



**Universitat Autònoma  
de Barcelona**

Departamento de Farmacología, de Terapéutica y de Toxicología

**INFLUENCIA DEL PEROXINITRITO EN  
LOS CAMBIOS VASCULARES  
OBSERVADOS TRAS LA ISQUEMIA  
CEREBRAL FOCAL EN RATA**

TESIS DOCTORAL 2016

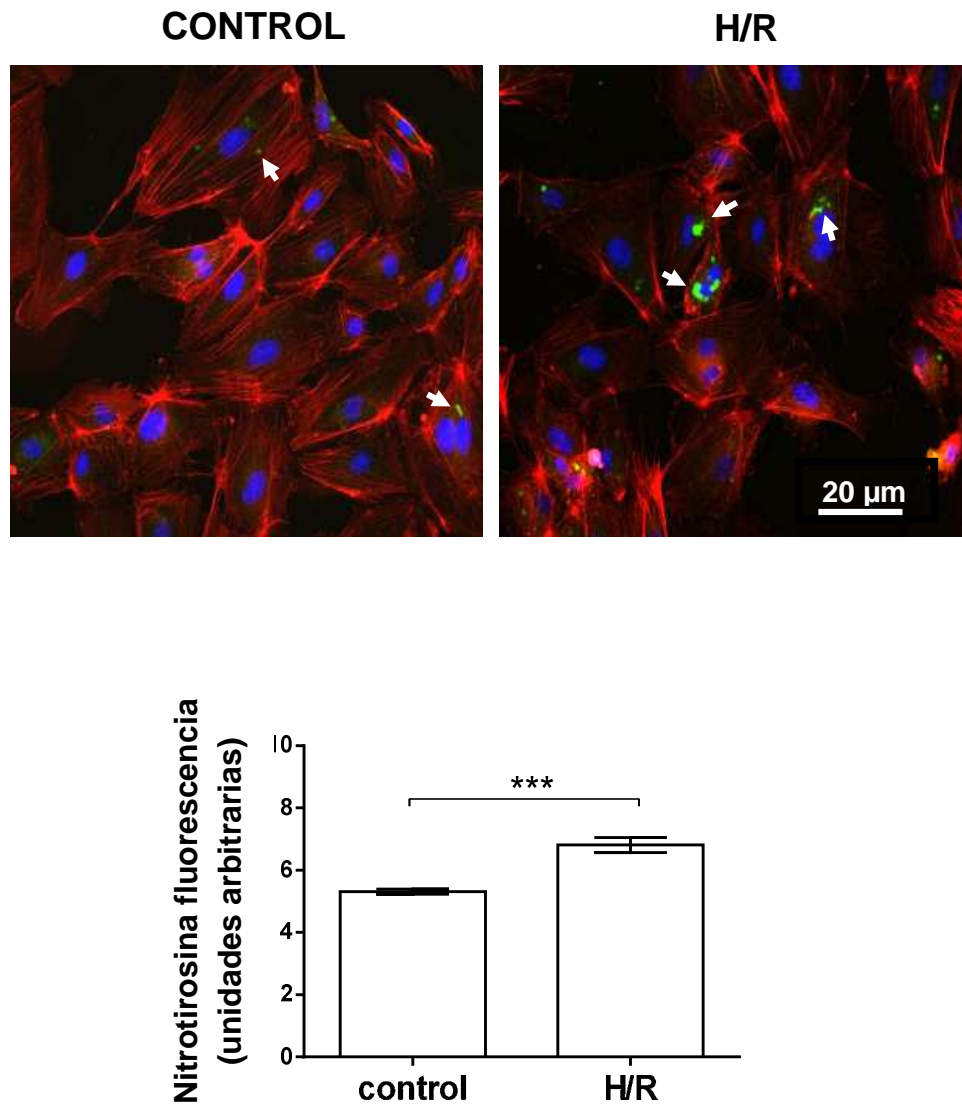
Yara Onetti Vilalta

**CAPÍTULO II. Participación del peroxinitrito en la relajación de la  
arteria cerebral media tras la isquemia cerebral focal**

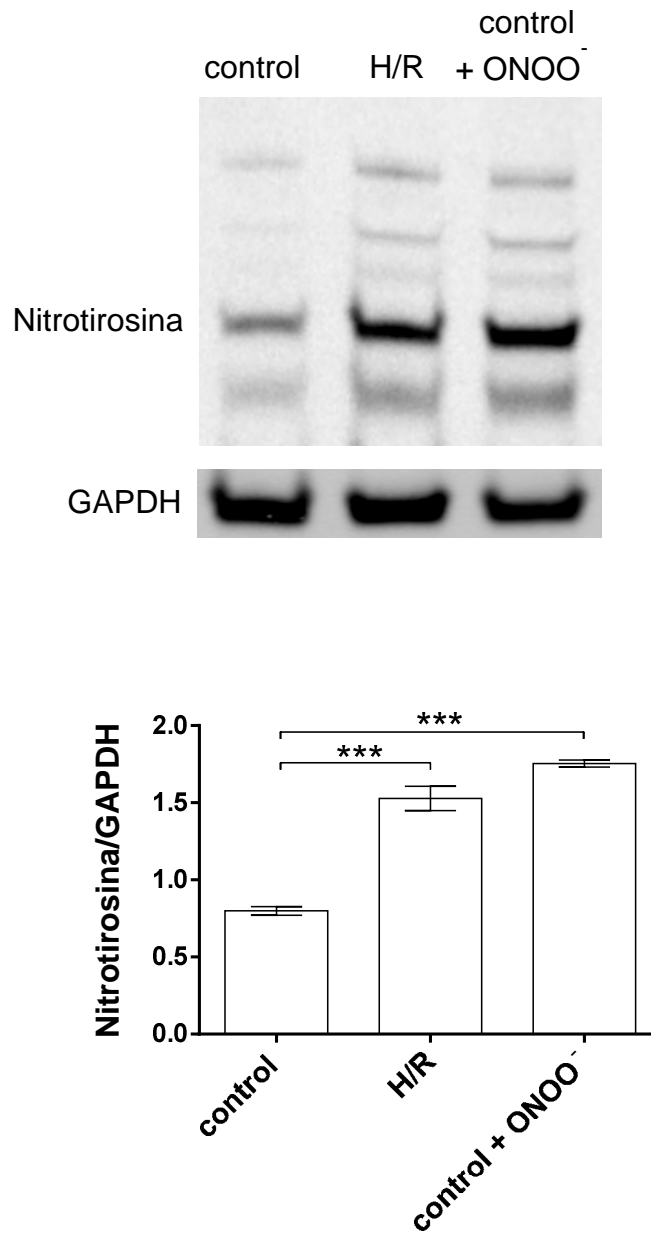


## 1. IMPACTO DE LA I/R Y LA EXPOSICIÓN A ONOO<sup>-</sup> SOBRE LA NITROSILACIÓN ENDOTELIAL

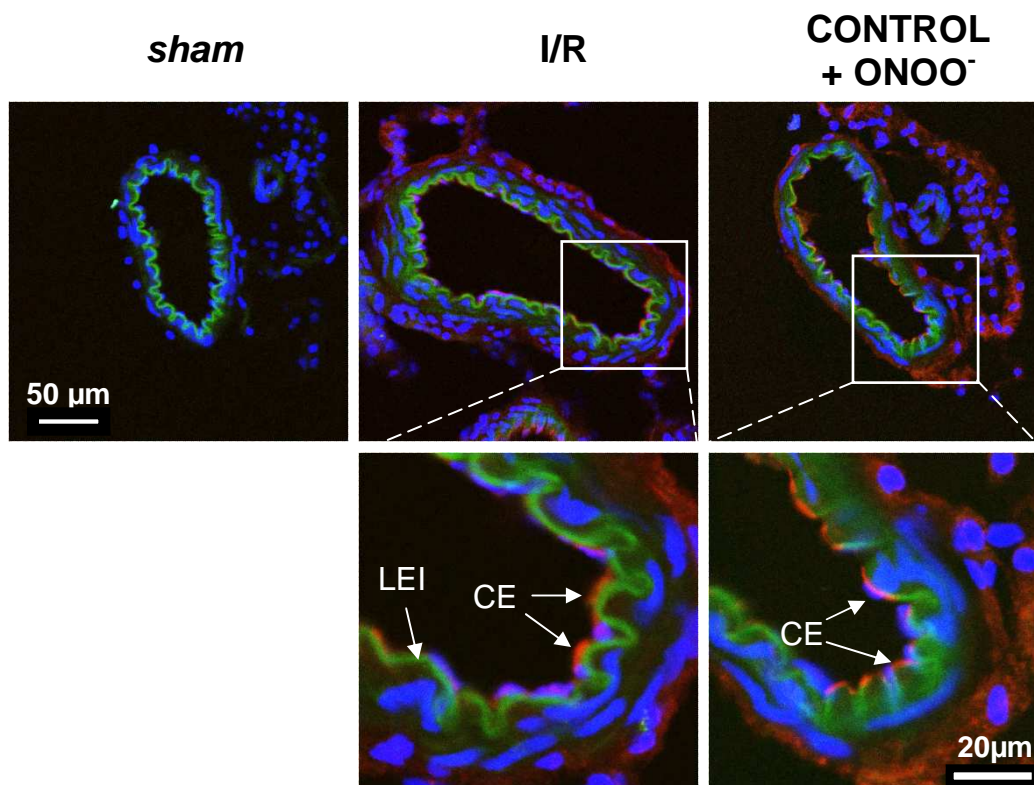
Tras episodios de I/R (Coucha y cols., 2013), así como después de la administración exógena de ONOO<sup>-</sup> (Mannen y Cipolla, 2007), se ha observado aumentos en la nitrosilación de la actina filamentosa (F-actina) muscular en arterias cerebrales. En el presente estudio, células endoteliales obtenidas de microvasos humanos (HMVEC) expuestas toda la noche a hipoxia seguida de 24 h de reoxigenación (H/R) mostraron un aumento ( $P < 0.001$ ) tanto en la expresión inmunofluorescente (Figura 45) como en los niveles de expresión proteica (Figura 46) de nitrotirosina, estos últimos comparables a los niveles obtenidos de HMVEC expuestas a ONOO<sup>-</sup> (Figura 46). En ACM se encontró una débil señal fluorescente a nitrotirosina en las ratas no operadas (control; Figura 47); en cambio, tanto la I/R como la incubación exógena con ONOO<sup>-</sup> en arterias control indujeron nitrosilación proteica en las tres tunicas arteriales, como puede observarse por el aumento de fluorescencia.



**Figura 45.** Imágenes representativas y cuantificación de la señal fluorescente de nitrotirosina (verde) en células HMVEC control y expuestas a H/R. F-actina y núcleos teñidos en rojo y en azul, respectivamente. Las flechas señalan zonas de alta fluorescencia a nitrotirosina. Los resultados están expresados como media  $\pm$  e.s.m de 6 experimentos independientes; \*\*\* $P < 0.001$  mediante  $t$  de Student.



**Figura 46.** Blot representativo y análisis densitométrico de los niveles de expresión proteica de nitrotirosina en células HMVEC control, expuestas a H/R o incubadas con ONOO<sup>-</sup>. También se muestra la expresión de GAPDH total como control de carga. Los resultados están expresados como media ± e.s.m de 6 experimentos independientes; \*\*\*  $P < 0.001$  mediante ANOVA de una vía seguida del test de Tukey.



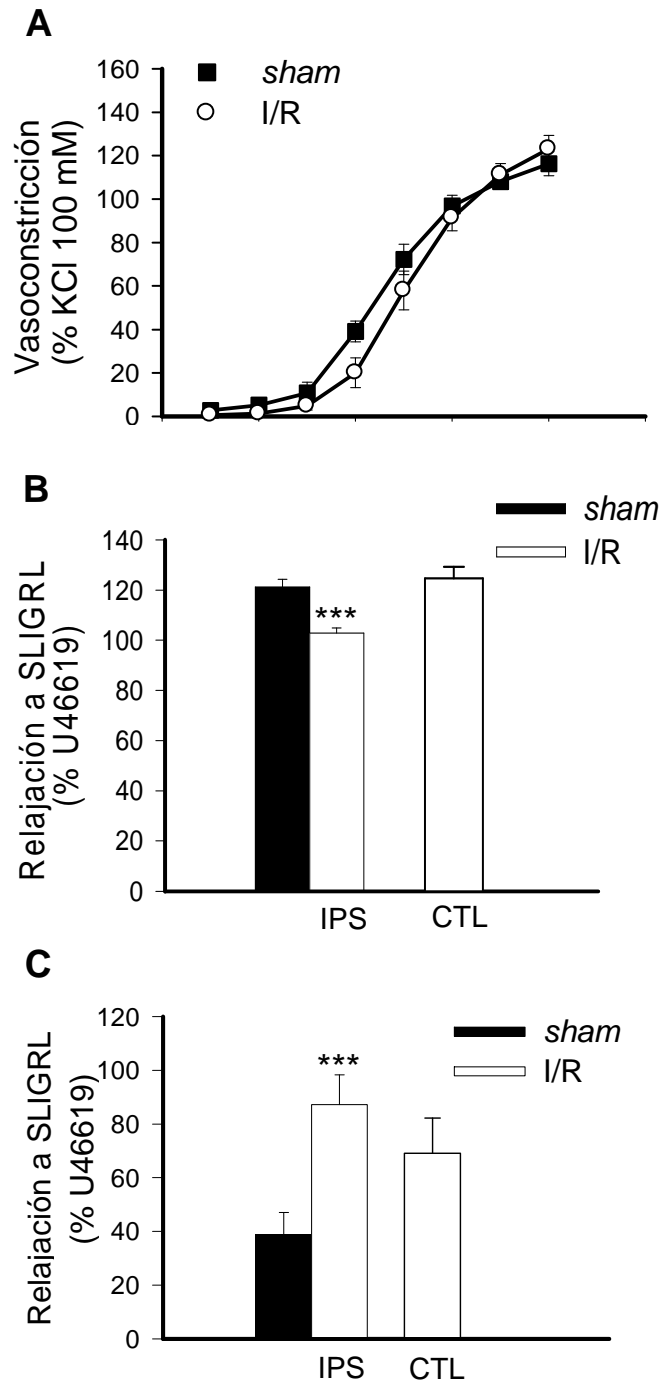
**Figura 47.** Imágenes representativas de la señal fluorescente a nitrotirosina (rojo) en secciones transversales de ACM de ratas *sham*, isquémicas y control, estas últimas arterias incubadas con  $\text{ONOO}^-$ . CE: células endoteliales; LEI: lámina elástica interna (autofluorescencia en verde); núcleos teñidos en azul.  $n = 3$  por grupo. Dimensiones de la imagen  $238 \times 238 \mu\text{m}$ .

