1639. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2008.08.042>
- Mishima, K., Tanaka, T., Pu, F., Egashira, N., Iwasaki, K., Hidaka, R., Matsunaga, K., Takata, J., Karube, Y., & Fujiwara, M. (2003). Vitamin E isoforms α -tocotrienol

- and γ -tocopherol prevent cerebral infarction in mice. *Neuroscience Letters*, 337(1), 56–60. [https://doi.org/10.1016/s0304-3940\(02\)01293-4](https://doi.org/10.1016/s0304-3940(02)01293-4)
- Mishra, M., & Hedna, V.S. (2013). Neuroinflammation after acute ischemic stroke: A volcano hard to contain. *Chinese Journal of Contemporary Neurology and Neurosurgery*, 13, 964-970.
 - Miyaji, Y., Yoshimura, S., Sakai, N., Yamagami, H., Egashira, Y., Shirakawa, M., Uchida, K., Kageyama, H., & Tomogane, Y. (2015). Effect of edaravone on favorable outcome in patients with acute cerebral large vessel occlusion: Subanalysis of Rescue-Japan Registry. *Neurologia Medico-Chirurgica*, 55(3), 241–247. <https://doi.org/10.2176/nmc.ra.2014-0219>
 - Mizushima, N., Levine, B., Cuervo, A. M., & Klionsky, D. J. (2008). Autophagy fights disease through cellular self-digestion. *Nature*, 451(7182), 1069–1075. <https://doi.org/10.1038/nature06639>
 - Molina, C. A., & Saver, J. L. (2005). Extending reperfusion therapy for acute ischemic stroke. *Stroke*, 36(10), 2311–2320. <https://doi.org/10.1161/01.str.0000182100.65262.46>
 - Mons, U., Muezzinler, A., Gellert, C., Schottker, B., Abnet, C. C., Bobak, M., de Groot, L., Freedman, N. D., Jansen, E., Kee, F., Kromhout, D., Kuulasmaa, K., Laatikainen, T., O'Doherty, M. G., Bueno-de-Mesquita, B., Orfanos, P., Peters, A., van der Schouw, Y. T., Wilsgaard, T., Wolk, A., Trichopoulou, A., Boffetta, P., & Brenner, H., for the CHANCES Consortium. (2015). Impact of smoking and smoking cessation on cardiovascular events and mortality among older adults: meta-analysis of individual participant data from prospective cohort studies of the CHANCES consortium. *BMJ*, 350: h1551. <https://doi.org/10.1136/bmj.h1551>
 - Morales, J., Li, L., Fattah, F. J., Dong, Y., Bey, E. A., Patel, M., Gao, J., & Boothman, D. A. (2014). Review of poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) mechanisms of action and rationale for targeting in cancer and other diseases. *Critical Reviews in Eukaryotic Gene Expression*, 24(1), 15–28. <https://doi.org/10.1615/critreueukaryotgeneexpr.2013006875>
 - Moro, M., Almeida, A., Bolanos, J., & Lizasoain, I. (2005). Mitochondrial respiratory chain and free radical generation in stroke. *Free Radical Biology and Medicine*, 39(10), 1291–1304. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2005.07.010>
 - Muhammad, I. F., Borné, Y., Melander, O., Orho-Melander, M., Nilsson, J., Söderholm, M., & Engström, G. (2018). Fadd (FAS-associated protein with death domain), caspase-3, and caspase-8 and incidence of ischemic stroke. *Stroke*, 49(9), 2224–2226. <https://doi.org/10.1161/strokeaha.118.022063>
 - Murakami, K., Kondo, T., Kawase, M., Li, Y., Sato, S., Chen, S. F., & Chan, P. H. (1998). Mitochondrial susceptibility to oxidative stress exacerbates cerebral infarction that follows permanent focal cerebral ischemia in mutant mice with manganese superoxide dismutase deficiency. *The Journal of Neuroscience*, 18 (1), 205-2013. [10.1523/JNEUROSCI.18-01-00205.1998](https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.18-01-00205.1998)
 - Nakase, T., Yoshioka, S., & Suzuki, A. (2011). Free radical scavenger, Edaravone, reduces the lesion size of lacunar infarction in human brain ischemic stroke. *BMC Neurology*, 11(1). <https://doi.org/10.1186/1471-2377-11-39>
 - Ndoye, A., & Weeraratna, A. T. (2016). Autophagy- an emerging target for melanoma therapy. *F1000Research*, 5, 1888. <https://doi.org/10.12688/f1000research.8347.1>

- Nishino, T., Okamoto, K., Eger, B. T., Pai, E. F., & Nishino, T. (2008). Mammalian xanthine oxidoreductase - mechanism of transition from xanthine dehydrogenase to xanthine oxidase. *FEBS Journal*, 275(13), 3278–3289. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2008.06489.x>
- Nixon, R. A., & Yang, D.-S. (2011). Autophagy failure in alzheimer's disease—locating the primary defect. *Neurobiology of Disease*, 43(1), 38–45. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2011.01.021>
- Nogueira, R. G., Levy, E. I., Gounis, M., & Siddiqui, A. H. (2012). The TREVO device: Preclinical data of a novel stroke thrombectomy device in two different animal models of arterial thrombo-occlusive disease. *Journal of NeuroInterventional Surgery*, 4(4), 295–300. <https://doi.org/10.1136/neurintsurg-2011-010053>
- O'Donnell, M. J., Chin, S. L., Rangarajan, S., Xavier, D., Liu, L., Zhang, H., Rao-Melacini, P., Zhang, X., Pais, P., Agapay, S., Lopez-Jaramillo, P., Damasceno, A., Langhorne, P., McQueen, M. J., Rosengren, A., Dehghan, M., Hankey, G. J., Dans, A. L., Elsayed, A., Avezum, A., Mondo, C., Diener, H.-C., Ryglewicz, D., Czlonkowska, A., Pogosova, N., Weimar, C., Iqbal, R., Diaz, R., Yusuf, K., Yusufali, A., Oguz, A., Wang, X., Penaherrera, E., Lanans, F., Ogah, O. S., Ogunniyi, A., Iversen, H. K., Malaga, G., Rumboldt, Z., Oveisgharan, S., Al Hussain, F., Magazi, D., Nilanont, Y., Ferguson, J., Pare, G., & Yusuf, S. (2016). Global and regional effects of potentially modifiable risk factors associated with acute stroke in 32 countries (INTERSTROKE): A case-control study. *The Lancet*, 388(10046), 761–775. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(16\)30506-2](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(16)30506-2)
- O'Collins, V. E., Macleod, M. R., Donnan, G. A., Horkey, L. L., van der Worp, B. H., & Howells, D. W. (2006). 1,026 experimental treatments in acute stroke. *Annals of Neurology*, 59(3), 467–477. <https://doi.org/10.1002/ana.20741>
- Oliver, C. N., Starke-Reed, P. E., Stadtman, E. R., Liu, G. J., Carney, J. M., & Floyd, R. A. (1990). Oxidative damage to brain proteins, loss of glutamine synthetase activity, and production of free radicals during ischemia/reperfusion-induced injury to gerbil brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 87(13), 5144–5147. <https://doi.org/10.1073/pnas.87.13.5144>
- Ono, T., Tsuruta, R., Fujita, M., Aki, H. S., Kutsuna, S., Kawamura, Y., Wakatsuki, J., Aoki, T., Kobayashi, C., Kasaoka, S., Maruyama, I., Yuasa, M., & Maekawa, T. (2009). Xanthine oxidase is one of the major sources of superoxide anion radicals in blood after reperfusion in rats with forebrain ischemia/reperfusion. *Brain Research*, 1305, 158–167. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2009.09.061>
- Orellana-Urzúa, S., Rojas, I., Líbano, L., & Rodrigo, R. (2020). Pathophysiology of ischemic stroke: Role of oxidative stress. *Current Pharmaceutical Design*, 26(34), 4246–4260. <https://doi.org/10.2174/1381612826666200708133912>
- Oset-Gasque, M. J., González, M. P., Pérez-Peña, J., García-Font, N., Romero, A., Pino, J. del, Ramos, E., Hadjipavlou-Litina, D., Soriano, E., Chioua, M., Samadi, A., Raghuvanshi, D. S., Singh, K. N., & Marco-Contelles, J. (2014). Toxicological and pharmacological evaluation, antioxidant, ADMET and molecular modeling of selected racemic chromenotacrine {11-amino-12-aryl-8,9,10,12-tetrahydro-7h-chromeno[2,3-b]quinolin-3-ols} for the potential prevention and treatment of Alzheimer's disease. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 74, 491–501. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2013.12.021>