## 2. INFLUENCIA DE LA I/R SOBRE LA RELAJACIÓN DE LA ACM

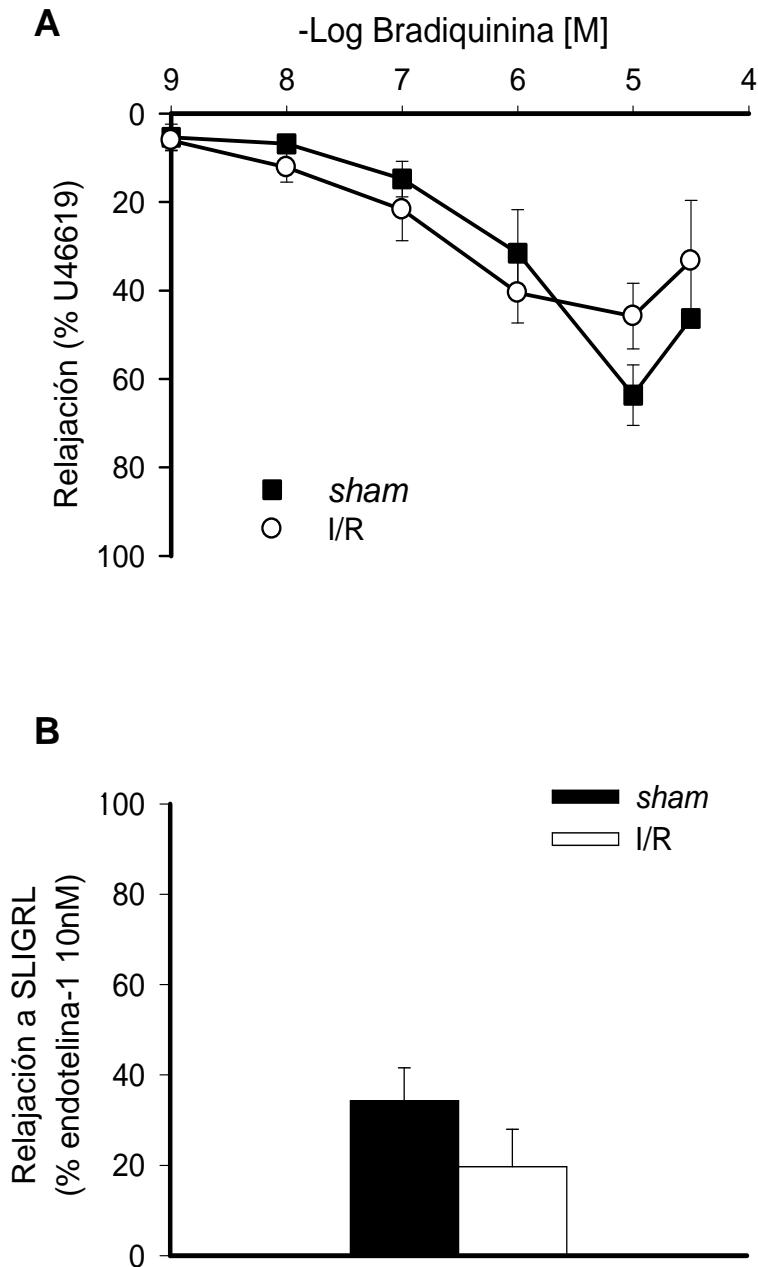
El análogo estable del tromboxano  $\text{A}_2$  U46619 ( $30 \text{ nM}$ - $1 \mu\text{M}$ ) contrajo de forma concentración-dependiente la ACM sin que dicha respuesta fuese alterada por la I/R (Figura 48A). El agonista de los receptores PAR2 SLIGRL ( $20 \mu\text{M}$ ) indujo una relajación, dependiente de endotelio, en arterias precontraídas con U46619 ( $30$ - $100 \text{ nM}$ ;  $60$ - $80\%$  de la contracción con KCl) que disminuyó ( $P < 0.001$ ) en la ACM ipsilateral de ratas isquémicas (Figura 48B).

Para analizar la influencia de la I/R sobre la relajación mediada únicamente por la hiperpolarización derivada del endotelio (EDH), se estudió la vasodilatación inducida por SLIGRL en arterias precontraídas con U46619, inhibiendo la vía de la NOS y la de la COX. Para ello, se preincubaron las arterias con L-NAME (300  $\mu$ M), inhibidor no selectivo de la NOS, e indometacina (10  $\mu$ M), inhibidor inespecífico de la COX. En estas condiciones, la relajación por EDH inducida por SLIGRL fue mayor ( $P < 0.001$ ) en ACM ipsilateral de ratas isquémicas que en arterias del grupo *sham* (Figura 48C y 51A), mientras que en la ACM contralateral sólo se observó una ligera tendencia a incrementar dicha respuesta vasodilatadora. Por este motivo, a partir de este punto del estudio todos los experimentos funcionales que implicaron la utilización de animales isquémicos se realizaron en ACM ipsilateral. La bradiquinina (1 nM- 30  $\mu$ M), en presencia de L-NAME e indometacina, indujo una vasodilatación concentración-dependiente similar en la ACM ipsilateral, precontraída con U46619, de ratas *sham* y sometidas a I/R (Figura 49A). Además, en ACM ipsilateral precontraída con endotelina-1 (10 mM), la relajación por EDH inducida por SLIGRL también fue similar en ambos grupos (Figura 49B). Estos resultados sugieren que el incremento de las respuestas de EDH observado tras la I/R se manifiesta únicamente cuando la ACM ipsilateral se precontrae con U46619 y se relaja con SLIGRL.





**Figura 48.** Influencia de la I/R en ACM de ratas *sham* e isquémicas sobre las respuestas contráctiles concentración-dependientes a U46619 (A) y vasodilatadoras a SLIGRL en arterias precontraídas con U46619 (B y C), en ausencia (A y B) y en presencia (C) de L-NAME e indometacina. IPS: arteria ipsilateral; CTL: arteria contralateral. Los resultados están expresados como media  $\pm$  e.s.m de ACM *sham* ( $n = 19-24$ ) e I/R (IPS:  $n = 10-15$ ; CTL:  $n = 9-12$ ); \*\*\* $P < 0.001$  vs. *sham* mediante ANOVA de dos vías seguido del test de Tukey.

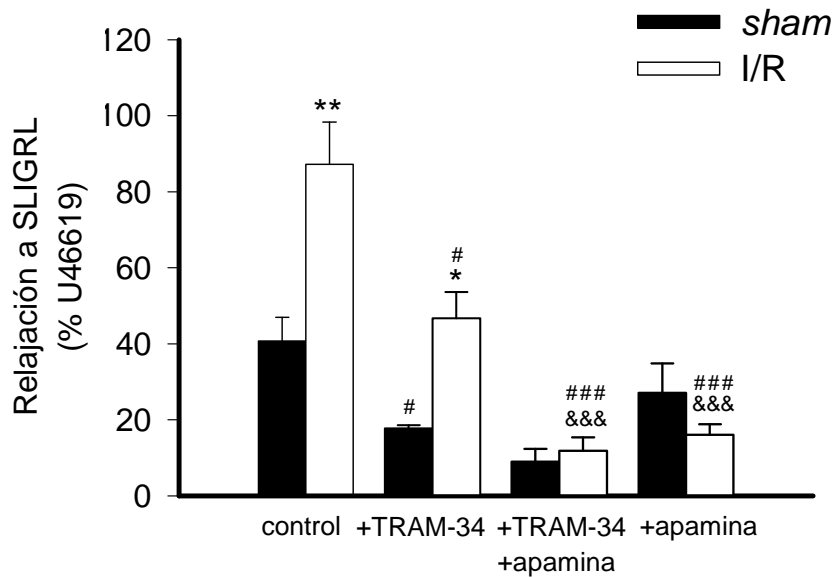


**Figura 49.** Influencia de la I/R sobre la relajación de la ACM ipsilateral de ratas *sham* e isquémicas, inducida por bradiquinina (A) y SLIGRL (B) en arterias precontraídas con U46619 (A) y endotelina-1 (B) en presencia de L-NAME e indometacina. Los resultados están expresados como media  $\pm$  e.s.m de ACM *sham* ( $n = 6-5$ ) e I/R ( $n = 5$ ).

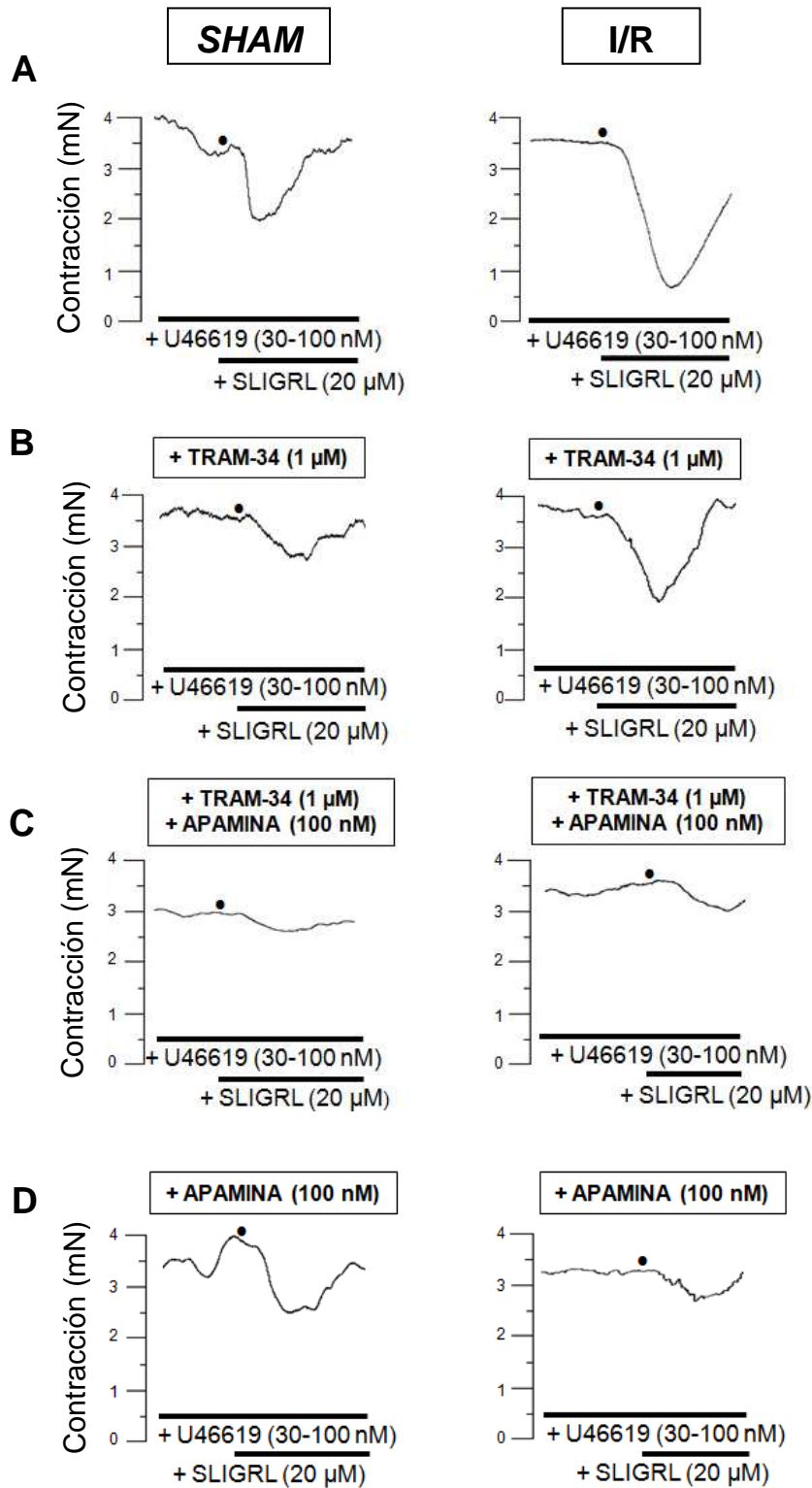
### 3. EFECTO DE LOS INHIBIDORES DE LOS CANALES DE $K_{Ca}$ SOBRE LA VASORRELAJACIÓN MEDIADA POR EDH TRAS LA I/R

Para determinar si el aumento de la relajación por EDH observado tras I/R (Figura 48C) podría estar relacionado con la activación de los canales de  $K_{Ca}$ , se estudió la relajación a SLIGRL, en arterias precontraídas con U46619, en ausencia o en presencia de inhibidores de los distintos subtipos de canales  $K_{Ca}$ . La incubación con TRAM-34 (1  $\mu$ M), inhibidor de los canales  $IK_{Ca}$ , disminuyó ( $P < 0.05$ ) la relajación por EDH inducida por SLIGRL (20  $\mu$ M), tanto en arterias de animales isquémicos como *sham* ( $P < 0.05$ ) (Figura 50 y 51B). No obstante, la relajación por EDH en presencia de TRAM-34 se mantuvo superior ( $P < 0.05$ ) en los animales del grupo isquémico. La incubación adicional con apamina (100 nM), inhibidor de los canales  $SK_{Ca}$ , junto con TRAM-34 (1  $\mu$ M) sólo consiguió reducir ( $P < 0.001$ ) la respuesta a SLIGRL en ratas isquémicas, eliminando de ese modo las diferencias con el grupo *sham* (Figura 50 y 51C). Además, la apamina *per se* redujo significativamente ( $P < 0.001$ ) la relajación en el grupo isquémico, sin modificarla en los animales *sham* (Figura 50 y 51D). La administración conjunta de apamina (100 nM) y caribdotoxina (100 nM), este último inhibidor de los canales  $IK_{Ca}$  y  $BK_{Ca}$ , suprimió completamente la relajación mediada por EDH.

En conjunto, estos resultados sugieren que el aumento de la relajación por EDH en ACM precontraída con U46619 observado tras la I/R se debería a un incremento en la participación de los canales  $SK_{Ca}$  en dicha relajación.



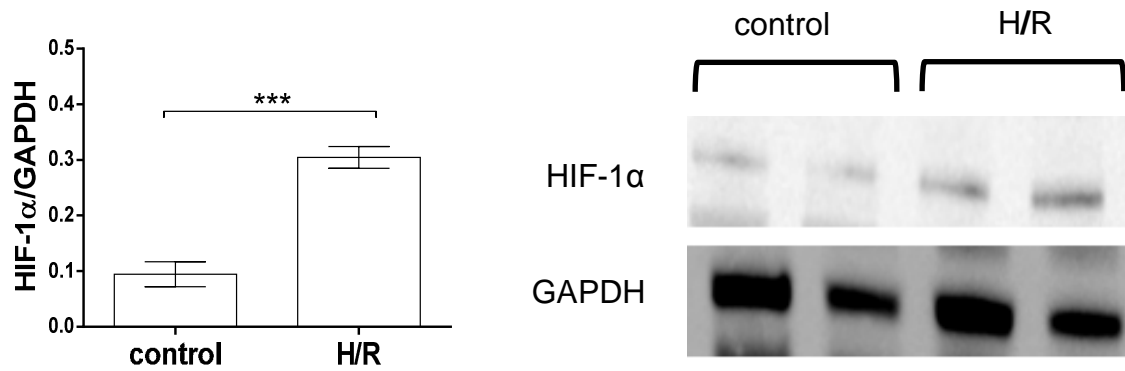
**Figura 50.** Influencia de la I/R sobre la relajación a SLIGRL en ACM precontraídas con U46619, en ausencia o en presencia de TRAM-34 y apamina. Todos los experimentos se realizaron en presencia de L-NAME e indometacina. Los resultados están expresados como media  $\pm$  e.s.m de ACM *sham* ( $n = 5-9$ ) e I/R ( $n = 3-9$ ); \* $P < 0.05$  y \*\* $P < 0.01$  vs. *sham* del mismo grupo experimental, # $P < 0.05$  y ### $P < 0.001$  vs. su propio control, &&& $P < 0.001$  vs I/R +TRAM-34 mediante ANOVA de dos vías seguido del test de Tukey.