- Pacher, P., Beckman, J. S., & Liaudet, L. (2007). Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiological Reviews*, 87(1), 315–424. <https://doi.org/10.1152/physrev.00029.2006>
- Pancioli, A. M., Adeoye, O., Schmit, P. A., Khoury, J., Levine, S. R., Tomsick, T. A., Sucharew, H., Brooks, C. E., Crocco, T. J., Gutmann, L., Hemmen, T. M., Kasner, S. E., Kleindorfer, D., Knight, W. A., Martini, S., McKinney, J. S., Meurer, W. J., Meyer, B. C., Schneider, A., & Barr, T. (2013). Combined approach to lysis utilizing Eptifibatid and recombinant tissue plasminogen activator in acute ischemic stroke—enhanced regimen stroke trial. *Stroke*, 44(9), 2381–2387. <https://doi.org/10.1161/strokeaha.113.001059>
- Park, S.-Y., & Kim, I.-S. (2017). Engulfment signals and the phagocytic machinery for apoptotic cell clearance. *Experimental & Molecular Medicine*, 49(5). <https://doi.org/10.1038/emm.2017.52>
- Passeri, E., Elkhoury, K., Morsink, M., Broersen, K., Linder, M., Tamayol, A., Malaplate, C., Yen, F. T., & Arab-Tehrany, E. (2022). Alzheimer’s disease: Treatment strategies and their limitations. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(22), 13954. <https://doi.org/10.3390/ijms232213954>
- Paul, S., & Candelario-Jalil, E. (2021). Emerging neuroprotective strategies for the treatment of ischemic stroke: An overview of clinical and preclinical studies. *Experimental Neurology*, 335, 113518. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2020.113518>
- Pazos, A. J., Green, E. J., Busto, R., McCabe, P. M., Baena, R. C., Ginsberg, M. D., Globus, M. Y.-T., Schneiderman, N., & Dietrich, W. D. (1999). Effects of combined postischemic hypothermia and delayed n-tert-butyl- α -phenylnitronone (PBN) administration on histopathological and behavioral deficits associated with transient global ischemia in rats. *Brain Research*, 846(2), 186–195. [https://doi.org/10.1016/s0006-8993\(99\)02010-7](https://doi.org/10.1016/s0006-8993(99)02010-7)
- Peng, C., Wang, X., Chen, J., Jiao, R., Wang, L., Li, Y. M., Zuo, Y., Liu, Y., Lei, L., Ma, K. Y., Huang, Y., & Chen, Z.-Y. (2014). Biology of ageing and role of dietary antioxidants. *BioMed Research International*, 2014, 1–13. <https://doi.org/10.1155/2014/831841>
- Peters, D. G., Connor, J. R., & Meadowcroft, M. D. (2015). The relationship between Iron Dyshomeostasis and amyloidogenesis in alzheimer’s disease: Two sides of the same coin. *Neurobiology of Disease*, 81, 49–65. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2015.08.007>
- Peters, S. A., Huxley, R. R., & Woodward, M. (2014). Diabetes as a risk factor for stroke in women compared with men: A systematic review and meta-analysis of 64 cohorts, including 775 385 individuals and 12 539 strokes. *The Lancet*, 383(9933), 1973–1980. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(14\)60040-4](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(14)60040-4)
- Phaniendra, A., Jestadi, D. B., & Periyasamy, L. (2014). Free radicals: Properties, sources, targets, and their implication in various diseases. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, 30(1), 11–26. <https://doi.org/10.1007/s12291-014-0446-0>
- Phillis, J. W., & Clough-Helfman, C. (1990). Protection from cerebral ischemic injury in gerbils with the spin trap agent N-tert-butyl- α -phenylnitronone (PBN). *Neuroscience Letters*, 116(3), 315–319. [https://doi.org/10.1016/0304-3940\(90\)90093-o](https://doi.org/10.1016/0304-3940(90)90093-o)
- Piechowski-Jozwiak, B., Abidi, E., El Nekidy, W. S., & Bogousslavsky, J. (2022). Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics of Desmoteplase. *European*

- Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics*, 47(2), 165–176.
<https://doi.org/10.1007/s13318-021-00743-8>
- Piotrowska, D. G., Balzarini, J., Andrei, G., Schols, D., Snoeck, R., Wróblewski, A. E., & Gotkowska, J. (2016). Novel isoxazolidine analogues of homonucleosides and homonucleotides. *Tetrahedron*, 72(50), 8294–8308.
<https://doi.org/10.1016/j.tet.2016.10.073>
 - Piotrowska, D. G., Mediavilla, L., Cuarental, L., Głowacka, I. E., Marco-Contelles, J., Hadjipavlou-Litina, D., López-Muñoz, F., & Oset-Gasque, M. J. (2019). Synthesis and neuroprotective properties of N-substituted *c*-dialkoxyphosphorylated nitrones. *ACS Omega*, 4(5), 8581–8587. <https://doi.org/10.1021/acsomega.9b00189>
 - Pisoschi, A. M., & Pop, A. (2015). The role of antioxidants in the chemistry of Oxidative Stress: A Review. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 97, 55–74.
<https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2015.04.040>
 - Plesnila, N., Zinkel, S., Le, D. A., Amin-Hanjani, S., Wu, Y., Qiu, J., Chiarugi, A., Thomas, S. S., Kohane, D. S., Korsmeyer, S. J., & Moskowitz, M. A. (2001). Bid mediates neuronal cell death after oxygen/ glucose deprivation and focal cerebral ischemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(26), 15318–15323.
<https://doi.org/10.1073/pnas.261323298>
 - Poreba, M., Strozyk, A., Salvesen, G. S., & Drag, M. (2013). Caspase substrates and inhibitors. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 5(8).
<https://doi.org/10.1101/cshperspect.a008680>
 - Pozo-Rodríguez, A., Gradillas, A., Serrano, J., Fernández, A. P., Martínez-Murillo, R., & Pérez-Castells, J. (2012). New synthesis and promising neuroprotective role in experimental ischemic stroke of ONO-1714. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 54, 439–446.
<https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2012.05.031>
 - Prince, M., Bryce, R., Albanese, E., Wimo, A., Ribeiro, W., & Ferri, C. P. (2013). The global prevalence of dementia: A systematic review and metaanalysis. *Alzheimer's & Dementia*, 9(1), 63. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2012.11.007>
 - Qin, C., Yang, S., Chu, Y.-H., Zhang, H., Pang, X.-W., Chen, L., Zhou, L.-Q., Chen, M., Tian, D.-S., & Wang, W. (2022). Signaling pathways involved in ischemic stroke: Molecular mechanisms and therapeutic interventions. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 7(1). <https://doi.org/10.1038/s41392-022-01064-1>
 - Qiu, C., De Ronchi, D., & Fratiglioni, L. (2007). The epidemiology of the Dementias: An update. *Current Opinion in Psychiatry*, 20(4), 380–385.
<https://doi.org/10.1097/yco.0b013e32816ebc7b>
 - Quan, Y.-Y., Qin, G.-Q., Huang, H., Liu, Y.-H., Wang, X.-P., & Chen, T.-S. (2016). Dominant roles of Fenton reaction in sodium nitroprusside-induced chondrocyte apoptosis. *Free Radical Biology and Medicine*, 94, 135–144.
<https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2016.02.026>
 - Quaegebeur, A., Lange, C., & Carmeliet, P. (2011). The neurovascular link in health and disease: Molecular mechanisms and therapeutic implications. *Neuron*, 71(3), 406–424. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2011.07.013>
 - Querfurth, H. W., & LaFerla, F. M. (2010). Alzheimer's disease. *New England Journal of Medicine*, 362(4), 329–344. <https://doi.org/10.1056/nejmra0909142>
 - Quintard, H., Borsotto, M., Veyssiere, J., Gandin, C., Labbal, F., Widmann, C., Lazdunski, M., & Heurteaux, C. (2011). MLC901, a traditional Chinese medicine

- protects the brain against global ischemia. *Neuropharmacology*, 61(4), 622–631. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2011.05.003>
- Queensland Brain Institute *Types of dementia*. University of Queensland. (2019, August 8). <https://qbi.uq.edu.au/brain/dementia/types-dementia>
 - Radak, D., Katsiki, N., Resanovic, I., Jovanovic, A., Sudar-Milovanovic, E., Zafirovic, S., A. Mousad, S., & R. Isenovic, E. (2017). Apoptosis and acute brain ischemia in ischemic stroke. *Current Vascular Pharmacology*, 15(2), 115–122. <https://doi.org/10.2174/1570161115666161104095522>
 - Ransohoff, R. M., & Cardona, A. E. (2010). The myeloid cells of the central nervous system parenchyma. *Nature*, 468(7321), 253–262. <https://doi.org/10.1038/nature09615>
 - Rastogi, V., Santiago-Moreno, J., & Doré, S. (2015). Ginseng: A promising neuroprotective strategy in stroke. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 8. <https://doi.org/10.3389/fncel.2014.00457>
 - Rea, I. M., Gibson, D. S., McGilligan, V., McNerlan, S. E., Alexander, H. D., & Ross, O. A. (2018). Age and age-related diseases: Role of inflammation triggers and cytokines. *Frontiers in Immunology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00586>
 - Reiter, R. J., Tan, D.-xian, Leon, J., Kilic, Ü., & Kilic, E. (2005). When melatonin gets on your nerves: Its beneficial actions in experimental models of stroke. *Experimental Biology and Medicine*, 230(2), 104–117. <https://doi.org/10.1177/153537020523000205>
 - Riederer, P., & Laux, G. (2011). MAO-inhibitors in parkinson's disease. *Experimental Neurobiology*, 20(1), 1–17. <https://doi.org/10.5607/en.2011.20.1.1>
 - Riley, J. (2001). *Rising life expectancy*. Cambridge University Press.
 - Riley, K. P., Snowdon, D. A., & Markesbery, W. R. (2002). Alzheimer's neurofibrillary pathology and the spectrum of cognitive function: Findings from the nun study. *Annals of Neurology*, 51(5), 567–577. <https://doi.org/10.1002/ana.10161>
 - Ringelstein, E. B., Thijs, V., Norrving, B., Chamorro, A., Aichner, F., Grond, M., Saver, J., Laage, R., Schneider, A., Rathgeb, F., Vogt, G., Charissé, G., Fiebach, J. B., Schwab, S., Schäbitz, W. R., Kollmar, R., Fisher, M., Brozman, M., Skoloudik, D., Gruber, F., Leal, J. S., Veltkamp, R., Körmann, M., Berrouschot, J., Egerer, G., Mikus, G., Limmroth, V., Meinhard, K., Bracoud, L., Fiebach, J. B., Hermier, M., Bouffard, J., & Weber, R. (2013). Granulocyte colony-stimulating factor in patients with acute ischemic stroke: results of the AX200 for Ischemic Stroke trial. *Stroke*, 44(10), 2681–2687. <https://doi.org/10.1161/strokeaha.113.001531>
 - Rodrigo, R., Fernandez-Gajardo, R., Gutierrez, R., Matamala, J., Carrasco, R., Miranda-Merchak, A., & Feuerhake, W. (2013). Oxidative stress and pathophysiology of ischemic stroke: Novel therapeutic opportunities. *CNS & Neurological Disorders - Drug Targets*, 12(5), 698–714. <https://doi.org/10.2174/1871527311312050015>
 - Rodríguez-Franco, M. I., Fernández-Bachiller, M. I., Pérez, C., Hernández-Ledesma, B., & Bartolomé, B. (2005). Novel tacrine-melatonin hybrids as dual-acting drugs for Alzheimer disease, with improved acetylcholinesterase inhibitory and antioxidant properties. *Journal of Medicinal Chemistry*, 49(2), 459–462. <https://doi.org/10.1021/jm050746d>

- Roher, A. E., Esh, C., Rahman, A., Kokjohn, T. A., & Beach, T. G. (2004). Atherosclerosis of cerebral arteries in Alzheimer's disease. *Stroke*, 35(11_suppl_1), 2623–2627. <https://doi.org/10.1161/01.str.0000143317.70478.b3>
- Román, G. C., Sachdev, P., Royall, D. R., Bullock, R. A., Orgogozo, J.-M., López-Pousa, S., Arizaga, R., & Wallin, A. (2004). Vascular cognitive disorder: A new diagnostic category updating vascular cognitive impairment and Vascular dementia. *Journal of the Neurological Sciences*, 226(1–2), 81–87. <https://doi.org/10.1016/j.jns.2004.09.016>
- Rosales-Corral, S. A., Acuña-Castroviejo, D., Coto-Montes, A., Boga, J. A., Manchester, L. C., Fuentes-Broto, L., Korkmaz, A., Ma, S., Tan, D.-X., & Reiter, R. J. (2011). Alzheimer's disease: Pathological mechanisms and the beneficial role of Melatonin. *Journal of Pineal Research*, 52(2), 167–202. <https://doi.org/10.1111/j.1600-079x.2011.00937.x>
- Rosenberry, T., Brazzolotto, X., Macdonald, I., Wandhammer, M., Trovaslet-Leroy, M., Darvesh, S., & Nachon, F. (2017). Comparison of the binding of reversible inhibitors to human butyrylcholinesterase and acetylcholinesterase: A crystallographic, kinetic and calorimetric study. *Molecules*, 22(12), 2098. <https://doi.org/10.3390/molecules22122098>
- Roser, M., Ortiz-Ospina, E., & Ritchie, H. (2019). Life Expectancy. <https://ourworldindata.org/life-expectancy>.
- Rost, N. S., Brodtmann, A., Pase, M. P., van Veluw, S. J., Biffi, A., Duering, M., Hinman, J. D., & Dichgans, M. (2022). Post-stroke cognitive impairment and dementia. *Circulation Research*, 130(8), 1252–1271. <https://doi.org/10.1161/circresaha.122.319951>
- Roy, R. G., Mandal, P. K., & Maroon, J. C. (2023). Oxidative stress occurs prior to amyloid AB plaque formation and tau phosphorylation in alzheimer's disease: Role of glutathione and metal ions. *ACS Chemical Neuroscience*, 14(17), 2944–2954. <https://doi.org/10.1021/acschemneuro.3c00486>
- Rundek, T., Tolea, M., Ariko, T., Fagerli, E. A., & Camargo, C. J. (2022). Vascular cognitive impairment (VCI). *Neurotherapeutics*, 19(1), 68–88. <https://doi.org/10.1007/s13311-021-01170-y>
- Sacco, R. L., Chong, J. Y., Prabhakaran, S., & Elkind, M. S. V. (2007). Experimental treatments for acute ischaemic stroke. *The Lancet*, 369(9558), 331–341. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(07\)60155-x](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(07)60155-x)
- Sacco, R. L., Kasner, S. E., Broderick, J. P., Caplan, L. R., Connors, J. J. (B.), Culebras, A., Elkind, M. S. V., George, M. G., Hamdan, A. D., Higashida, R. T., Hoh, B. L., Janis, L. S., Kase, C. S., Kleindorfer, D. O., Lee, J.-M., Moseley, M. E., Peterson, E. D., Turan, T. N., Valderrama, A. L., & Vinters, H. V. (2013). An updated definition of stroke for the 21st Century. *Stroke*, 44(7), 2064–2089. <https://doi.org/10.1161/str.0b013e318296aeca>
- Salisbury, D., & Bronas, U. (2015). Reactive oxygen and nitrogen species. *Nursing Research*, 64(1), 53–66. <https://doi.org/10.1097/nnr.000000000000068>
- Samadi, A., Soriano, E., Revuelta, J., Valderas, C., Chioua, M., Garrido, I., Bartolomé, B., Tomassolli, I., Ismaili, L., González-Lafuente, L., Villarroya, M., García, A. G., Oset-Gasque, M. J., & Marco-Contelles, J. (2011). Synthesis, structure, theoretical and experimental in vitro antioxidant/pharmacological properties of α -aryl, N-alkyl nitrones, as potential agents for the treatment of cerebral ischemia.

- Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 19(2), 951–960.
<https://doi.org/10.1016/j.bmc.2010.11.053>
- Saver, J. L. (2006). Time is brain—quantified. *Stroke*, 37(1), 263–266.
<https://doi.org/10.1161/01.str.0000196957.55928.ab>
 - Schäbitz Wolf R., Laage, R., Vogt, G., Koch, W., Kollmar, R., Schwab, S., Schneider, D., Hamann, G. F., Rosenkranz, M., Veltkamp, R., Fiebach, J. B., Hacke, W., Grotta, J. C., Fisher, M., & Schneider, A. (2010). AXIS: a trial of intravenous granulocyte colony-stimulating factor in acute ischemic stroke. *Stroke*, 41(11), 2545–2551.
<https://doi.org/10.1161/strokeaha.110.579508>
 - Schumacher, H. C., Meyers, P. M., Yavagal, D. R., Harel, N. Y., Elkind, M. S., Mohr, J. P., & Pile-Spellman, J. (2003). Endovascular mechanical thrombectomy of an occluded superior division branch of the left MCA for acute cardioembolic stroke. *CardioVascular and Interventional Radiology*, 26(3), 305–308.
<https://doi.org/10.1007/s00270-003-2719-5>
 - Shi, Z.-S., Loh, Y., Walker, G., & Duckwiler, G. R. (2010). Clinical outcomes in middle cerebral artery trunk occlusions versus secondary division occlusions after mechanical thrombectomy. *Stroke*, 41(5), 953–960.
<https://doi.org/10.1161/strokeaha.109.571943>
 - Shimobayashi, M., & Hall, M. N. (2014). Making new contacts: The mtor network in metabolism and signalling crosstalk. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 15(3), 155–162. <https://doi.org/10.1038/nrm3757>
 - Shintani, T., & Klionsky, D. J. (2004). Autophagy in health and disease: A double-edged sword. *Science*, 306(5698), 990–995. <https://doi.org/10.1126/science.1099993>
 - Shukla, M., Govitrapong, P., Boontem, P., Reiter, R., & Satayavivad, J. (2017). Mechanisms of melatonin in alleviating Alzheimer's disease. *Current Neuropharmacology*, 15(7). <https://doi.org/10.2174/1570159x15666170313123454>
 - Spuch, C., Antequera, D., Isabel Fernández-Bachiller, M., Isabel Rodríguez-Franco, M., & Carro, E. (2009). A new tacrine–melatonin hybrid reduces amyloid burden and behavioral deficits in a mouse model of Alzheimer's disease. *Neurotoxicity Research*, 17(4), 421–431. <https://doi.org/10.1007/s12640-009-9121-2>
 - Stein, D. G. (2011). Is progesterone a worthy candidate as a novel therapy for Traumatic Brain Injury? *Dialogues in Clinical Neuroscience*, 13(3), 352–359.
<https://doi.org/10.31887/dcns.2011.13.2/dstein>
 - Stemer, A., & Lyden, P. (2010). Evolution of the thrombolytic treatment window for acute ischemic stroke. *Current Neurology and Neuroscience Reports*, 10(1), 29–33.
<https://doi.org/10.1007/s11910-009-0076-8>
 - Strecker, J.-K., Sevimli, S., Schilling, M., Klocke, R., Nikol, S., Schneider, A., & Schäbitz, W.-R. (2010). Effects of G-CSF treatment on neutrophil mobilization and neurological outcome after transient focal ischemia. *Experimental Neurology*, 222(1), 108–113. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2009.12.012>
 - Sydserff, S. G., Borelli, A. R., Green, A. R., & Cross, A. J. (2002). Effect of NXY-059 on infarct volume after transient or permanent middle cerebral artery occlusion in the rat; studies on dose, plasma concentration and therapeutic time window. *British Journal of Pharmacology*, 135(1), 103–112.
<https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0704449>