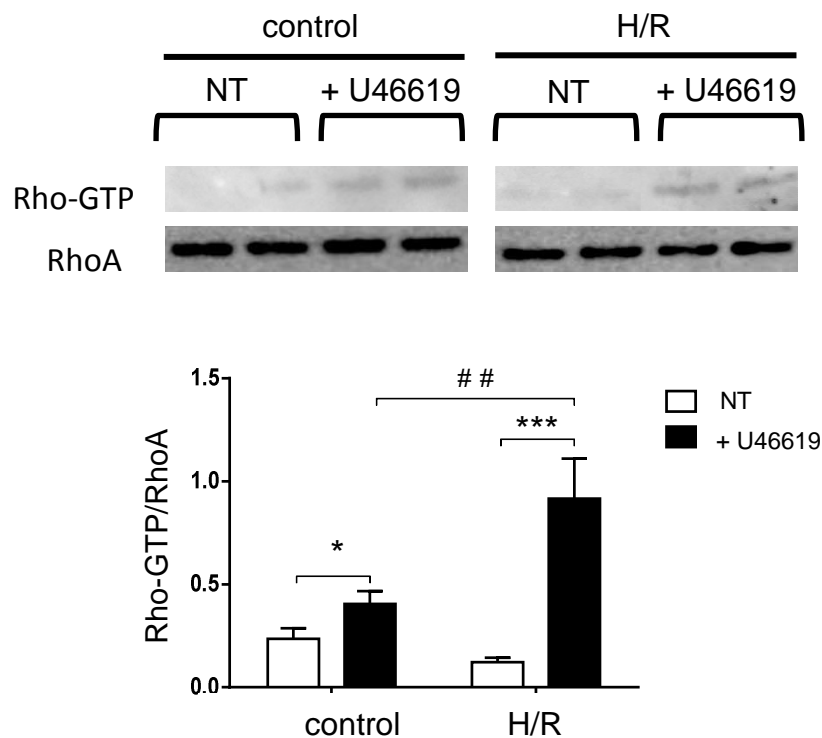
**Figura 51.** Registros representativos de la relajación a SLIGRL en ACM, de ratas sham e isquémicas, precontraídas con U46619 en ausencia (A) o en presencia de TRAM-34 (B, C,) y apamina (C, D). Todos los experimentos se realizaron en presencia de L-NAME e indometacina. El punto indica la incorporación de SLIGRL.

#### 4. EFECTO DE LA H/R SOBRE LA ACTIVACIÓN DE LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN DE LA RHO QUINASA EN CÉLULAS HMVEC

Para estudiar el impacto de la H/R sobre la activación de la vía de señalización de la RhoA/Rho quinasa utilizamos células HMVEC. La expresión de HIF-1 $\alpha$ , proteína que se expresa en condiciones de hipoxia celular (Ratcliffe, 2013), aumentó ( $P < 0.001$ ) en células expuestas a H/R en comparación con las sometidas a condiciones de oxigenación normales (control), validando el modelo de H/R en células endoteliales (Figura 52). A continuación, analizamos los niveles de expresión proteica de RhoA unida a GTP como medida de la activación de dicha proteína en células control y expuestas a H/R (Figura 53). La incubación con U46619 (100 nM, 15 min) incrementó los niveles de expresión de Rho-GTP tanto en condiciones control ( $P < 0.05$ ) como tras la H/R ( $P < 0.001$ ), sugiriendo una mayor activación del sistema RhoA/Rho en presencia de U46619. Además, el hecho de que los niveles de expresión de Rho-GTP inducidos por U46619 tras la H/R fuesen superiores ( $P < 0.01$ ) a los observados en el grupo control indicaría una mayor activación de RhoA/Rho asociada a la H/R.



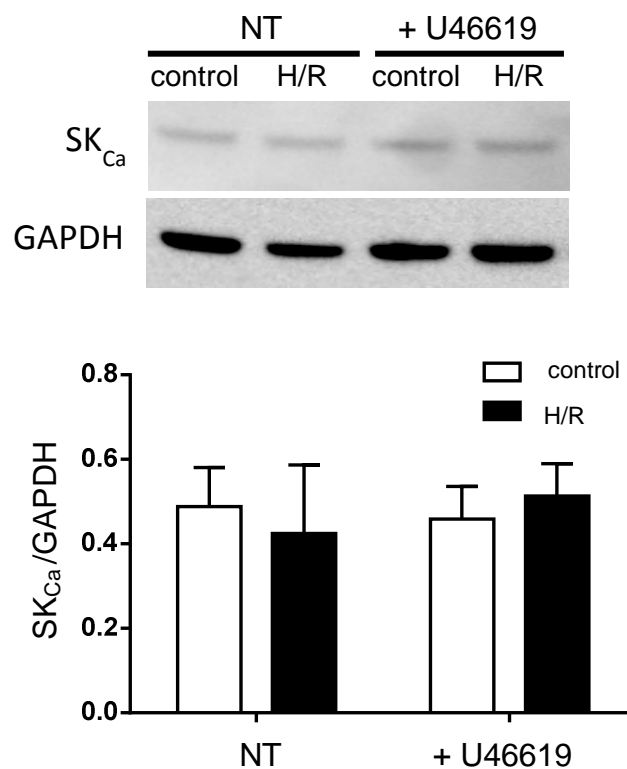
**Figura 52.** Blot representativo y análisis densitométrico de la expresión proteica de HIF-1α en células HMVEC control y expuestas a H/R. También se muestra la expresión de GAPDH total como control de carga. Los resultados están expresados como media ± e.s.m de 6 experimentos independientes; \*\*\* $P < 0.001$  mediante  $t$  de Student.



**Figura 53.** Blot representativo y análisis densitométrico de la expresión proteica de Rho-GTP y RhoA total en células HMVEC control y expuestas a H/R, en ausencia (NT) o en presencia de U46619. Los resultados están expresados como media ± e.s.m de 6 experimentos independientes; \* $P < 0.05$ , ## $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ , mediante ANOVA de dos vías seguida del test de Tukey.

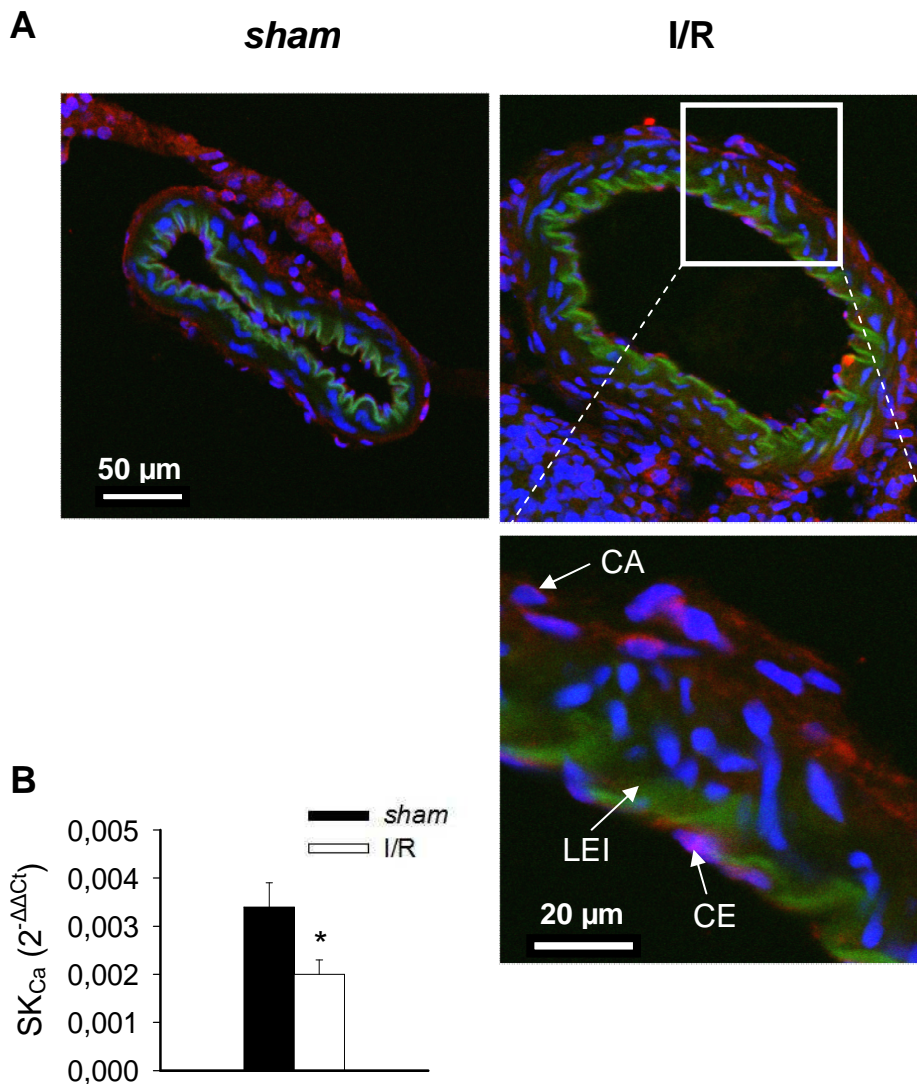
## 5. INFLUENCIA DE LA I/R SOBRE LA EXPRESIÓN VASCULAR DE LOS CANALES SK<sub>Ca</sub>

En primer lugar, se analizó la expresión proteica de los canales SK<sub>Ca</sub> en células HMVEC sometidas o no a H/R, en ausencia y en presencia de U46619 (100 nM, 15 min), obteniéndose valores similares en todos los grupos experimentales (Figura 54). Por otro lado, cuando se analizó la expresión fluorescente (Figura 55A) y los niveles de ARNm (Figura 55B) de los canales SK<sub>Ca</sub> en ACM de ratas *sham* y sometidas a I/R, los niveles de ARNm fueron menores ( $P < 0.05$ ) tras la I/R, mientras que la señal fluorescente a SK<sub>Ca</sub>, localizada en el endotelio y en la capa adventicia, no se modificó (Figura 55A).



**Figura 54.** Blot representativo y análisis densitométrico de la expresión proteica de los canales SK<sub>Ca</sub> en células HMVEC control y expuestas a H/R, en ausencia (NT) o en presencia de U46619. También se muestra la expresión de GAPDH total como control de carga. Los resultados están expresados como media ± e.s.m de 6 experimentos independientes.





**Figura 55.** A: Imágenes representativas de la señal fluorescente de los canales SK<sub>Ca</sub> en secciones transversales de ACM de ratas *sham* e isquémicas y B: Análisis comparativo de los niveles de ARNm de los canales SK<sub>Ca</sub>. CA: células adventicias; CE: células endoteliales; LEI: lámina elástica interna (autofluorescencia en verde); núcleos teñidos en azul. Los niveles de ARNm se expresaron con  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  utilizando la subunidad ribosomal 18S como control interno. Dimensiones de la imagen 238 x 238 µm. Los resultados están expresados como media ± e.s.m. de ACM *sham* (n=4) e I/R (n=4); \* $P < 0.05$  vs. *sham* mediante *t* de Student.

## 6. IMPACTO DE LA DESESTRUCTURACIÓN DE LA F-ACTINA ENDOTELIAL SOBRE LA VASORRELAJACIÓN MEDIADA POR EDH

Partiendo de evidencias previas que demuestran que la activación de la Rho quinasa, tras la estimulación de los receptores de TP, está asociada a la inhibición de la función de los canales SK<sub>Ca</sub> endoteliales (McNeish y cols., 2012), y que a su vez está implicada en la reorganización dinámica del citoesqueleto de actina (Gorovoy y cols., 2005; Prasain y Stevens, 2009), evaluamos la influencia de diferentes agentes que alteran el citoesqueleto de actina a concentraciones que preservaban la precontracción con U46619 (resultados no mostrados).

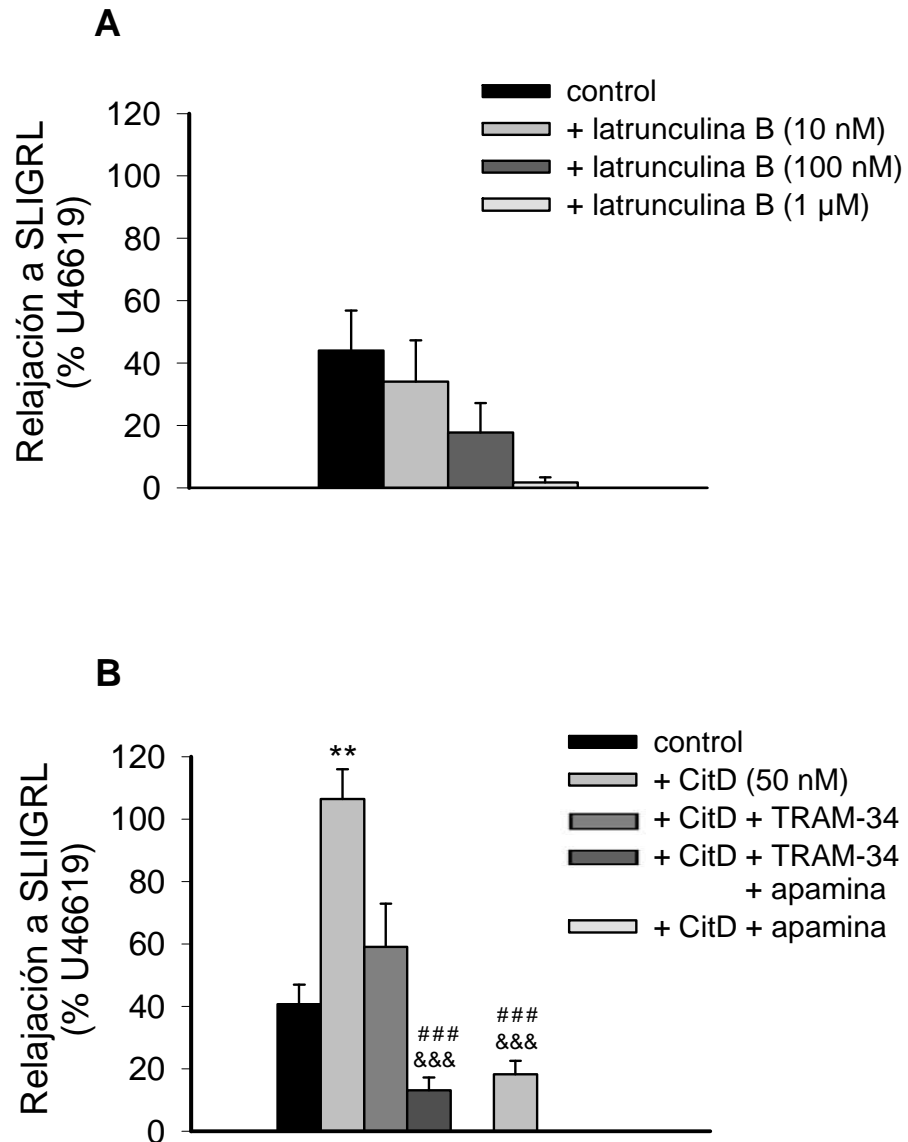
En primer lugar, analizamos el efecto de la latrunculina B (10 nM, 100 nM y 1  $\mu$ M), inhibidor de la polimerización de los monómeros de G-actina que impide la formación de F-actina (Spector y cols., 1989), sobre la relajación mediada por EDH (Figura 56A). Para ello, utilizamos arterias de ratas no operadas (control) que en estudios preliminares presentaron respuestas de EDH similares a las de los animales *sham*. La presencia de latrunculina B indujo una disminución (ANOVA de una vía;  $P < 0.05$ ) concentración-dependiente de dicha respuesta (Figura 56A).