- Tanida, I., Ueno, T., & Kominami, E. (2004). LC3 conjugation system in mammalian autophagy. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 36(12), 2503–2518. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2004.05.009>
- Taş, Y. Ç., Solaroğlu, İ., & Gürsoy-Özdemir, Y. (2019). Spreading depolarization waves in neurological diseases: A short review about its pathophysiology and clinical relevance. *Current Neuropharmacology*, 17(2), 151–164. <https://doi.org/10.2174/1570159x15666170915160707>
- Teleanu, D. M., Niculescu, A.-G., Lungu, I. I., Radu, C. I., Vladâcenco, O., Roza, E., Costăchescu, B., Grumezescu, A. M., & Teleanu, R. I. (2022). An overview of oxidative stress, neuroinflammation, and Neurodegenerative Diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(11), 5938. <https://doi.org/10.3390/ijms23115938>
- The Penumbra Pivotal Stroke Trial Investigators. (2009). The Penumbra Pivotal Stroke Trial: Safety and Effectiveness of a New Generation of Mechanical Devices for Clot Removal in Intracranial Large Vessel Occlusive disease. *Stroke*, 40(8), 2761–2768. <https://doi.org/10.1161/strokeaha.108.544957>
- Tian, J., Fu, F., Li, G., Wang, Y., Gao, Y., Liu, Z., & Zhang, S. (2009). SMND-309, a novel derivate of salvianolic acid B, ameliorates cerebral infarction in rats: Characterization and role. *Brain Research*, 1263, 114–121. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2009.01.034>
- Tiwari, P., Khan, H., Singh, T. G., & Grewal, A. K. (2022). Poly (ADP-ribose) polymerase: An overview of mechanistic approaches and therapeutic opportunities in the management of stroke. *Neurochemical Research*, 47(7), 1830–1852. <https://doi.org/10.1007/s11064-022-03595-z>
- Tuo, Q., Zhang, S., & Lei, P. (2021). Mechanisms of neuronal cell death in ischemic stroke and their therapeutic implications. *Medicinal Research Reviews*, 42(1), 259–305. <https://doi.org/10.1002/med.21817>
- Tuttolomondo, A., Maida, C., & Pinto, A. (2015). Inflammation and inflammatory cell recruitment in acute cerebrovascular diseases. *Current Immunology Reviews*, 11(1), 24–32. <https://doi.org/10.2174/157339551101150417101550>
- Uchiyama, Y. (2001). Autophagic cell death and its execution by lysosomal cathepsins. *Archives of Histology and Cytology*, 64(3), 233–246. <https://doi.org/10.1679/aohc.64.233>
- Uzdensky, A. B. (2019). Apoptosis regulation in the penumbra after ischemic stroke: Expression of pro- and antiapoptotic proteins. *Apoptosis*, 24(9-10), 687–702. <https://doi.org/10.1007/s10495-019-01556-6>
- Valko, M., Izakovic, M., Mazur, M., Rhodes, C. J., & Telser, J. (2004). Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 266(1/2), 37–56. <https://doi.org/10.1023/b:mcbi.0000049134.69131.89>
- Venkataraman, K., Khurana, S., & Tai, T. (2013). Oxidative stress in aging-matters of the heart and mind. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(9), 17897–17925. <https://doi.org/10.3390/ijms140917897>
- Vermunt, L., Sikkens, S. A. M., van den Hout, A., Handels, R., Bos, I., van der Flier, W. M., Kern, S., Ousset, P., Maruff, P., Skoog, I., Verhey, F. R. J., Freund-Levi, Y., Tsolaki, M., Wallin, Å. K., Olde Rikkert, M., Soininen, H., Spuru, L., Zetterberg, H., Blennow, K., Scheltens, P., Muniz-Terrera, G., & Visser, P. J. (2019). Duration of preclinical, prodromal, and dementia stages of alzheimer’s disease in relation to

- age, sex, and *apoe* genotype. *Alzheimer's & Dementia*, 15(7), 888–898. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2019.04.001>
- Versnick, E. C., Do, H. M., Albers, G. W., Tong, D. C., & Marks, M. P. (2005). Mechanical Thrombectomy for Acute Stroke. *American Journal of Neuroradiology*, 26 (4), 875-879.
 - Vicente, S., Pérez-Rodríguez, R., Oliván, A. M., Martínez Palacián, A., González, M. P., & Oset-Gasque, M. J. (2006). Nitric oxide and peroxynitrite induce cellular death in bovine chromaffin cells: Evidence for a mixed necrotic and apoptotic mechanism with caspases activation. *Journal of Neuroscience Research*, 84(1), 78–96. <https://doi.org/10.1002/jnr.20853>
 - Wakade, C., Khan, M. M., De Sevilla, L. M., Zhang, Q.-G., Mahesh, V. B., & Brann, D. W. (2008). Tamoxifen neuroprotection in cerebral ischemia involves attenuation of kinase activation and superoxide production and potentiation of mitochondrial superoxide dismutase. *Endocrinology*, 149(1), 367–379. <https://doi.org/10.1210/en.2007-0899>
 - Wang, H.-rong, Chen, M., Wang, F.-long, Dai, L.-hua, Fei, A.-hua, Liu, J.-fu, Li, H.-jun, Shen, S., Liu, M., & Pan, S.-ming. (2015). Comparison of therapeutic effect of recombinant tissue plasminogen activator by treatment time after onset of acute ischemic stroke. *Scientific Reports*, 5(1). <https://doi.org/10.1038/srep11743>
 - Wang, T.-Y., Libardo, M. D., Angeles-Boza, A. M., & Pellois, J.-P. (2017). Membrane oxidation in cell delivery and cell killing applications. *ACS Chemical Biology*, 12(5), 1170–1182. <https://doi.org/10.1021/acschembio.7b00237>
 - Wardlaw, J. M., Murray, V., Berge, E., & del Zoppo, G. J. (2014). Thrombolysis for acute ischaemic stroke. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, 2016(1). <https://doi.org/10.1002/14651858.cd000213.pub3>
 - Webster, S. J., Bachstetter, A. D., Nelson, P. T., Schmitt, F. A., & Van Eldik, L. J. (2014). Using mice to model Alzheimer's dementia: An overview of the clinical disease and the preclinical behavioral changes in 10 mouse models. *Frontiers in Genetics*, 5. <https://doi.org/10.3389/fgene.2014.00088>
 - Weinreb, O., Amit, T., Mandel, S., Kupersmidt, L., & Youdim, M. B. H. (2010). Neuroprotective multifunctional iron chelators: From redox-sensitive process to novel therapeutic opportunities. *Antioxidants & Redox Signaling*, 13(6), 919–949. <https://doi.org/10.1089/ars.2009.2929>
 - Williams, G. C. (1957). Pleiotropy, natural selection, and the evolution of senescence. *Evolution*, 11(4), 398. <https://doi.org/10.2307/2406060>
 - Wimmer, I., Zrzavy, T., & Lassmann, H. (2018). Neuroinflammatory responses in experimental and human stroke lesions. *Journal of Neuroimmunology*, 323, 10–18. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2018.07.003>
 - Winterbourn, C. C., Kettle, A. J., & Hampton, M. B. (2016). Reactive oxygen species and neutrophil function. *Annual Review of Biochemistry*, 85(1), 765–792. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-060815-014442>
 - World health statistics 2022: monitoring health for the SDGs, sustainable development goals. Geneva: World Health Organization; 2022. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
 - Wu, J. Q., Kosten, T. R., & Zhang, X. Y. (2013). Free radicals, antioxidant defense systems, and schizophrenia. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 46, 200–206. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2013.02.015>

- Wu, M.-H., Huang, C.-C., Chio, C.-C., Tsai, K.-J., Chang, C.-P., Lin, N.-K., & Lin, M.-T. (2016). Inhibition of peripheral TNF- α and downregulation of microglial activation by alpha-lipoic acid and etanercept protect rat brain against ischemic stroke. *Molecular Neurobiology*, 53(7), 4961–4971. <https://doi.org/10.1007/s12035-015-9418-5>
- Xie, H. R.; Hu, L. Sç.; Li, G. Y. (2010). SH-SY5Y human neuroblastoma cell line: in vitro cell model of dopaminergic neurons in Parkinson's disease. *Chinese Medical Journal*, 123(8), 1086-92.
- Xie, X., Atkins, E., Lv, J., Bennett, A., Neal, B., Ninomiya, T., Woodward, M., MacMahon, S., Turnbull, F., Hillis, G. S., Chalmers, J., Mant, J., Salam, A., Rahimi, K., Perkovic, V., & Rodgers, A. (2016). Effects of intensive blood pressure lowering on cardiovascular and renal outcomes: Updated systematic review and meta-analysis. *The Lancet*, 387(10017), 435–443. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(15\)00805-3](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(15)00805-3)
- Xing, C., Arai, K., Lo, E. H., & Hommel, M. (2012). Pathophysiologic Cascades in ischemic stroke. *International Journal of Stroke*, 7(5), 378–385. <https://doi.org/10.1111/j.1747-4949.2012.00839.x>
- Xu, G., Liu, X., Zhu, W., Yin, Q., Zhang, R., & Fan, X. (2007). Feasibility of treating hyperfibrinogenemia with intermittently administered batroxobin in patients with ischemic stroke/transient ischemic attack for secondary prevention. *Blood Coagulation & Fibrinolysis*, 18(2), 193–197. <https://doi.org/10.1097/mbc.0b013e328040c0f2>
- Xu, W., Jin, W., Zhang, X., Chen, J., & Ren, C. (2016). Remote limb preconditioning generates a neuroprotective effect by modulating the extrinsic apoptotic pathway and trail-receptors expression. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 37(1), 169–182. <https://doi.org/10.1007/s10571-016-0360-5>
- Yamamoto, A., Shin, R.-W., Hasegawa, K., Naiki, H., Sato, H., Yoshimasu, F., & Kitamoto, T. (2004). Iron (III) induces aggregation of hyperphosphorylated τ and its reduction to iron (II) reverses the aggregation: Implications in the formation of neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease. *Journal of Neurochemistry*, 82(5), 1137–1147. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2002.t01-1-01061.x>
- Yamashima, T., & Oikawa, S. (2009). The role of lysosomal rupture in neuronal death. *Progress in Neurobiology*, 89(4), 343–358. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2009.09.003>
- Yang, T.-X., Zhu, Y.-F., Wang, C.-C., Yang, J.-Y., Xue, C.-H., Huang, Q.-R., Wang, Y.-M., & Zhang, T.-T. (2022). EPA-enriched plasmalogen attenuates the cytotoxic effects of LPS-stimulated microglia on the SH-SY5Y neuronal cell line. *Brain Research Bulletin*, 186, 143–152. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2022.06.002>
- Yang, S., & Li, W. (2016). Targeting oxidative stress for the treatment of ischemic stroke: Upstream and downstream therapeutic strategies. *Brain Circulation*, 2(4), 153. <https://doi.org/10.4103/2394-8108.195279>
- Yin, X.-M., Luo, Y., Cao, G., Bai, L., Pei, W., Kuharsky, D. K., & Chen, J. (2002). Bid-mediated mitochondrial pathway is critical to ischemic neuronal apoptosis and focal cerebral ischemia. *Journal of Biological Chemistry*, 277(44), 42074–42081. <https://doi.org/10.1074/jbc.m204991200>

- Yin, Y., Sun, G., Li, E., Kiselyov, K., & Sun, D. (2017). ER stress and impaired autophagy flux in neuronal degeneration and Brain Injury. *Ageing Research Reviews*, 34, 3–14. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2016.08.008>
- You, J.-yi, Liu, X.-wei, Bao, Y.-xia, Shen, Z.-nan, Wang, Q., He, G.-yun, Lu, J., Zhang, J.-guo, Chen, J.-wen, & Liu, P.-qing. (2022). A novel phosphodiesterase 9A inhibitor LW33 protects against ischemic stroke through the cGMP/PKG/CREB pathway. *European Journal of Pharmacology*, 925, 174987. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2022.174987>
- You, W.-K., Choi, W.-S., Koh, Y.-S., Shin, H.-C., Jang, Y., & Chung, K.-H. (2004). Functional characterization of recombinant batroxobin, a snake venom thrombin-like enzyme, expressed from *Pichia pastoris*. *FEBS Letters*, 571(1-3), 67–73. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2004.06.060>
- Zhang, B., Tanaka, J., Yang, L., Yang, L., Sakanaka, M., Hata, R., Maeda, N., & Mitsuda, N. (2004). Protective effect of vitamin E against focal brain ischemia and neuronal death through induction of target genes of hypoxia-inducible factor-1. *Neuroscience*, 126(2), 433–440. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2004.03.057>
- Zhang, C., Qin, Y.-Y., Chen, Q., Jiang, H., Chen, X.-Z., Xu, C.-L., Mao, P.-J., He, J., & Zhou, Y.-H. (2014). Alcohol intake and risk of stroke: A dose–response meta-analysis of prospective studies. *International Journal of Cardiology*, 174(3), 669–677. <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2014.04.225>
- Zhang, R., Yang, D., Zhou, C., Cheng, K., Liu, Z., Chen, L., Fang, L., & Xie, P. (2012). B-actin as a loading control for plasma-based western blot analysis of Major Depressive Disorder patients. *Analytical Biochemistry*, 427(2), 116–120. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2012.05.008>
- Zhang, Z., Zhang, G., Sun, Y., Szeto, S. S., Law, H. C., Quan, Q., Li, G., Yu, P., Sho, E., Siu, M. K., Lee, S. M., Chu, I. K., & Wang, Y. (2016). Tetramethylpyrazine Nitron, a multifunctional neuroprotective agent for ischemic stroke therapy. *Scientific Reports*, 6(1). <https://doi.org/10.1038/srep37148>
- Zhao, Y., & Rempe, D. A. (2011). Prophylactic neuroprotection against stroke: Low-dose, prolonged treatment with deferoxamine or DEFERASIROX establishes prolonged neuroprotection independent of HIF-1 function. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 31(6), 1412–1423. <https://doi.org/10.1038/jcbfm.2010.230>
- Zhou, T., Mo, J., Xu, W., Hu, Q., Liu, H., Fu, Y., & Jiang, J. (2022). Mild hypothermia alleviates oxygen–glucose deprivation/reperfusion-induced apoptosis by inhibiting ROS generation, improving mitochondrial dysfunction and regulating DNA damage repair pathway in PC12 cells. *Apoptosis*. <https://doi.org/10.1007/s10495-022-01799-w>
- Zhu, L.-J., Li, F., & Zhu, D.-Y. (2023). Nnos and neurological, neuropsychiatric disorders: A 20-year story. *Neuroscience Bulletin*. <https://doi.org/10.1007/s12264-023-01060-7>
- Zuroff, L., Daley, D., Black, K. L., & Koronyo-Hamaoui, M. (2017). Clearance of cerebral AB in alzheimer’s disease: Reassessing the role of microglia and monocytes. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 74(12), 2167–2201. <https://doi.org/10.1007/s00018-017-2463-7>



Anexo:

**Resumen de los trabajos
publicados en esta tesis
doctoral**

Nombre del artículo	Autores	Nombre de la revista	Factor de impacto (JCR)	Año
Synthesis, antioxidant properties and neuroprotection of α-phenyl-tert-butyl nitronone derived HomoBisNitrones in in vitro and in vivo ischemia models.	Chamorro, B., Diez-Iriepa, D., Merás-Sáiz, B., Chioua, M., García-Vieira, D., Iriepa, I., Hadjipavlou-Litina, D., López-Muñoz, F., Martínez-Murillo, R., González-Nieto, D., Fernández, I., Marco-Contelles, J., & Oset-Gasque, M. J.	<i>Scientific Reports</i>	4.38 (2020) Q1	2020
Homo-Tris-Nitrones Derived from α-Phenyl-N-tertbutylnitronone: Synthesis, Neuroprotection and Antioxidant Properties.	Diez-Iriepa, D*, Chamorro, B*, Talaván, M., Chioua, M., Iriepa, I., Hadjipavlou-Litina, D., López-Muñoz, F., Marco-Contelles, J., & Oset-Gasque, M. J. (* co-first)	<i>International Journal of Molecular Sciences</i>	5.92 (2020) Q1	2020
Synthesis, Neuroprotection, and Antioxidant Activity of 1,10-Biphenylnitrones as α-Phenyl-N-tert-Butylnitronone Analogues in In Vitro Ischemia Models	Chamorro, B., García-Vieira, D., Diez-Iriepa, D., Garagarza, E., Chioua, M., Hadjipavlou-Litina, D., López-Muñoz, F., Marco-Contelles, J., & Oset-Gasque, M. J.	<i>Molecules</i>	4.93 (2021) Q2	2021
Nucleobase-derived nitrones: Synthesis and antioxidant and neuroprotective activities in an in vitro model of ischemia–reperfusion.	Chamorro, B., Głowacka, I. E., Gotkowska, J., Gulej, R., Hadjipavlou-Litina, D., López-Muñoz, F., Marco-Contelles, J., Piotrowska, D. G., & Oset-Gasque, M. J.	<i>International Journal of Molecular Sciences</i>	5.6 (2022) Q1	2022
Neuroprotective and antioxidant properties of new quinolylnitrones in in vitro and in vivo cerebral ischemia models.	Chamorro, B., Izquierdo-Bermejo, S., Serrano, J., Hadjipavlou-Litina, D., Chioua, M., López-Muñoz, F., Marco-Contelles, J., Martínez-Murillo, R., & Oset-Gasque, M. J.	<i>Scientific Reports</i>	4.99 (p.2023) Q1	2023
Neuroprotective and Antioxidant Properties of Cholesteronitronone ChN2 and Quinolylnitronone QN23 in an Experimental Model of Cerebral Ischemia: Involvement of Necrotic and Apoptotic Cell Death.	Chamorro, B., Izquierdo-Bermejo, S., Martín-de-Saavedra, M. D., López-Muñoz, F., Chioua, M., Marco-Contelles, J., & Oset-Gasque, M. J.	<i>Antioxidants</i>	7.67 (p.2023) Q1	2023