Por otro lado, evaluamos el efecto de la citocalasina D, agente que impide la polimerización de los extremos de los filamentos de actina. La concentración de fármaco utilizada en nuestro estudio (50 mM) no modificó el tono basal (resultados no mostrados). Sin embargo, la citocalasina D aumentó ( $P < 0.01$ ) la relajación por EDH en arterias precontraídas con U46619 (Figura 54B). Además, la presencia conjunta de TRAM-34 (1  $\mu$ M) y apamina (100 nM), o de apamina sola, pero no de TRAM-34 en solitario, redujo significativamente

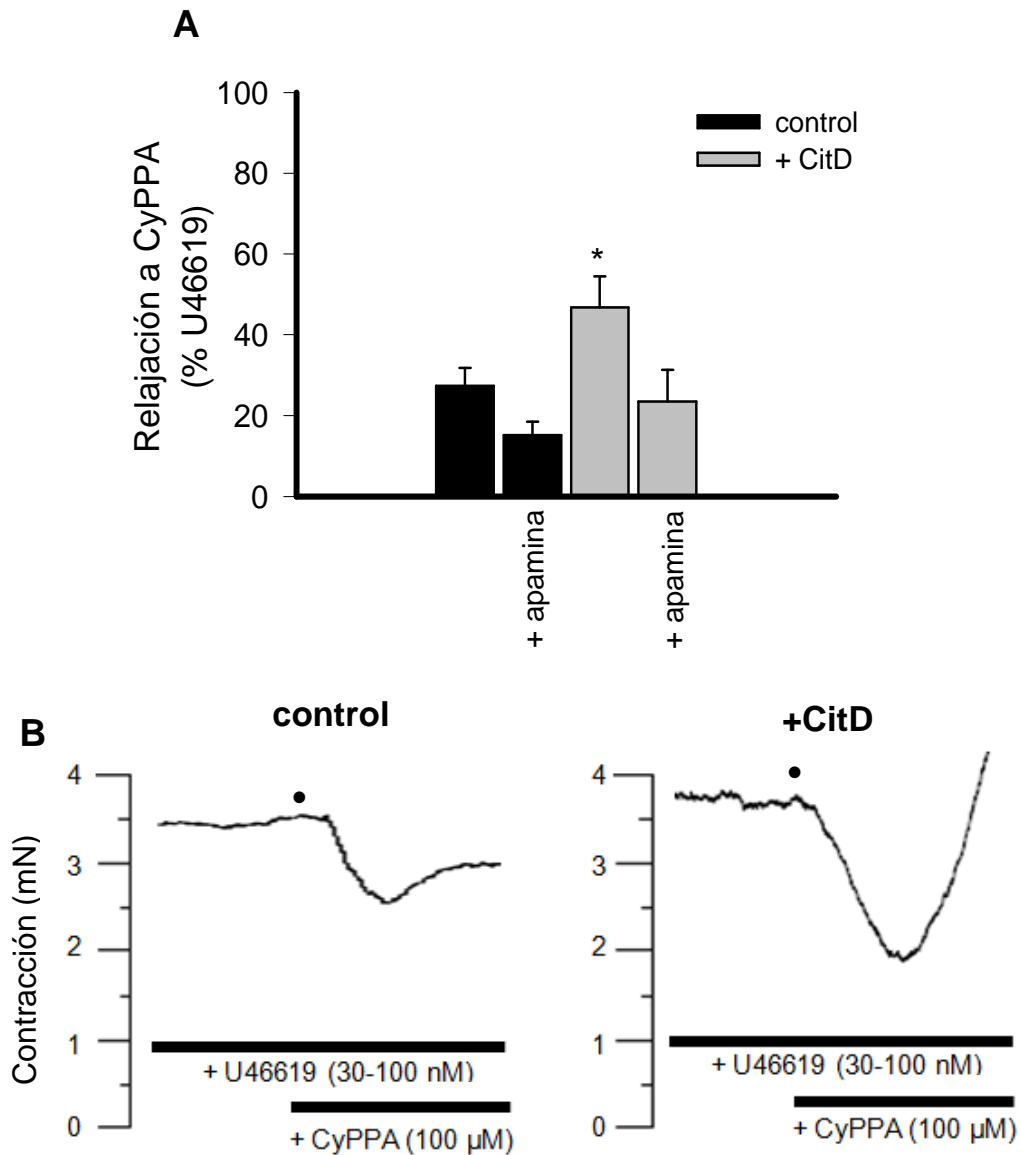
( $P < 0.001$ ) la relajación a SLIGRL en presencia de citocalasina D, indicando la recuperación de la participación de los canales  $SK_{Ca}$  en la relajación por EDH.

Esta observación se confirmó al analizar la relajación inducida por CyPPA, activador selectivo de los canales  $SK_{Ca}$  (100  $\mu$ M; Hougaard y cols., 2007), el cual indujo una mayor relajación ( $P < 0.05$ ) en aquellas ACM, precontraídas con U46619, incubadas con citocalasina D (Figura 57).

En conjunto, estos resultados sugieren que uno de los mecanismos por los cuales la estimulación de los receptores de TP bloquearía la relajación mediada por EDH inducida por los canales  $SK_{Ca}$ , podría ser a través del citoesqueleto de actina endotelial.



**Figura 56.** Efecto de la latrunculina B (A) y de la citocalasina D (CitD; B) sobre la relajación a SLIGRL en ACM, precontraída con U46619, de ratas control. Todos los experimentos se realizaron en presencia de L-NAME e indometacina. Los resultados están expresados como media  $\pm$  e.s.m de ACM control ( $n = 6-15$ ), + latrunculina B ( $n = 3-10$ ) y + CitD ( $n = 5-10$ ); \*\* $P < 0.01$  vs. control, ### $P < 0.05$  vs. CitD, &&& $P < 0.001$  vs. CitD + TRAM-34 mediante ANOVA de una vía seguido del test de Tukey.



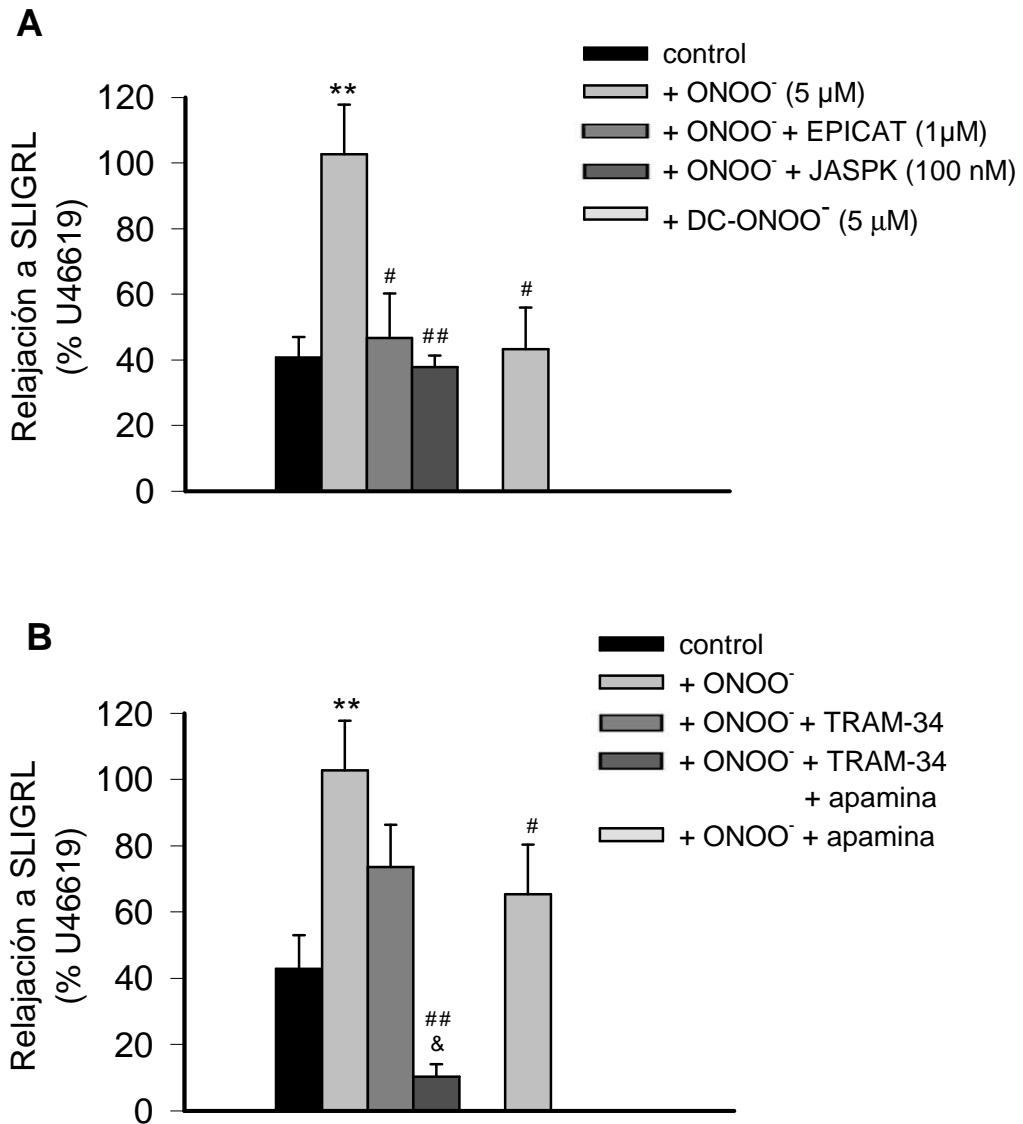
**Figura 57.** Efecto de la citocalasina D (CitD) sobre la relajación a CyPPA en ACM, precontraídas con U46619, de ratas control. Todos los experimentos se realizaron en presencia de L-NAME e indometacina. A: cuantificación; B: registros representativos; el punto indica la incorporación de SLIGRL. Los resultados están expresados como media  $\pm$  e.s.m de ACM control ( $n = 6-15$ ) y + CitD ( $n = 7-9$ ); \* $P < 0.05$  vs. control, mediante ANOVA de una vía seguido del test de Tukey.

## 7. IMPACTO DEL ONOO<sup>-</sup> SOBRE LA VASORRELAJACIÓN MEDIADA POR EDH

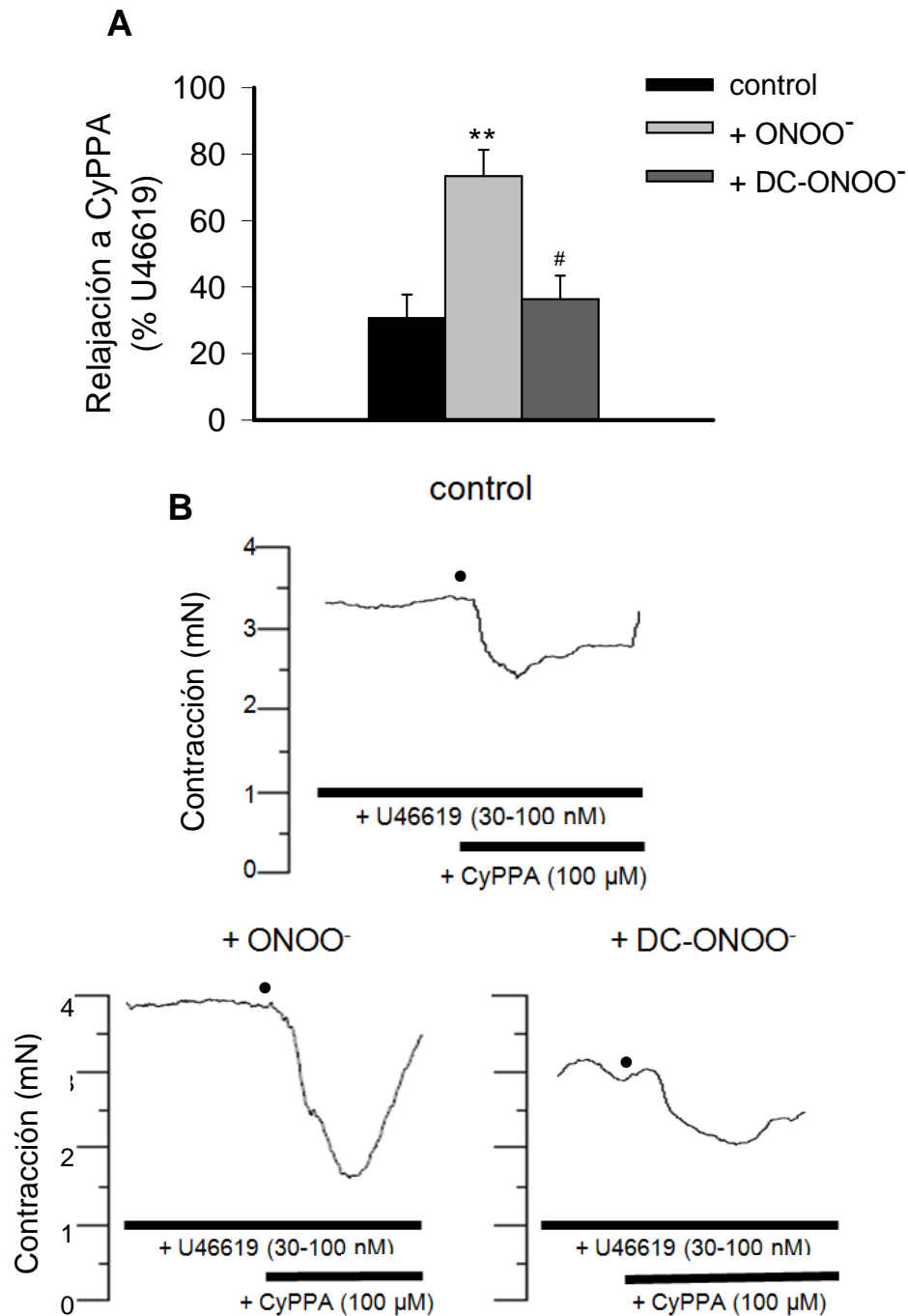
A continuación, se estudió el efecto del ONOO<sup>-</sup> exógeno sobre las respuestas de EDH para determinar si éste podría causar alteraciones similares a las observadas tras la I/R. En ACM de animales control precontraída con U46619, la exposición a ONOO<sup>-</sup> (5 μM), pero no a ONOO<sup>-</sup> descompuesto, aumentó ( $P < 0.01$ ) la relajación mediada por EDH e inducida con SLIGRL (Figura 56, A y B). La inhibición de la oxidación/nitrosilación de la ACM mediante epicatequina (1 μM), así como la estabilización de los filamentos de actina con jasplaquinolida (100 nM) no se asoció a un aumento de la relajación por EDH inducido por ONOO<sup>-</sup> (Figura 56A). Dicho aumento disminuyó con la adición de TRAM-34 más apamina ( $P < 0.01$ ), o de apamina sola ( $P < 0.05$ ), pero no de TRAM-34 en solitario (Figura 58B).

Por otro lado, la exposición a ONOO<sup>-</sup>, pero no a ONOO<sup>-</sup> descompuesto, aumentó ( $P < 0.01$ ) la relajación a CyPPA (Figura 59).

En conjunto, estos resultados sugieren que la pérdida de relajación mediada por los canales SK<sub>Ca</sub> que se observa en condiciones control y en presencia de U46619, podría recuperarse tras la exposición a ONOO<sup>-</sup>.



**Figura 58.** Efecto del ONOO<sup>-</sup> sobre la relajación a SLIGRL en ACM, precontraída con U46619, de ratas control. Todos los experimentos se realizaron en presencia de L-NAME e indometacina. EPICAT: epicatequina; JASPK: jasplaquinolida; DC-ONOO<sup>-</sup>; ONOO<sup>-</sup> descompuesto. Los resultados están expresados como media ± e.s.m de ACM control ( $n = 9-10$ ), + ONOO<sup>-</sup> ( $n = 4-7$ ) y + DC-ONOO<sup>-</sup> ( $n = 8-4$ ); \*\* $P < 0.01$  vs. control, #  $P < 0.05$  y ##  $P < 0.01$  vs. ONOO<sup>-</sup>, &  $P < 0.05$  vs. ONOO<sup>-</sup> + TRAM-34 mediante ANOVA de una vía seguido del test de Tukey.