OPEN

Synthesis, antioxidant properties and neuroprotection of α -phenyl-*tert*-butylnitronone derived *HomoBisNitrones* in in vitro and in vivo ischemia models

Beatriz Chamorro^{1,2,13}, Daniel Diez-Iriepa^{3,4,13}, Belén Merás-Sáiz³, Mourad Chioua³, David García-Vieira³, Isabel Iriepa^{4,5}, Dimitra Hadjipavlou-Litina⁶, Francisco López-Muñoz^{2,7}, Ricardo Martínez-Murillo⁸, Daniel González-Nieto^{9,10}, Israel Fernández^{10,11}, José Marco-Contelles³ & María Jesús Oset-Gasque^{1,12}

We herein report the synthesis, antioxidant power and neuroprotective properties of nine homo-bis-nitrones HBNs 1–9 as alpha-phenyl-*N-tert*-butylnitronone (PBN) analogues for stroke therapy. In vitro neuroprotection studies of HBNs 1–9 against Oligomycin A/Rotenone and in an oxygen-glucose-deprivation model of ischemia in human neuroblastoma cell cultures, indicate that (1*Z*,1'*Z*)-1,1'-(1,3-phenylene)bis(*N*-benzylmethanimine oxide) (HBN6) is a potent neuroprotective agent that prevents the decrease in neuronal metabolic activity ($EC_{50} = 1.24 \pm 0.39 \mu\text{M}$) as well as necrotic and apoptotic cell death. HBN6 shows strong hydroxyl radical scavenger power (81%), and capacity to decrease superoxide production in human neuroblastoma cell cultures (maximal activity = $95.8 \pm 3.6\%$), values significantly superior to the neuroprotective and antioxidant properties of the parent PBN. The higher neuroprotective ability of HBN6 has been rationalized by means of Density Functional Theory calculations. Calculated physicochemical and ADME properties confirmed HBN6 as a hit-agent showing suitable drug-like properties. Finally, the contribution of HBN6 to brain damage prevention was confirmed in a permanent MCAO setting by assessing infarct volume outcome 48 h after stroke in drug administered experimental animals, which provides evidence of a significant reduction of the brain lesion size and strongly suggests that HBN6 is a potential neuroprotective agent against stroke.

Bis-nitrones are well-known antioxidant and neuroprotective agents showing high clinical potential. For instance, bis-nitronone **W-AZN** (Fig. 1), an azulenyl spin trap possessing neuroprotective effects in an animal model of

¹Department of Biochemistry and Molecular Biology, Faculty of Pharmacy, Complutense University of Madrid, 28040 Madrid, Spain. ²Faculty of Health, Camilo José Cela University of Madrid (UCJC), Madrid, Spain. ³Laboratory of Medicinal Chemistry, Institute of Organic Chemistry (CSIC), Juan de la Cierva 3, 28006 Madrid, Spain. ⁴Department of Organic Chemistry and Inorganic Chemistry, Alcalá University, 28805 Alcalá de Henares, Madrid, Spain. ⁵Institute of Chemical Research Andrés M. del Río, Alcalá University, 28805 Alcalá de Henares, Madrid, Spain. ⁶Department of Pharmaceutical Chemistry, School of Pharmacy, Faculty of Health Sciences, Aristotle University of Thessaloniki, 54124 Thessaloniki, Greece. ⁷Neuropsychopharmacology Unit, "Hospital 12 de Octubre" Research Institute, Madrid, Spain. ⁸Neurovascular Research Group, Department of Translational Neurobiology, Cajal Institute (CSIC), Madrid, Spain. ⁹Center for Biomedical Technology (CTB), Universidad Politécnica de Madrid, Madrid, Spain. ¹⁰Biomedical Research Networking Center in Bioengineering Biomaterials and Nanomedicine (CIBER-BBN), Madrid, Spain. ¹¹Departamento de Química Orgánica I and Centro de Innovación en Química Avanzada (ORFEO-CINQA), Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Complutense de Madrid, 28040 Madrid, Spain. ¹²Instituto Universitario de Investigación en Neuroquímica, Universidad Complutense de Madrid, 28040 Madrid, Spain. ¹³These authors contributed equally: Beatriz Chamorro and Daniel Diez-Iriepa. ✉email: r.martinez@cajal.csic.es; israel@quim.ucm.es; iqoc21@iqog.csic.es; mjoset@ucm.es



Article

Homo-Tris-Nitrones Derived from α -Phenyl-*N*-*tert*-butylnitronone: Synthesis, Neuroprotection and Antioxidant Properties

Daniel Diez-Iriepa ^{1,2,†}, Beatriz Chamorro ^{3,4,†}, Marta Talaván ³, Mourad Chioua ¹, Isabel Iriepa ^{2,5} , Dimitra Hadjipavlou-Litina ⁶ , Francisco López-Muñoz ^{4,7} , José Marco-Contelles ^{1,*} and María Jesús Oset-Gasque ^{3,8,*}

¹ Laboratory of Medicinal Chemistry, Institute of Organic Chemistry (CSIC), Juan de la Cierva 3, 28006 Madrid, Spain; daniel.diezi@uah.es (D.D.-I.); mchioua@gmail.com (M.C.)

² Department of Organic Chemistry and Inorganic Chemistry, Alcalá University, Alcalá de Henares, 28805 Madrid, Spain; isabel.iriepa@uah.es

³ Department of Biochemistry and Molecular Biology, Faculty of Pharmacy, Complutense University of Madrid, Plaza Ramón y Cajal s/n, Ciudad Universitaria, 28040 Madrid, Spain; beatcha@ucm.es (B.C.); martalav@ucm.es (M.T.)

⁴ Faculty of Health, Camilo José Cela University of Madrid (UCJC), 28692 Villafranca del Castillo, Spain; flopez@ucjc.edu

⁵ Institute of Chemical Research Andrés M. del Río, Alcalá University, Alcalá de Henares, 28805 Madrid, Spain

⁶ Department of Pharmaceutical Chemistry, School of Pharmacy, Faculty of Health Sciences, Aristotle University of Thessaloniki, 54124 Thessaloniki, Greece; hadjipav@pharm.auth.gr

⁷ Neuropsychopharmacology Unit, "Hospital 12 de Octubre" Research Institute, 28041 Madrid, Spain

⁸ Instituto Universitario de Investigación en Neuroquímica, Universidad Complutense de Madrid, 28040 Madrid, Spain

* Correspondence: iqoc21@iqog.csic.es (J.M.-C.); mjaset@ucm.es (M.J.O.-G.)

† These authors have equally contributed to this work.

Received: 5 October 2020; Accepted: 21 October 2020; Published: 26 October 2020



Abstract: Herein we report the synthesis, antioxidant and neuroprotective power of homo-tris-nitrones (HTN) **1-3**, designed on the hypothesis that the incorporation of a third nitronone motif into our previously identified homo-bis-nitronone **6** (HBN6) would result in an improved and stronger neuroprotection. The neuroprotection of HTNs **1-3**, measured against oligomycin A/rotenone, showed that HTN2 was the best neuroprotective agent at a lower dose ($EC_{50} = 51.63 \pm 4.32 \mu\text{M}$), being similar in EC_{50} and maximal activity to α -phenyl-*N*-*tert*-butylnitronone (PBN) and less potent than any of HBNs **4-6**. The results of neuroprotection in an in vitro oxygen glucose deprivation model showed that HTN2 was the most powerful ($EC_{50} = 87.57 \pm 3.87 \mu\text{M}$), at lower dose, but 50-fold higher than its analogous HBN5, and ≈ 1.7 -fold less potent than PBN. HTN3 had a very good antinecrotic ($IC_{50} = 3.47 \pm 0.57 \mu\text{M}$), antiapoptotic, and antioxidant ($EC_{50} = 6.77 \pm 1.35 \mu\text{M}$) profile, very similar to that of its analogous HBN6. In spite of these results, and still being attractive neuroprotective agents, HTNs **2** and **3** do not have better neuroprotective properties than HBN6, but clearly exceed that of PBN.



Keywords: antioxidants; free radical scavengers; homo-tris-nitrones; neuroprotection; nitrones; oligomycin A/rotenone; oxygen-glucose-deprivation model; α -phenyl-*N*-*tert*-butylnitronone; synthesis

1. Introduction

Nowadays it is largely accepted that reactive oxygen species (ROS), such as $O_2^{\cdot-}$, HO^{\cdot} , HO_2^{\cdot} , are one of the main biological factors involved in the etiology of a number of pathologies such

Article

Synthesis, Neuroprotection, and Antioxidant Activity of 1,1'-Biphenylnitrones as α -Phenyl-*N*-*tert*-Butylnitronone Analogues in In Vitro Ischemia Models

Beatriz Chamorro ^{1,2,3}, David García-Vieira ², Daniel Diez-Iriepa ^{2,4}, Estíbaliz Garagarza ¹, Mourad Chioua ², Dimitra Hadjipavlou-Litina ⁵ , Francisco López-Muñoz ^{3,6}, José Marco-Contelles ^{2,*} and María Jesús Oset-Gasque ^{1,7,*} 

- ¹ Department of Biochemistry and Molecular Biology, Faculty of Pharmacy, Complutense University of Madrid, Plaza Ramón y Cajal s/n, Ciudad Universitaria, 28040 Madrid, Spain; beatricha@ucm.es (B.C.); estigara@ucm.es (E.G.)
- ² Laboratory of Medicinal Chemistry, Institute of Organic Chemistry (CSIC), Juan de la Cierva 3, 28006-Madrid, Spain; dagarc13@ucm.es (D.G.-V.); daniel.diez@uah.es (D.D.-I.); mchioua@gmail.com (M.C.)
- ³ Faculty of Health, Camilo José Cela University of Madrid (UCJC), Castillo de Alarcón 49, 28692 Villanueva de la Cañada, Spain; flopez@ucjc.es
- ⁴ Department of Organic Chemistry and Inorganic Chemistry, Alcalá University, 28805 Alcalá de Henares, Spain
- ⁵ Department of Pharmaceutical Chemistry, School of Pharmacy, Faculty of Health Sciences, Aristotle University of Thessaloniki, 54124 Thessaloniki, Greece; hadjipav@pharm.auth.gr
- ⁶ Neuropsychopharmacology Unit, "Hospital 12 de Octubre" Research Institute, Av. de Córdoba s/n, 28041 Madrid, Spain
- ⁷ Instituto Universitario de Investigación en Neuroquímica (IUIIN), Universidad Complutense de Madrid, Ciudad Universitaria, 28040 Madrid, Spain
- * Correspondence: iqoc21@iqog.csic.es (J.M.-C.); mjoset@ucm.es (M.J.O.-G.)



Citation: Chamorro, B.; García-Vieira, D.; Diez-Iriepa, D.; Garagarza, E.; Chioua, M.; Hadjipavlou-Litina, D.; López-Muñoz, F.; Marco-Contelles, J.; Oset-Gasque, M.J. Synthesis, Neuroprotection, and Antioxidant Activity of 1,1'-Biphenylnitrones as α -Phenyl-*N*-*tert*-Butylnitronone Analogues in In Vitro Ischemia Models. *Molecules* **2021**, *26*, 1127. <https://doi.org/10.3390/molecules26041127>

Academic Editor:
Diego Muñoz-Torrero

Received: 27 January 2021
Accepted: 17 February 2021
Published: 20 February 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Herein, we report the neuroprotective and antioxidant activity of 1,1'-biphenyl nitrones (**BPNs**) **1–5** as α -phenyl-*N*-*tert*-butylnitronone analogues prepared from commercially available [1,1'-biphenyl]-4-carbaldehyde and [1,1'-biphenyl]-4,4'-dicarbaldehyde. The neuroprotection of **BPNs** **1–5** has been measured against oligomycin A/rotenone and in an oxygen–glucose deprivation in vitro ischemia model in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. Our results indicate that **BPNs** **1–5** have better neuroprotective and antioxidant properties than α -phenyl-*N*-*tert*-butylnitronone (**PBN**), and they are quite similar to *N*-acetyl-L-cysteine (**NAC**), which is a well-known antioxidant agent. Among the nitrones studied, homo-bis-nitronone **BPHBN5**, bearing two *N*-*tert*-Bu radicals at the nitronone motif, has the best neuroprotective capacity ($EC_{50} = 13.16 \pm 1.65$ and 25.5 ± 3.93 μ M, against the reduction in metabolic activity induced by respiratory chain blockers and oxygen–glucose deprivation in an in vitro ischemia model, respectively) as well as anti-necrotic, anti-apoptotic, and antioxidant activities ($EC_{50} = 11.2 \pm 3.94$ μ M), which were measured by its capacity to reduce superoxide production in human neuroblastoma SH-SY5Y cell cultures, followed by mononitronone **BPMN3**, with one *N*-Bn radical, and **BPMN2**, with only one *N*-*tert*-Bu substituent. The antioxidant activity of **BPNs** **1–5** has also been analyzed for their capacity to scavenge hydroxyl free radicals (82% at 100 μ M), lipoxygenase inhibition, and the inhibition of lipid peroxidation (68% at 100 μ M). Results showed that although the number of nitronone groups improves the neuroprotection profile of these **BPNs**, the final effect is also dependent on the substituent that is being incorporated. Thus, **BPNs** bearing *N*-*tert*-Bu and *N*-Bn groups show better neuroprotective and antioxidant properties than those substituted with Me. All these results led us to propose homo-*bis*-nitronone **BPHBN5** as the most balanced and interesting nitronone based on its neuroprotective capacity in different neuronal models of oxidative stress and in vitro ischemia as well as its antioxidant activity.

Keywords: antioxidants; 1,1'-biphenyl nitrones; free radical scavengers; neuroprotection; oligomycin A/rotenone; oxygen-glucose-deprivation; α -phenyl-*N*-*tert*-butylnitronone; synthesis



Article

Nucleobase-Derived Nitrones: Synthesis and Antioxidant and Neuroprotective Activities in an In Vitro Model of Ischemia–Reperfusion

Beatriz Chamorro ^{1,2}, Iwona E. Głowacka ³ , Joanna Gotkowska ³, Rafał Gulej ³ , Dimitra Hadjipavlou-Litina ⁴ , Francisco López-Muñoz ^{2,5} , José Marco-Contelles ⁶, Dorota G. Piotrowska ^{3,*} and María Jesús Oset-Gasque ^{1,7,*}

- ¹ Department of Biochemistry and Molecular Biology, Faculty of Pharmacy, Complutense University of Madrid, Plaza Ramón y Cajal s/n, Ciudad Universitaria, 28040 Madrid, Spain; beatricha@ucm.es
- ² Faculty of Health, Camilo José Cela University, Castillo de Alarcón 49, Villanueva de la Cañada, 28692 Madrid, Spain; flopez@ucjc.edu
- ³ Bioorganic Chemistry Laboratory, Faculty of Pharmacy, Medical University of Lodz, Muszyńskiego 1, 90-151 Lodz, Poland; iwona.glowacka@umed.lodz.pl (I.E.G.); joanna.gotkowska@umed.lodz.pl (J.G.); rafalgulej@gmail.com (R.G.)
- ⁴ Department of Pharmaceutical Chemistry, School of Pharmacy, Faculty of Health Sciences, Aristotle University of Thessaloniki, 54124 Thessaloniki, Greece; hadjipav@pharm.auth.gr
- ⁵ Neuropsychopharmacology Unit, “Hospital 12 de Octubre” Research Institute, 28041 Madrid, Spain
- ⁶ Laboratory of Medicinal Chemistry, Institute of Organic Chemistry (CSIC), Juan de la Cierva 3, 28006 Madrid, Spain; jlmarco@iqog.csic.es
- ⁷ Instituto de Investigación en Neuroquímica, Universidad Complutense de Madrid, Ciudad Universitaria, 28040 Madrid, Spain
- * Correspondence: dorota.piotrowska@umed.lodz.pl (D.G.P.); mjaset@ucm.es (M.J.O.-G.); Tel.: +48-42-677-92-33 (D.G.P.); +34-1-394-1788 (M.J.O.-G.)



Citation: Chamorro, B.; Głowacka, I.E.; Gotkowska, J.; Gulej, R.; Hadjipavlou-Litina, D.; López-Muñoz, F.; Marco-Contelles, J.; Piotrowska, D.G.; Oset-Gasque, M.J. Nucleobase-Derived Nitrones: Synthesis and Antioxidant and Neuroprotective Activities in an In Vitro Model of Ischemia–Reperfusion. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 3411. <https://doi.org/10.3390/ijms23063411>

Academic Editor: Domenico Nuzzo

Received: 13 February 2022

Accepted: 18 March 2022

Published: 21 March 2022

Publisher’s Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Herein, we report the synthesis, antioxidant, and neuroprotective properties of some nucleobase-derived nitrones named **9a–i**. The neuroprotective properties of nitrones, **9a–i**, were measured against an oxygen-glucose-deprivation in vitro ischemia model using human neuroblastoma SH-SY5Y cells. Our results indicate that nitrones, **9a–i**, have better neuroprotective and antioxidant properties than α -phenyl-N-tert-butyl-nitron (**PBN**) and are similar to N-acetyl-L-cysteine (**NAC**), a well-known antioxidant and neuroprotective agent. The nitrones with the highest neuroprotective capacity were those containing purine nucleobases (nitrones **9f, g**, B = adenine, theophylline), followed by nitrones with pyrimidine nucleobases with H or F substituents at the C5 position (nitrones **9a, c**). All of these possess EC₅₀ values in the range of 1–6 μ M and maximal activities higher than 100%. However, the introduction of a methyl substituent (nitron **9b**, B = thymine) or hard halogen substituents such as Br and Cl (nitrones **9d, e**, B = 5-Br and 5-Cl uracil, respectively) worsens the neuroprotective activity of the nitron with uracil as the nucleobase (**9a**). The effects on overall metabolic cell capacity were confirmed by results on the high anti-necrotic (EC₅₀'s \approx 2–4 μ M) and antioxidant (EC₅₀'s \approx 0.4–3.5 μ M) activities of these compounds on superoxide radical production. In general, all tested nitrones were excellent inhibitors of superoxide radical production in cultured neuroblastoma cells, as well as potent hydroxyl radical scavengers that inhibit in vitro lipid peroxidation, particularly, **9c, f, g**, presenting the highest lipoxygenase inhibitory activity among the tested nitrones. Finally, the introduction of two nitron groups at **9a** and **9d** (bis-nitrones **9g, i**) did not show better neuroprotective effects than their precursor mono-nitrones. These results led us to propose nitrones containing purine (**9f, g**) and pyrimidine (**9a, c**) nucleobases as potential therapeutic agents for the treatment of cerebral ischemia and/or neurodegenerative diseases, leading us to further investigate their effects using in vivo models of these pathologies.