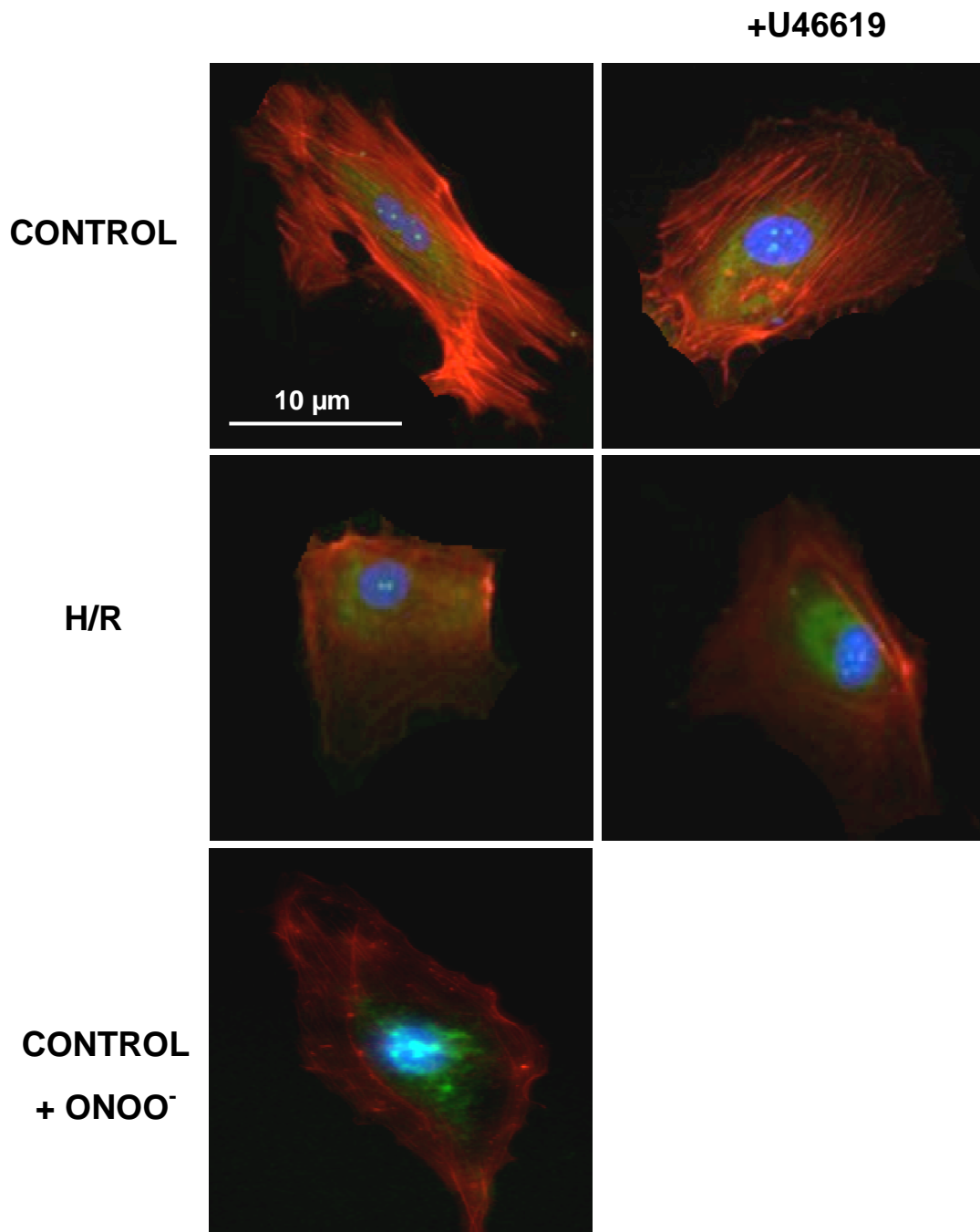


**Figura 59.** Efecto del ONOO<sup>-</sup> sobre la relajación a CyPPA en ACM, precontraída con U46619, de ratas control. Todos los experimentos se realizaron en presencia de L-NAME e indometacina. A: cuantificación; B: registros representativos; DC-ONOO<sup>-</sup>: ONOO<sup>-</sup> descompuesto; el punto indica la incorporación de SLIGRL. Los resultados están expresados como media ± e.s.m de ACM control ( $n = 11$ ), + ONOO<sup>-</sup> ( $n = 7$ ) y + DC-ONOO<sup>-</sup> ( $n = 3$ ); \*\* $P < 0.01$  vs. control, # $P < 0.05$  vs. ONOO<sup>-</sup> mediante ANOVA de una vía seguido del test de Tukey.

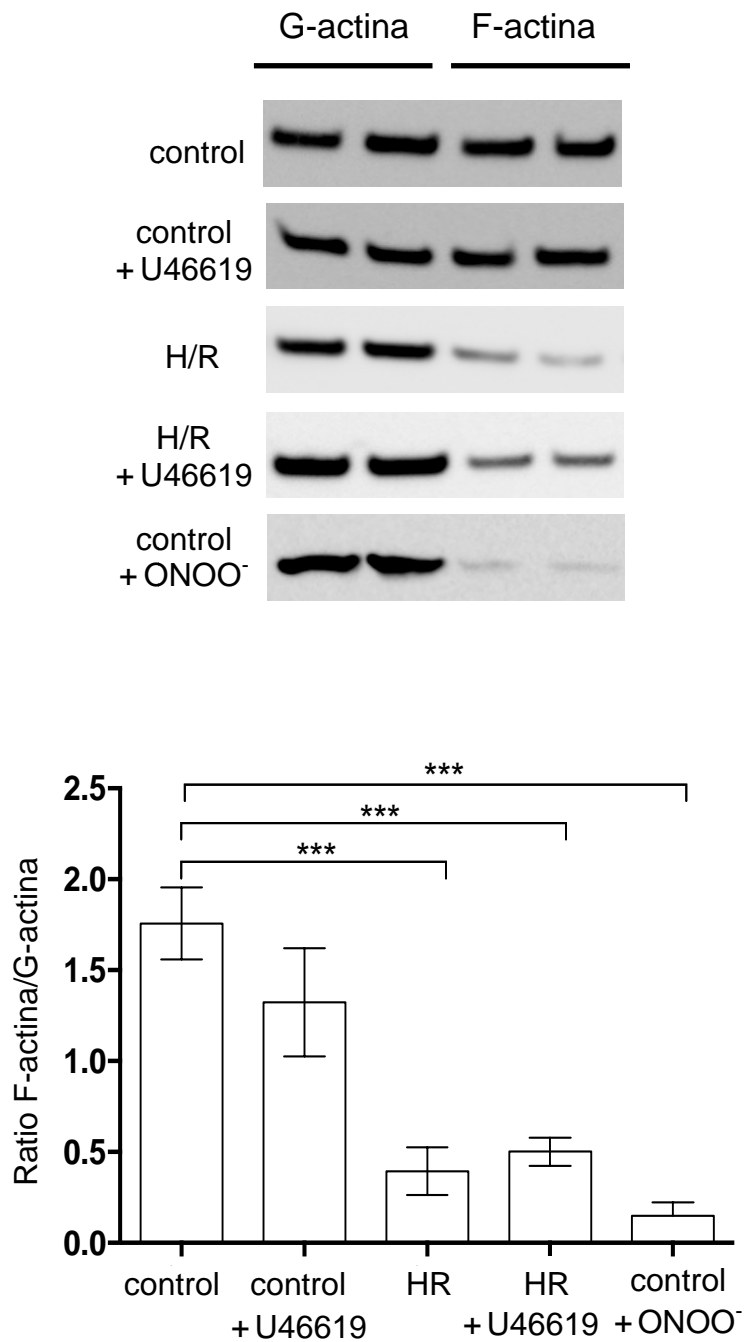


## 8. INFLUENCIA DE LA H/R SOBRE EL CONTENIDO DE F-ACTINA EN CÉLULAS HMVEC

La distribución de F-actina y G-actina en células HMVEC se muestra en la Figura 60. Tanto en ausencia como en presencia de U46619 (100 nM, 15 min), la F-actina de las células control formó fibras claramente distinguibles; en cambio, la fluorescencia de G-actina se distribuyó de forma difusa en el citoplasma, siendo particularmente intensa en la región perinuclear. Sin embargo, tras la H/R tuvo lugar una disminución de la fluorescencia a F-actina y las fibras fueron más difíciles de distinguir, mientras que la fluorescencia y distribución de G-actina no se vio aparentemente alterada. Cuando las células, tanto control como sometidas a H/R, se incubaron con U46619 no se observaron diferencias apreciables en la fluorescencia de F- y G-actina. En la Figura 61 se muestra la cantidad de F- y G-actina determinada mediante *western blot* utilizando ultracentrifugación, resultados que confirman que el U46619 no modificó el ratio F-/G-actina y que la H/R lo disminuyó ( $P < 0.001$ ), tanto en ausencia como en presencia de U46619. De manera similar, se observó que la incubación con  $\text{ONOO}^-$  (500 nM) redujo ( $P > 0.001$ ) la fluorescencia (Figura 60) y el ratio F-/G-actina (Figura 61) en células control.



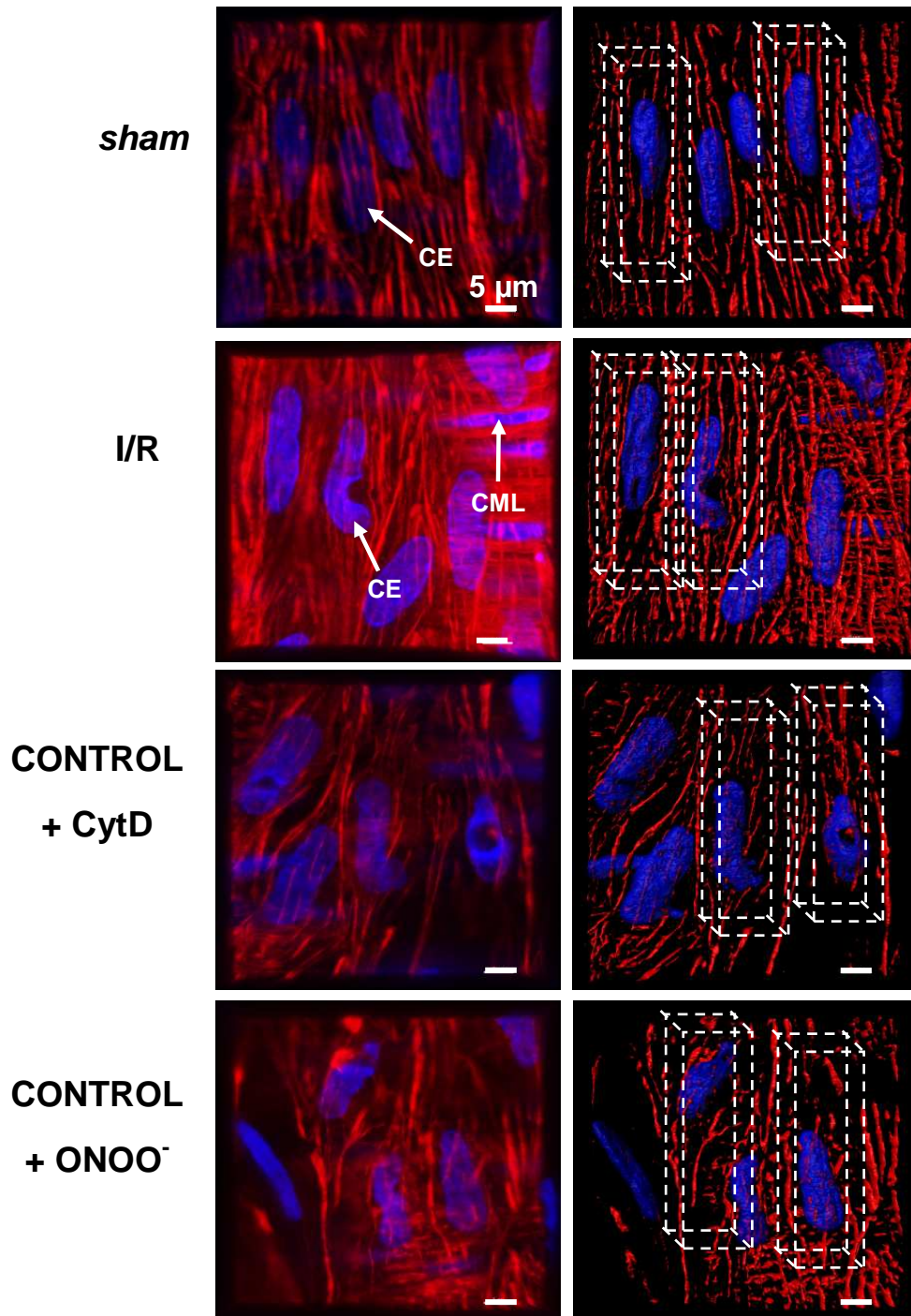
**Figura 60.** Imágenes representativas de la señal fluorescente de F-actina (rojo) y G-actina (verde) en células HMVEC control, expuestas a H/R o incubadas con ONOO<sup>-</sup>, en ausencia y en presencia de U46619. Los núcleos están teñidos en azul. 4-6 experimentos independientes.



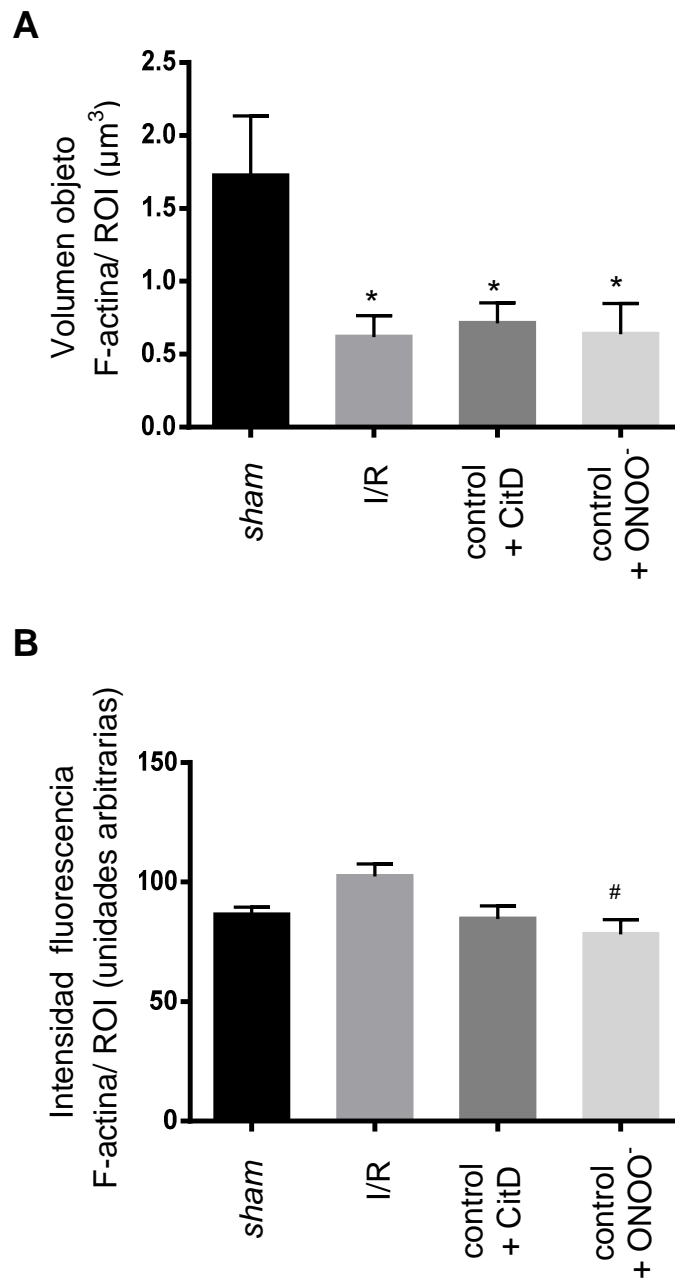
**Figura 61.** Blot representativo y análisis densitométrico de la expresión proteica de F-actina en células HMVEC control, expuestas a H/R o incubadas con ONOO<sup>-</sup>, en ausencia y en presencia de U46619. Los resultados están expresados como media  $\pm$  e.s.m de 4-6 experimentos independientes; \*\*\* $P < 0.001$  mediante ANOVA de una vía seguido del test de Tukey.