Keywords: antioxidants; neuroprotection; necrosis; apoptosis; oxidative stress; nucleobase-derived nitrones; brain ischemia



OPEN

Neuroprotective and antioxidant properties of new quinolylnitrones in in vitro and in vivo cerebral ischemia models

Beatriz Chamorro^{1,2}, Sara Izquierdo-Bermejo¹, Julia Serrano³, Dimitra Hadjipavlou-Litina⁴, Mourad Chioua⁵, Francisco López-Muñoz^{2,6}, José Marco-Contelles^{5,7}, Ricardo Martínez-Murillo³ & María Jesús Oset-Gasque^{1,8}✉

Cerebral ischemia is a condition affecting an increasing number of people worldwide, and the main cause of disability. Current research focuses on the search for neuroprotective drugs for its treatment, based on the molecular targets involved in the ischemic cascade. Nitrones are potent antioxidant molecules that can reduce oxidative stress. Here we report the neuroprotective properties and the antioxidant power of the six new quinolylnitrones (QNs) 1–6 for their potential application in stroke therapy. QNs 1–4 are 2-chloro-8-hydroxy-substituted QNs bearing *N*-*t*-butyl or *N*-benzyl substituents at the nitrone motif located at C3, whereas QN5 and QN6 are 8-hydroxy QNs bearing *N*-*t*-butyl or *N*-benzyl substituents at the nitrone motif located at C2, respectively. In vitro neuroprotection studies using QNs 1–6 in an oxygen-glucose-deprivation model of cerebral ischemia, in human neuroblastoma cell cultures, indicate that all QNs have promising neuroprotective, anti-necrotic, anti-apoptotic, and anti-oxidant properties against experimental ischemia–reperfusion in neuronal cultures. QN6 stands out as the most balanced nitrone out of all tested QNs, as it strongly prevents decreased neuronal metabolic activity ($EC_{50} = 3.97 \pm 0.78 \mu\text{M}$), as well as necrotic ($EC_{50} = 3.79 \pm 0.83 \mu\text{M}$) and apoptotic cell death ($EC_{50} = 3.99 \pm 0.21 \mu\text{M}$). QN6 showed high capacity to decrease superoxide production ($EC_{50} = 3.94 \pm 0.76 \mu\text{M}$), similar to its parent molecule α -phenyl-*tert*-butyl nitrone (PBN) and the well-known anti-oxidant molecule *N*-acetyl-L-cysteine (NAC). Thus, QN6 demonstrated the highest antioxidant power out of the other tested QNs. Finally, in vivo treatment with QN6 in an experimental permanent stroke model elicited a significant reduction ($75.21 \pm 5.31\%$) of the volume size of brain lesion. Overall, QN6 is a potential agent for the therapy of cerebral ischemia that should be further investigated.

Abbreviations

AAPH	2,2'-Azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride
BBB	Blood–brain barrier
DHE	Dihydroethidium
DPPH	1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl radical
hBuChE	Human butyrylcholinesterase
hMAO-B	Human monoamine oxidase B
ILPO	Inhibition of lipid peroxidation

¹Department of Biochemistry and Molecular Biology, Faculty of Pharmacy, Complutense University of Madrid, Plaza Ramón y Cajal s/n, Ciudad Universitaria, 28040 Madrid, Spain. ²Faculty of Health, Camilo José Cela University, Villanueva de la Cañada, Madrid, Spain. ³Neurovascular Research Group, Department of Translational Neurobiology, Cajal Institute (CSIC), Madrid, Spain. ⁴Department of Pharmaceutical Chemistry, School of Pharmacy, Faculty of Health Sciences, Aristotle University of Thessaloniki, 54124 Thessaloniki, Greece. ⁵Laboratory of Medicinal Chemistry, Institute of Organic Chemistry (CSIC), C/ Juan de la Cierva 3, 28006 Madrid, Spain. ⁶Neuropsychopharmacology Unit, “Hospital 12 de Octubre” Research Institute, Madrid, Spain. ⁷Center for Biomedical Network Research on Rare Diseases (CIBERER), CIBER, ISCIII, Madrid, Spain. ⁸Instituto de Investigación en Neuroquímica, Universidad Complutense de Madrid, Ciudad Universitaria, 28040 Madrid, Spain. ✉email: mjaset@ucm.es



Article

Neuroprotective and Antioxidant Properties of Cholesterone Nitronone ChN2 and QuinolylNitronone QN23 in an Experimental Model of Cerebral Ischemia: Involvement of Necrotic and Apoptotic Cell Death

Beatriz Chamorro ^{1,2,†}, Sara Izquierdo-Bermejo ^{1,†}, María Dolores Martín-de-Saavedra ^{1,3} , Francisco López-Muñoz ^{2,4} , Mourad Chioua ⁵, José Marco-Contelles ^{5,6} and María Jesús Oset-Gasque ^{1,3,*}

¹ Department of Biochemistry and Molecular Biology, Faculty of Pharmacy, Complutense University of Madrid, Plaza Ramón y Cajal s/n, Ciudad Universitaria, 28040 Madrid, Spain; beatricha@ucm.es (B.C.); sizqui03@ucm.es (S.I.-B.); marmar68@ucm.es (M.D.M.-d.-S.)

² Faculty of Health, Camilo José Cela University, Villanueva de la Cañada, 28692 Madrid, Spain; flopez@ucjc.edu

³ Instituto Universitario de Investigación en Neuroquímica, Complutense University of Madrid, Ciudad Universitaria, 28040 Madrid, Spain

⁴ Neuropsychopharmacology Unit, "Hospital 12 de Octubre" Research Institute, 28041 Madrid, Spain

⁵ Laboratory of Medicinal Chemistry, Institute of Organic Chemistry (CSIC), C/Juan de la Cierva 3, 28006 Madrid, Spain; mchioua@gmail.com (M.C.); jlmarco@iqog.csic.es (J.M.-C.)

⁶ Center for Biomedical Network Research on Rare Diseases (CIBERER), Carlos III Health Institute (ISCIII), 28029 Madrid, Spain

* Correspondence: mjaset@ucm.es; Tel.: +34-1-394-1788

† These authors contributed equally to this work.



Citation: Chamorro, B.; Izquierdo-Bermejo, S.; Martín-de-Saavedra, M.D.; López-Muñoz, F.; Chioua, M.; Marco-Contelles, J.; Oset-Gasque, M.J. Neuroprotective and Antioxidant Properties of Cholesterone Nitronone ChN2 and QuinolylNitronone QN23 in an Experimental Model of Cerebral Ischemia: Involvement of Necrotic and Apoptotic Cell Death. *Antioxidants* **2023**, *12*, 1364. <https://doi.org/10.3390/antiox12071364>

Academic Editor: Stanley Omaye

Received: 19 May 2023

Revised: 26 June 2023

Accepted: 27 June 2023

Published: 29 June 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Ischemic stroke is the leading cause of disability and the second leading cause of death worldwide. However, current therapeutic strategies are scarce and of limited efficacy. The abundance of information available on the molecular pathophysiology of ischemic stroke has sparked considerable interest in developing new neuroprotective agents that can target different events of the ischemic cascade and may be used in combination with existing treatments. In this regard, nitrones represent a very promising alternative due to their renowned antioxidant and anti-inflammatory effects. In this study, we aimed to further investigate the neuroprotective effects of two nitrones, cholesteronitronone 2 (ChN2) and quinolylnitronone 23 (QN23), which have previously shown great potential for the treatment of stroke. Using an experimental in vitro model of cerebral ischemia, we compared their anti-necrotic, anti-apoptotic, and antioxidant properties with those of three reference compounds. Both ChN2 and QN23 demonstrated significant neuroprotective effects ($EC_{50} = 0.66 \pm 0.23 \mu\text{M}$ and $EC_{50} = 2.13 \pm 0.47 \mu\text{M}$, respectively) comparable to those of homo-bis-nitronone 6 (HBN6) and N-acetylcysteine (NAC) and superior to those of α -phenyl-N-tert-butyl nitronone (PBN). While primarily derived from the nitrones' anti-necrotic capacities, their anti-apoptotic effects at high concentrations and antioxidant powers—especially in the case of QN23—also contribute to their neuroprotective effects.

Keywords: cerebral ischemia; neuroprotection; nitrones; oxidative stress; stroke; therapeutic agents

1. Introduction

Stroke is a medical condition caused by the disruption of blood flow to one or several brain regions [1]. It is currently the leading cause of disability and the second leading cause of death worldwide [2]. Its incidence rate continues to grow, driven by the increase in life expectancy in developed countries [3] and the accumulation of risk factors in increasingly younger populations [1,4].