## 9. INFLUENCIA DE LA I/R SOBRE EL CONTENIDO DE F-ACTINA ENDOTELIAL

La Figura 62 muestra la organización de F-actina en la capa endotelial de la ACM intacta, presurizada (70 mmHg) y fijada en condiciones de máxima dilatación. Las fibras de F-actina aparecen orientadas perpendicularmente al flujo sanguíneo, ocupando tanto la región nuclear como citoplasmática de las CE. Tal y como se muestra en la Figura 63A, después de la I/R se observó una disminución ( $P < 0.05$ ) en el volumen de los filamentos de F-actina endotelial, sugiriendo una mayor fragmentación de la misma, hecho que también se observó ( $P < 0.05$ ) en arterias control incubadas con citocalasina D (50 nM) y con  $\text{ONOO}^-$  (5  $\mu\text{M}$ ). La intensidad de fluorescencia a F-actina (Figura 63B) no se vió significativamente alterada en ninguna de las condiciones estudiadas.



**Figura 62.** Reconstrucciones tridimensionales representativas a nivel de la capa endotelial de la fluorescencia correspondiente a F-actina (rojo) en ACM presurizada de ratas *sham*, isquémicas y control, estas últimas arterias incubadas con citocalasina D (CytD) o  $\text{ONOO}^-$ . Núcleos teñidos en azul. La cuantificación de la fluorescencia a F-actina se realizó sobre una máscara de la reconstrucción tridimensional. Las regiones de interés (ROI) están representadas con líneas discontinuas. Dimensiones de la imagen 238 x 238  $\mu\text{m}$ .

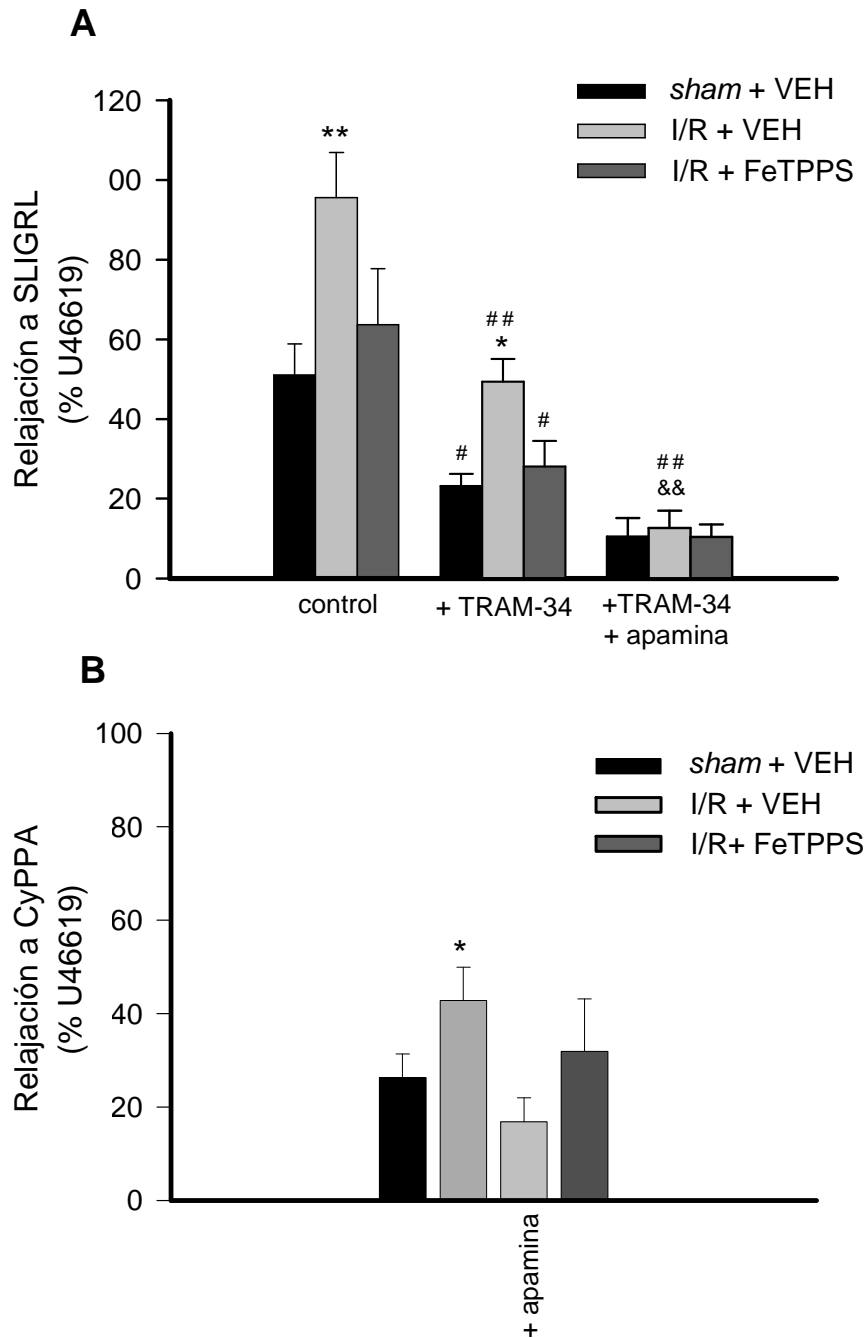


**Figura 63.** Cuantificación del volumen de los objetos (A) y de la intensidad de fluorescencia (B) de F-actina por ROI obtenidos en las reconstrucciones tridimensionales de la capa endotelial de ACM presurizada de ratas *sham*, isquémicas y control, estas últimas arterias incubadas con citocalasina D (CitD) o ONOO<sup>-</sup>. Los resultados están expresados como media  $\pm$  e.s.m de ACM *sham* ( $n = 4$ ), I/R ( $n = 3$ ), control + CitD ( $n = 4$ ) y control + ONOO<sup>-</sup> ( $n = 4$ ); \* $P < 0.05$  vs. *sham*; # $P < 0.05$  vs. I/R mediante ANOVA de una vía seguido del test de Tukey.

## 10. EFECTO DEL TRATAMIENTO CON FeTPPS SOBRE LA VASRRELAJACIÓN MEDIADA POR EDH TRAS LA I/R

Para confirmar si el  $\text{ONOO}^-$  generado *in vivo* está implicado en las alteraciones funcionales observadas tras la I/R, un grupo de animales se trató, tras 10 minutos iniciada la oclusión arterial, con FeTPPS (20 mg/kg), catalizador específico de la descomposición de  $\text{ONOO}^-$  (Kunz y cols., 2007; Coucha y cols., 2013), o con VEH. El VEH utilizado para disolver el fármaco no modificó la respuesta de EDH tras la I/R, en ACM precontraída con U46619, siendo ésta superior ( $P < 0.01$ ) a la obtenida en el grupo *sham*. El tratamiento con FeTPPS logró prevenir el aumento de la relajación por EDH provocado por la I/R, consiguiendo una respuesta parecida a la de los animales *sham* (Figura 62A). La presencia de TRAM-34 disminuyó la relajación mediada por EDH en los tres grupos experimentales analizados (Figura 64A). La adición de apamina junto con TRAM-34 sólo consiguió reducir ( $P < 0.05$ ) la respuesta en el grupo isquémico tratado con VEH, sugiriendo así la ausencia del componente derivado de los canales  $\text{SK}_{\text{ca}}$  al administrar FeTPPS (Figura 64A).

Tras la I/R, la ACM, a pesar de la presencia de U46619, presentó una mayor ( $P < 0.05$ ) relajación a CyPPA que la del grupo *sham* tratado con VEH (Figura 64B). No obstante, esta vez el tratamiento con FeTPPS sólo fue capaz de prevenir parcialmente dicha respuesta (Figura 64B).



**Figura 64.** Efecto del  $\text{ONOO}^-$  sobre la relajación a SLIGRL (A) y a CyPPA (B) en ACM, precontraída con U46619, de ratas *sham* e isquémicas tratadas con VEH o FeTPPS. Todos los experimentos se realizaron en presencia de L-NAME e indometacina. Los resultados están expresados como media  $\pm$  e.s.m de ACM *sham* + VEH ( $n = 7-11$ ), I/R + VEH ( $n = 5-6$ ) e I/R + FeTPPS ( $n = 5-6$ ); \* $P < 0.05$  y \*\* $P < 0.01$  vs. *sham* del mismo grupo experimental, # $P < 0.05$  y ## $P < 0.01$  vs. su propio control, && $P < 0.05$  vs. I/R + TRAM-34 mediante ANOVA de dos vías (A) y una vía (B) seguido del test de Tukey.



## DISCUSIÓN

En este segundo capítulo mostramos que la vasorrelajación inducida por SLIGRL, agonista de los receptores PAR2, en ACM precontraída con U46619, análogo estable del TXA<sub>2</sub> y agonista de los receptores TP, es mayor en ratas isquémicas que en *sham*. Además, demostramos que este incremento de la relajación tras la I/R podría estar relacionado con la incapacidad del U46619 para bloquear la relajación mediada por los canales SK<sub>Ca</sub> endoteliales. El mecanismo subyacente a esta observación implicaría un aumento de la acumulación de ONOO<sup>-</sup> y la consiguiente disrupción de la F-actina endotelial, que limitaría la capacidad del U46619 para inhibir la función de los canales SK<sub>Ca</sub>, facilitando así la relajación por EDH tras un episodio de I/R.

Se ha descrito que, tras la I/R, en ACM aumenta la relajación del tono basal mediada por EDH e inducida por uridina 5'-trifosfato (Marrelli y cols., 1999). En el presente estudio, se muestra por primera vez una mayor respuesta de EDH en ACM de ratas isquémicas sólo cuando los receptores TP (mediadores contráctiles) y PAR2 (mediadores relajadores) se activan mediante U46619 y SLIGRL, respectivamente, y no en relajaciones inducidas con bradiquinina o bajo contracciones a endotelina-1. Estos resultados sugieren que es un fenómeno que depende de la estimulación específica de determinados receptores. Los receptores PAR son una familia poco numerosa, formada por cuatro miembros (PAR1, PAR2, PAR3, PAR4) de receptores acoplados a proteína G y activados por proteasas de coagulación, que median diversas funciones celulares bajo diferentes condiciones fisiológicas y patológicas (Rezaie, 2014). Las células endoteliales expresan niveles altos de receptores

PAR2, que no se activan con la trombina pero sí con otras proteasas endógenas, así como con péptidos agonistas exógenos y estables como el SLIGRL (Kawabata y cols., 2004). En ACM, el SLIGRL tiene la capacidad de inducir una mayor respuesta de EDH en comparación con otros compuestos como la acetilcolina, la adenosina difosfato o la bradiquinina (McNeish y Garland, 2007). Es importante destacar que en la vasculatura cerebral se observan respuestas dependientes de PAR2 *in vivo* (Sobey y Cocks, 1998), y se cree que estas podrían jugar un papel protector o compensatorio en vasos dañados (Bucci, 2005). En consonancia con el presente estudio, la señalización inducida por PAR2 se encuentra protegida en algunas condiciones patológicas en las que la disfunción endotelial es un denominador común, como por ejemplo en hipertensión (Sobey y cols., 1999), diabetes (Kagota y cols., 2011) y síndrome metabólico (Howitt y cols., 2014), así como en un modelo de susceptibilidad genética al infarto (Smeda y McGuire, 2007).

Por otro lado, evidencias previas sugirieron que el aumento de relajación por EDH en ACM tras la I/R podría desencadenarse por mecanismos que implicarían una activación de los canales  $K_{Ca}$  (Marrelli y cols., 1999). Esto último fue secundado por estudios que demostraron que los canales  $K_{Ca}$  mediaban la respuesta de EDH en ACM de rata (McNeish y cols., 2005; 2006). De manera que, una explicación plausible del incremento de relajación por EDH observado en ACM tras la I/R podría ser la existencia de una mayor señalización mediada por los canales  $K_{Ca}$ . De acuerdo con observaciones previas (McNeish y cols., 2006), en el presente estudio hemos detectado que los canales  $SK_{Ca}$  se expresan no sólo en el endotelio de la ACM de rata, sino también en la capa adventicia, a pesar de que estos últimos parecerían no

participar en la relajación (McNeish y cols., 2006). No obstante, no encontramos sobreexpresión de los canales  $SK_{Ca}$  ni en células HMVEC sometidas a H/R, ni en ACM de ratas isquémicas, confirmando lo observado en arteriolas parenquimales penetrantes que ramifican de la ACM (Cipolla y cols., 2009).

Cuando la ACM es capaz de sintetizar NO, tanto los canales  $IK_{Ca}$  como los  $SK_{Ca}$  contribuyen conjuntamente a la respuesta de EDH. No obstante, bajo condiciones de privación de NO (McNeish y cols., 2006), o de estimulación de los receptores TP (McNeish y Garland, 2007), la función de los  $SK_{Ca}$  se mantiene inhibida. La actividad de estos últimos canales se puede restaurar mediante la exposición a inhibidores de la COX o a antagonistas de los receptores TP (McNeish y Garland, 2007; McNeish y cols., 2012; Gauthier y cols., 2014), demostrando así la implicación de la vía del  $TXA_2$  en la supresión de la función de los canales  $SK_{Ca}$  (Plane y Garland 1996; Crane y Garland, 2004; McNeish y Garland, 2007; McNeish y cols., 2012; Gauthier y cols., 2014). Asimismo, en el presente estudio encontramos que cuando la ACM de animales *sham* se precontraía con U46619, los canales  $SK_{Ca}$  no participaban en la respuesta de EDH. Sorprendentemente, observamos que tras la I/R la actividad de dichos canales se restablecía o estaba protegida, permitiendo así una mayor relajación por EDH en los animales isquémicos. Además, la estimulación directa de los canales  $SK_{Ca}$  con el activador selectivo CyPPA (Hougaard y cols., 2007) indujo una mayor relajación en arterias procedentes de animales isquémicos, sugiriendo que los efectos de la I/R también se pueden observar independientemente de la liberación de factores que estimulen la respuesta de EDH.

La estimulación de los receptores TP por parte del TXA<sub>2</sub> activa la vía de señalización RhoA/Rho quinasa, que está sobre estimulada en condiciones isquémicas (Yamashita y cols., 2007; Koumura y cols., 2011). Recientemente, en ACM de rata, la inhibición de la función de los canales SK<sub>Ca</sub> dependiente de la estimulación de los receptores TP se ha relacionado con la activación de la Rho quinasa (McNeish y cols., 2012). En el presente estudio, observamos un incremento de la Rho activada en células HMVEC expuestas a U46619, que se potenció aún más al someterlas a H/R. Estos resultados sugerirían que la inhibición de los canales SK<sub>Ca</sub> dependiente de la estimulación de los receptores TP debería estar presente o ser incluso mayor que en la condición control, tras un episodio de I/R. Sin embargo, y sorprendentemente, encontramos una mayor respuesta de EDH en ACM precontraída con U46619 en animales isquémicos.

Estudios previos sugieren que una de las múltiples funciones de la Rho quinasa se relaciona con la modulación de la actividad de ciertos canales iónicos, mediante su capacidad para reorganizar el citoesqueleto de actina (Gorovoy y cols., 2005; Prasain y Stevens, 2009). En relación con esto último, se ha descrito que la Rho quinasa necesita un citoesqueleto de actina intacto para bloquear la actividad de los canales rectificadores de K<sup>+</sup> retardados de la musculatura lisa (Luykenaar y cols., 2009). Por lo tanto, en el presente estudio, hemos hipotetizado que podría ser necesario un citoesqueleto de actina endotelial íntegro para que la Rho quinasa inhiba la respuesta de los canales SK<sub>Ca</sub>.

La F-actina es el mayor componente del aparato contráctil, de manera que se esperaría que cualquier interferencia grave en la polimerización de la actina

afectara a la contracción de la arteria. En este estudio, investigamos el efecto de determinados agentes que perturban el citoesqueleto de actina sobre las respuestas relajadoras mediadas por EDH, a concentraciones que no afectaron la capacidad contráctil del músculo liso. En primer lugar, encontramos que el tratamiento con citocalasina D, que impide la polimerización de la actina mediante el bloqueo de sus extremos, (Spector y cols., 1989; Wakatsuki y cols., 2001), recuperó la función de los canales  $SK_{Ca}$  sobre la relajación por EDH, a pesar de la presencia de U46619, aumentando la magnitud de dicha respuesta respecto a la obtenida en el grupo control. Por el contrario, el bloqueo de la polimerización de los monómeros de G-actina inducido por latrunculina B (Spector y cols., 1989) no sólo no fue capaz de mejorar las respuestas de EDH, sino que incluso, a concentraciones elevadas, se observó un empeoramiento de las mismas. Cabe mencionar que la concentración de citocalasina D utilizada en nuestro estudio (50 mM) probablemente favorezca la disrupción de la F-actina endotelial, además de inhibir su polimerización (Wakatsuki y cols., 2001). Esta hipótesis se confirmó tras observar que la incubación con citocalasina D desestructuró la F-actina endotelial de la ACM. Asimismo, la citocalasina D también fue capaz de incrementar la relajación mediada directamente por los canales  $SK_{Ca}$  inducida por CyPPA. En conjunto, estos resultados sugieren que sería necesaria la presencia de un citoesqueleto de actina endotelial intacto para que se pueda producir el bloqueo de la relajación mediada por los canales  $SK_{Ca}$  tras la estimulación de los receptores TP.

La I/R se asocia a un incremento de RONS, que pueden reaccionar rápidamente para producir  $ONOO^-$  (Pacher y cols., 2007) que, a su vez, puede modular la actividad de los canales  $BK_{Ca}$  (Brzezinska y cols., 2000; Liu y cols.

2002; Li y cols., 2005). Por otro lado, el  $\text{ONOO}^-$  también puede promover la oxidación y nitrosilación post-transcripcional de residuos de tirosina en proteínas, alterando así su función (Palomares y Cipolla, 2014). Tras la I/R, se ha observado que en arterias cerebrales hay un aumento de la nitrosilación de F-actina muscular, proteína rica en tirosina. En paralelo, también se ha descrito un incremento en la producción de  $\text{ONOO}^-$ , hecho que se ha relacionado con la nitrosilación y posterior pérdida de F-actina muscular, dando lugar a la disfunción del tono miogénico detectada en arterias cerebrales de ratas isquémicas (Maneen y cols., 2006; Maneen y Cipolla, 2007; Coucha y cols., 2013). Las CE están en continuo contacto con factores locales o circulantes, de manera que se encuentran altamente expuestas a RONS (Huot y cols., 1997). A pesar de ello, el posible impacto de estas moléculas reactivas sobre la integridad y función del citoesqueleto endotelial todavía no se conoce con precisión. En el presente estudio, detectamos un incremento de la nitrosilación de F-actina en células HMVEC expuestas a H/R y una disminución drástica en el ratio F-actina/G-actina, resultados similares a los obtenidos en células expuestas a  $\text{ONOO}^-$ . En ACM, observamos una mayor nitrosilación y fragmentación de la F-actina endotelial tanto en I/R como tras la exposición a  $\text{ONOO}^-$ . Además, la incubación de las arterias control con  $\text{ONOO}^-$  fue capaz de prevenir el bloqueo U46619-dependiente de la función de los canales  $\text{SK}_{\text{Ca}}$  endoteliales, de manera que se obtuvieron mayores respuestas de EDH inducidas con SLIGRL y con CyPPA, de manera similar a lo que se observó en ratas isquémicas. Este efecto inducido por el  $\text{ONOO}^-$  no se observó con epicatequina, inhibidor de la oxidación/nitrosilación, y con jasplakinolida, estabilizador de los filamentos de actina, sugiriendo con ello la implicación de la

oxidación/nitrosilación y de la desestructuración, respectivamente, del citoesqueleto de actina endotelial. A pesar de que desconocemos si otras sustancias derivadas del  $\text{ONOO}^-$  podrían intervenir en dichos efectos (Maneen y Cipolla, 2007), hemos demostrado que tras descomponer el  $\text{ONOO}^-$  no se observaban cambios en la relajación por EDH.

El siguiente paso fue analizar si la generación de  $\text{ONOO}^-$  durante la I/R estaba implicada en la conservación de la actividad de los canales  $\text{SK}_{\text{Ca}}$ . Con este propósito, las ratas se trataron, poco después del inicio de la oclusión, con FeTPPS, catalizador selectivo de la descomposición de  $\text{ONOO}^-$  (Kunz y cols., 2007; Coucha y cols., 2013). Las ACM de animales tratados con FeTPPS manifestaron el bloqueo TP-dependiente de la relajación mediada por los canales  $\text{SK}_{\text{Ca}}$ , que dio lugar a una respuesta de EDH similar a la observada en arterias del grupo *sham* tratado con vehículo. Además, las respuestas inducidas por CyPPA se vieron atenuadas tras el tratamiento con FeTPPS. En conjunto, estos hallazgos sugieren que el  $\text{ONOO}^-$  formado durante la I/R previene la pérdida de respuesta de EDH observada tras la estimulación de los receptores de TP, al menos en parte, a través de un mecanismo que preservaría la actividad de los canales  $\text{SK}_{\text{Ca}}$ . Es importante mencionar que, en esta fase del estudio, todavía no está claro si la desestructuración de la F-actina endotelial provocada por la acción oxidante/nitrante del  $\text{ONOO}^-$  es el único factor implicado en el aumento de la respuesta de EDH observada, ya que se ha descrito que otros oxidantes producidos directa o indirectamente durante la I/R, tales como el  $\text{O}_2^-$  o  $\text{H}_2\text{O}_2$ , también pueden desestructurar el citoesqueleto de actina (Moldovan y cols., 1999; Dalle-Done y cols., 2001; Boardman y cols., 2004).

## **DISCUSIÓN GENERAL**





La I/R cerebral induce cambios estructurales, mecánicos y miogénicos en la pared vascular de la ACM que parecen estar involucrados en el empeoramiento de la capacidad de regulación del flujo sanguíneo cerebral que se observa tras un episodio de I/R (Jiménez-Altayó y cols., 2007; 2009). Paralelamente, la I/R se asocia a un aumento del estrés oxidativo/nitrosativo de la pared vascular, siendo especialmente relevante el incremento de  $\text{ONOO}^-$ , especie oxidante/nitrante que, mediante la alteración de proteínas, puede dañar a los vasos y al cerebro (Coucha y cols., 2013).

En el presente estudio hemos demostrado, por primera vez, que las alteraciones estructurales y mecánicas, pero no las que afectan al tono miogénico, de la ACM tras la I/R se restringen sólo a las ratas que manifiestan hiperemia reactiva en el inicio de la reperfusión, proceso que hasta ahora se había asociado a un aumento en los niveles de expresión de nitrotirosina en tejido cerebral debidos a la presencia de  $\text{ONOO}^-$ . El mecanismo subyacente implicaría una mayor expresión de nitrotirosina y de pERK1/2, un incremento en el reclutamiento de monocitos/macrófagos y una acumulación de IL-18 en la pared de la ACM asociado a la HR, especialmente en la capa adventicia. Este ambiente marcadamente alterado podría favorecer la proliferación de CA, contribuyendo de este modo al remodelado hipertrófico del vaso que se observa sólo en presencia de hiperemia reactiva. En paralelo, también hemos demostrado que la administración exógena de AU, potente antioxidante endógeno con capacidad de neutralizar el  $\text{ONOO}^-$ , ejerce una mayor acción protectora en animales hiperémicos, a través de procesos que implicarían una reducción del estrés oxidativo/nitrosativo, una disminución de la inflamación y

de la hipertrofia de la pared de la ACM, así como un efecto inductor de la expansión de su diámetro interno. Además, hemos observado que el AU es incapaz de penetrar en el parénquima cerebral, sugiriendo así que sus efectos beneficiosos pueden provenir de su capacidad para neutralizar la acción del  $\text{ONOO}^-$  sobre la vasculatura cerebral. Estos resultados proporcionan nuevas evidencias sobre el mecanismo por el cual el AU podría ejercer su acción protectora, observada no sólo en animales sino también en humanos (Amaro y cols., 2007; 2009; Chamorro y cols., 2014) frente al daño cerebral inducido por episodios de I/R.

En nuestro estudio también hemos observado que, bajo condiciones de estimulación con el análogo del tromboxano  $\text{A}_2$  U46619, la relajación por EDH mediada por los receptores PAR2 aumenta en ACM de ratas isquémicas. Demostramos que ello podría ser debido a la incapacidad del U46619 para bloquear la respuesta de EDH mediada por los canales  $\text{SK}_{\text{Ca}}$ , posiblemente a causa de la disrupción del citoesqueleto de actina endotelial provocada por el  $\text{ONOO}^-$  que se produce durante la I/R. Por lo tanto, con estos resultados hemos revelado un nuevo mecanismo por el cual el  $\text{ONOO}^-$  podría afectar a la función cerebrovascular tras la I/R. El aumento de la respuesta de EDH promovido por el  $\text{ONOO}^-$  podría compensar la disminución de la capacidad vasodilatadora que a menudo se asocia a estados patológicos protrombóticos, tales como la I/R cerebral, en los que la respuesta mediada por NO se encuentra habitualmente disminuida (Chamorro, 2009).

Se conoce que la constricción de las arterias cerebrales puede empeorar el daño cerebral causado por la I/R, mientras que la vasorrelajación, incluyendo la HR, podría disminuir la resistencia cerebrovascular y contribuir a la rotura de la

BHE y a la formación de edema (Palomares y Cipolla, 2011). De manera que, la mayor respuesta de EDH en condiciones protrombóticas favorecida por el ONOO<sup>-</sup> podría participar en la disminución de la resistencia cerebrovascular, promoviendo con ello al daño cerebral tras la I/R. Por lo tanto, proponemos que aunque el aumento de las respuestas a EDH asociado a la I/R que describimos en el presente estudio se podría considerar clave para asegurar una correcta irrigación tisular, también podría contribuir a la ruptura de la BHE y a la formación de edema (Shi y cols., 2016). No obstante, necesitaríamos más estudios para entender con exactitud el papel fisiopatológico de estas alteraciones, y ello nos permitiría diseñar tratamientos terapéuticos eficaces.

En conjunto, los resultados obtenidos en el presente estudio muestran que, tras la I/R, el ONOO<sup>-</sup>, mediante su actividad oxidante/nitrosilante, participa en las alteraciones estructurales, mecánicas y vasodilatadoras que se observan en la ACM tras un episodio de I/R. Estos hallazgos ayudan a comprender la fisiopatología del ictus isquémico, a la vez que refuerzan el potencial terapéutico de los compuestos antioxidantes con capacidad de neutralizar la acción del ONOO<sup>-</sup>.



## CONCLUSIONES



En base a la hipótesis, objetivos y resultados obtenidos las conclusiones son las siguientes:

1. El peroxinitrito participa en las alteraciones estructurales y mecánicas, pero no en las miogénicas, de la arteria cerebral media y en el daño cerebral que se observan tras un episodio de isquemia-reperfusión, dado que:

**i)** La presencia de hiperemia reactiva en la reperfusión, que se asocia a un aumento del infarto cerebral y del daño neurológico, incrementa los niveles de expresión de nitrotirosina tanto en arteria cerebral media, principalmente en la capa adventicia, como en tejido cerebral ipsilateral.

**ii)** La hiperemia reactiva se asocia a un remodelado hipertrófico de la arteria cerebral media ipsilateral debido, al menos en parte, al aumento en el número de células adventicias.

**iii)** El aumento en el número de células adventicias se asocia a un incremento de monocitos/macrófagos y de la expresión proteica de pERK1/2 y de la citoquina proinflamatoria IL-18.

**iv)** La hiperemia reactiva disminuye el estrés mecánico de la pared de la arteria cerebral media ipsilateral.

**v)** La disminución del tono miogénico de la arteria cerebral media ipsilateral se produce tanto en ausencia como en presencia de hiperemia reactiva.



**vi)** El tratamiento *in vivo* con ácido úrico una vez iniciada la reperfusión, a pesar de que es incapaz de penetrar al cerebro, previene los cambios estructurales y mecánicos, pero no los miogénicos, de la arteria cerebral media y el daño cerebral tras la isquemia-reperfusión.

**2.** El peroxinitrito participa en las alteraciones vasodilatadoras de la arteria cerebral media observadas tras un episodio de isquemia-reperfusión, dado que:

**i)** La isquemia-reperfusión, que se asocia a niveles altos de expresión de nitrotirosina endotelial, aumenta la relajación por hiperpolarización derivada del endotelio (EDH) inducida por un agonista de los receptores PAR2 en la arteria cerebral media ipsilateral precontraída con un análogo del tromboxano A<sub>2</sub>. Este aumento es debido a una mayor participación de los canales SK<sub>Ca</sub>.

**ii)** En el endotelio de la arteria cerebral media de ratas isquémicas, así como en el endotelio de arterias control incubadas con el inhibidor de la polimerización de la actina citocalasina D o con peroxinitrito, hay una mayor fragmentación de los filamentos de F-actina. Asimismo, en células HVMEC sometidas a hipoxia/reperfusión o expuestas a peroxinitrito, disminuye la cantidad de F-actina.

**iii)** La incubación con citocalasina D o con peroxinitrito, recupera la actividad de los canales SK<sub>Ca</sub> y aumenta la respuesta de EDH en la arteria cerebral media ipsilateral precontraída con un análogo del tromboxano A<sub>2</sub>, sugiriendo la participación de la desestructuración del

citoesqueleto endotelial por parte del peroxinitrito en las alteraciones vasodilatadoras observadas tras la isquemia-reperfusión.

**iv)** El tratamiento *in vivo* con FeTPPS, catalizador específico de la descomposición del peroxinitrito, una vez iniciada la isquemia previene la activación de los canales  $SK_{Ca}$  y el aumento de la relajación por EDH provocado por la isquemia-reperfusión.



**BIBLIOGRAFÍA**



- Abe K, Yuki S, Kogure K (1988) Strong attenuation of ischemic and postischemic brain edema in rats by a novel free radical scavenger. *Stroke* 19:480–485.
- Akbar M, Essa MM, Daradkeh G, Abdelmegeed MA, Choi Y, Mahmood L, et al. (2016) Mitochondrial dysfunction and cell death in neurodegenerative diseases through nitroxidative stress. *Brain Res* 1637:34–55.
- Alvarez B, Radi R (2003) Peroxynitrite reactivity with amino acids and proteins. *Amino Acids* 25:295–311.
- Amaro S, Obach V, Cervera A, Urra X, Gómez-Choco M, Planas AM, et al. (2009) Course of matrix metalloproteinase-9 isoforms after the administration of uric acid in patients with acute stroke: a proof-of-concept study. *J Neurol* 256:651–656.
- Amaro S, Soy D, Obach V, Cervera A, Planas AM, Chamorro A (2007) A pilot study of dual treatment with recombinant tissue plasminogen activator and uric acid in acute ischemic stroke. *Stroke* 38:2173–2175.
- Amaro S, Urra X, Gómez-Choco M, Obach V, Cervera A, Vargas M, et al. (2011) Uric acid levels are relevant in patients with stroke treated with thrombolysis. *Stroke* 42:S28–S32.
- Ames BN, Cathcart R, Schwiers E, Hochstein P (1981) Uric acid provides an antioxidant defense in humans against oxidant -and radical-caused aging and cancer: a hypothesis. *Proc Natl Acad Sci* 78:6858–6862.
- Aoyama K, Matsumura N, Watabe M, Wang F, Kikuchi-Utsumi K, Nakaki T (2011) Caffeine and uric acid mediate glutathione synthesis for neuroprotection. *Neuroscience* 181:206–215.

- Aronowski J, Strong R, Grotta JC (1997) Reperfusion injury: demonstration of brain damage produced by reperfusion after transient focal ischemia in rats. *J Cereb Blood Flow Metab* 17:1048–1056.
- Arribas SM, Daly CJ, McGrath IC (1999) Measurements of vascular remodeling by confocal microscopy. *Methods Enzymol* 307:246–273.
- Arribas SM, González C, Graham D, Dominiczak AF, McGrath JC (1997a) Cellular changes induced by chronic nitric oxide inhibition in intact rat basilar arteries revealed by confocal microscopy. *J Hypertens* 15:1685–1693.
- Arribas SM, Hillier C, González C, McGrory S, Dominiczak AF, McGrath JC (1997b). Cellular aspects of vascular remodelling in hypertension revealed by confocal microscopy. *Hypertension* 30:1455–1464.
- Arribas SM, Hinek A, González MC (2006) Elastic fibres and vascular structure in hypertension. *Pharmacol Ther* 111:771–791.
- Balavoine GG, Geletii YV (1999) Peroxynitrite scavenging by different antioxidants. Part I: convenient assay. *Nitric Oxide* 3:40–54.
- Balligand JL, Kelly RA, Marsden PA, Smith TW, Michel T (1993) Control of cardiac muscle cell function by an endogenous nitric oxide signaling system. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:347–351.
- Bank AJ, Wang H, Holte JE, Mullen K, Shammass R, Kubo SH (1996) Contribution of collagen, elastin, and smooth muscle to in vivo human brachial artery wall stress and elastic modulus. *Circulation* 94:3263–3270.
- Baumbach GL, Didion SP, Faraci FM (2006) Hypertrophy of cerebral arterioles in mice deficient in expression of the gene for CuZn superoxide dismutase. *Stroke* 37:1850–1855.

- Baumbach GL, Heistad DD (1989) Remodeling of cerebral arterioles in chronic hypertension. *Hypertension* 13:968–972.
- Bazzoni G, Dejana E (2004) Endothelial cell-to-cell junctions: molecular organization and role in vascular homeostasis. *Physiol Rev* 84:869–901.
- Beasley D, Schwartz JH, Brenner BM (1991) Interleukin 1 induces prolonged L-arginine-dependent cyclic guanosine monophosphate and nitrite production in rat vascular smooth muscle cells. *J Clin Invest* 87:602–608.
- Becker BF (1993) Towards the physiological function of uric acid. *Free Radic Biol Med* 14:615–631.
- Belik J, Jankov RP, Pan J, Tanswell AK (2004) Peroxynitrite inhibits relaxation and induces pulmonary artery muscle contraction in the newborn rat. *Free Radic Biol Med* 37:1384–1392.
- Bellien J, Thuillez C, Joannides R (2008) Contribution of endothelium-derived hyperpolarizing factors to the regulation of vascular tone in humans. *Fundam Clin Pharmacol* 22:363–377.
- Bencsik P, Sasi V, Kiss K, Kupai K, Kolossváry M, Maurovich-Horvat P, et al. (2015) Serum lipids and cardiac function correlate with nitrotyrosine and MMP activity in coronary artery disease patients. *Eur J Clin Invest* 45:692–701.
- Benton G, George J, Kleinman HK, Arnaoutova IP (2009) Advancing science and technology via 3D culture on basement membrane matrix. *J Cell Physiol* 221:18–25.
- Berry CE, Hare JM (2003) Xanthine oxidoreductase and cardiovascular disease: molecular mechanisms and pathophysiological implications. *J Physiol* 555:589–606.



- Boardman KC, Aryal AM, Miller WM, Waters CM (2004) Actin re-distribution in response to hydrogen peroxide in airway epithelial cells. *J Cell Physiol* 199:57–66.
- Boysen NC, Dragon DN, Talman WT (2009) Parasympathetic dilatory influences on cerebral vessels. *Auton Neurosci* 147:101–104.
- Brandes RP, Weissmann N, Schöder K (2014) Nox family NADPH oxidases: molecular mechanisms of activation. *Free Radic Biol Med* 76:208–226.
- Briones AM, Arribas SM, Salaices M (2010) Role of extracellular matrix in vascular remodeling of hypertension. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 19:187–194.
- Briones AM, González JM, Somoza B, Giraldo J, Daly CJ, Vila E, et al. (2003) Role of elastin in spontaneously hypertensive rat small mesenteric remodelling. *J Physiol* 552:185–195.
- Briones AM, Rodríguez-Criado N, Hernanz R, García-Redondo AB, Rodríguez-Díez RR, Alonso MJ, et al. (2009) Atorvastatin prevents angiotensin II-induced vascular remodeling and oxidative stress. *Hypertension* 54:142–149.
- Briones AM, Salaices M, Vila E (2007) Mechanisms underlying hypertrophic remodeling and increased stiffness of mesenteric resistance arteries from aged rats. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 62:696–706.
- Briones AM, Tabet F, Callera GE, Montezano AC, Yogi A, He Y, et al. (2011) Differential regulation of Nox1, Nox2 and Nox4 in vascular smooth muscle cells from WKY and SHR. *J Am Soc Hypertens* 5:137–153.

- Briones AM, Xavier FE, Arribas SM, González MC, Rossoni LV, Alonso MJ, et al. (2006) Alterations in structure and mechanics of resistance arteries from ouabain-induced hypertensive rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 291:H193–H201.
- Brisset AC, Isakson BE, Kwak BR (2009) Connexins in vascular physiology and pathology. *Antioxid Redox Signal* 11:267–282.
- Bruno A, Levine SR, Frankel MR, Brott TG, Lin Y, Tilley BC, et al. (2002) Admission glucose level and clinical outcomes in the NINDS rt-PA Stroke Trial. *Neurology* 59:669–674.
- Brzezinska AK, Gebremedhin D, Chilian WM, Kalyanaraman B, Elliott SJ (2000) Peroxynitrite reversibly inhibits Ca(2+)-activated K(+) channels in rat cerebral artery smooth muscle cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 278:1883–1890.
- Bucci M, Roviezzo F, Cirino G (2005) Protease-activated receptor-2 (PAR2) in cardiovascular system. *Vascul Pharmacol* 43:247–253.
- Busse R, Edwards G, Félétou M, Fleming I, Vanhoutte PM, Weston AH (2002) EDHF: bringing the concepts together. *Trends Pharmacol Sci* 23:374–380.
- Campbell BC, Mitchell PJ, Kleinig TJ, Dewey HM, Churilov L, Yassi N, et al., EXTEND-IA Investigators (2015) Endovascular therapy for ischemic stroke with perfusion-imaging selection. *N Engl J Med* 372:1009–1018.
- Capes SE, Hunt D, Malmberg K, Pathak P, Gerstein HC (2001) Stress hyperglycemia and prognosis of stroke in nondiabetic and diabetic patients: a systematic overview. *Stroke* 32:2426–2432.

- Caracuel L, Jiménez-Altayó F, Romo M, Márquez-Martín A, Dantas AP, Vila E (2012) Transient mesenteric ischemia leads to remodeling of rat mesenteric resistance arteries. *Front Physiol* 5;2:118.
- Carballal S, Bartesaghi S, Radi R (2014) Kinetic and mechanistic considerations to assess the biological fate of peroxynitrite. *Biochim Biophys Acta* 1840:768–780.
- Carlier MF (1991) Actin: protein structure and filament dynamics. *J Biol Chem* 266:1–4.
- Carvajal JA, Germain AM, Huidobro-Toro JP, Weiner CP (2000) Molecular of cGMP-mediated smooth muscle relaxation. *J Cell Physiol* 184:409–420.
- Cave AC, Brewer AC, Narayanapanicker A, Ray R, Grieve DJ, Walker S, et al. (2006) NADPH oxidases in cardiovascular health and disease. *Antioxid Redox Signal* 8:691–728.
- Chamorro A (2009) TP receptor antagonism: a new concept in atherothrombosis and stroke prevention. *Cerebrovasc Dis* 27:20–27.
- Chamorro A, Amaro S, Castellanos M, Segura T, Arenillas J, Martí-Fàbregas J, et al., URICO-ICTUS Investigators (2014) Safety and efficacy of uric acid in patients with acute stroke (URICO-ICTUS): a randomised, double-blind phase 2b/3 trial. *Lancet Neurol* 13:453–460.
- Chamorro A, Obach V, Cervera A, Revilla M, Deulofeu R, Aponte JH (2002) Prognostic significance of uric acid serum concentration in patients with acute ischemic stroke. *Stroke* 33:1048–1052.
- Chan PH (1996) Role of antioxidants in ischemic brain damage. *Stroke* 27:1124–1129.

- Chan PH (2001) Reactive oxygen radicals in signaling and damage in ischemic brain. *J Cereb Blood Flow Metab* 21:2–14.
- Chen H, Yoshioka H, Kim GS, Jung JE, Okami N, Sakata H, et al. (2011) Oxidative stress in ischemic brain damage: mechanisms of cell death and potential molecular targets for neuroprotection. *Antioxid Redox Signal* 14:1505–1517.
- Cheung WY (1980) Calmodulin plays a pivotal role in cellular regulation. *Science* 207:19–27.
- Chong ZZ, Xu QP, Sun JN (2001) Effects and mechanisms of triacetylshikimic acid on platelet adhesion to neutrophils induced by thrombin and reperfusion after focal cerebral ischemia in rats. *Acta Pharmacol Sin* 22:679–684.
- Christensen MS, Paulson OB, Olesen J, Alexander SC, Skinhoj E, Dam WH, et al. (1973) Cerebral apoplexy (stroke) treated with or without prolonged artificial hyperventilation: 1. Cerebral circulation, clinical course and cause of death. *Stroke* 4:568–631.
- Cicala C (2002) Protease activated receptor 2 and the cardiovascular system. *Br J Pharmacol* 135:14–20.
- Cipolla MJ, Curry AB (2002) Middle cerebral artery function after stroke: the threshold duration of reperfusion for myogenic activity. *Stroke* 33:2094–2099.
- Cipolla MJ, Lessov N, Hammer ES, Curry AB (2001) Threshold duration of ischemia for myogenic tone in middle cerebral arteries: effect on vascular smooth muscle actin. *Stroke* 32:1658–1664.

- Cipolla MJ, McCall AL, Lessov N, Porter JM (1997) Reperfusion decreases myogenic reactivity and alters middle cerebral artery function after focal cerebral ischemia in rats. *Stroke* 28:176–180.
- Cipolla MJ, Smith J, Kohlmeyer MM, Godfrey JA (2009) SKCa and IKCa Channels, myogenic tone, and vasodilator responses in middle cerebral arteries and parenchymal arterioles: effect of ischemia and reperfusion. *Stroke* 40:1451–1457.
- Cortina B, Torregrosa G, Castelló-Ruiz M, Burguete MC, Moscardó A, Latorre A, et al. (2013) Improvement of the circulatory function partially accounts for the neuroprotective action of the phytoestrogen genistein in experimental ischemic stroke. *Eur J Pharmacol* 708:88–94.
- Coucha M, Li W, Johnson MH, Fagan SC, Ergul A (2013) Protein nitration impairs the myogenic tone of rat middle cerebral arteries in both ischemic and nonischemic hemispheres after ischemic stroke. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 305:H1726–H1735.
- Coulson RJ, Chesler NC, Vitullo L, Cipolla MJ (2002) Effects of ischemia and myogenic activity on active and passive mechanical properties of rat cerebral arteries. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 283:2268–2275.
- Cousin M, Custaud MA, Baron-Menguy C, Toutain B, Dumont O, Guihot AL, et al. (2010) Role of angiotensin II in the remodelling induced by a chronic increase in flow in rat mesenteric resistance arteries. *Hypertension* 55:109–115.
- Crane GJ, Garland CJ (2004) Thromboxane receptor stimulation associated with loss of SKCa activity and reduced EDHF responses in the rat isolated mesenteric artery. *Br J Pharmacol* 142:43–50.

- Cullis ER, Kalber LT, Ashton SE, Cartwright JE, Griffiths AJ, Ryan JR, et al. (2006) Tumour overexpression of inducible nitric oxide synthase (iNOS) increases angiogenesis and may modulate the anti-tumour effects of the vascular disrupting agent ZD6126. *Microvasc Res* 71:76–84.
- D'Ambrosio AL, Pinsky DJ, Connolly ES (2001) The role of the complement cascade in ischemia/reperfusion injury: implications for neuroprotection. *Mol Med* 7:367–382.
- Dalle-Donne I, Rossi R, Milzani A, Di Simplicio P, Colombo R (2001) The actin cytoskeleton response to oxidants: from small heat shock protein phosphorylation to changes in the redox state of actin itself. *Free Radic Biol Med* 31:1624–1632.
- Dantas AP, Onetti Y, Oliveira MA, Carvalho MH, Heras M, Vila E, et al. (2014) Western diet consumption promotes vascular remodeling in non-senescent mice consistent with accelerated senescence, but does not modify vascular morphology in senescent ones. *Exp Gerontol* 55:1–11.
- Darley-Usmar V, Halliwell B (1996) Blood radicals: reactive nitrogen species, reactive oxygen species, transition metal ions, and the vascular system. *Pharm Res* 13:649–662.
- Davis CM, Fairbanks SL, Alkayed NJ (2013) Mechanism of the sex difference in endothelial dysfunction after stroke. *Transl Stroke Res* 4:381–389.
- De Ciuceis C, Porter E, Rizzoni D, Rizzardi N, Paiardi S, Boari GE, et al. (2007) Structural alterations of subcutaneous small-resistance arteries may predict major cardiovascular events in patients with hypertension. *Am J Hypertens* 20:846–852.

- del Zoppo GJ, Mabuchi T (2003) Cerebral microvessel responses to focal ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 23:879–894.
- del Zoppo GJ, Schmid-Schönbein GW, Mori E, Copeland BR, Chang CM (1991) Polymorphonuclear leukocytes occlude capillaries following middle cerebral artery occlusion and reperfusion in baboons. *Stroke* 1276–1283.
- Dénes A, Ferenczi S, Halász J, Környei Z, Kovács KJ (2008) Role of CX3CR1 (fractalkine receptor) in brain damage and inflammation induced by focal cerebral ischemia in mouse. *J Cereb Blood Flow Metab* 28:1707–1721.
- DeWitt DS, Mathew BP, Chaisson JM, Prough DS (2001) Peroxynitrite reduces vasodilatory responses to reduced intravascular pressure, calcitonin gene-related peptide, and cromakalim in isolated middle cerebral arteries. *J Cereb Blood Flow Metab* 21:253–261.
- Dhalla NS, Elmoselhi AB, Hata T, Makino N (2000) Status of myocardial antioxidants in ischemia-reperfusion injury. *Cardiovasc Res* 47:446–56.
- Di L, Kerns EH, Fan K, McConnell OJ, Carter GT (2003) High throughput artificial membrane permeability assay for blood-brain barrier. *Eur J Med Chem* 38:223–232.
- Diener HC, Lees KR, Lyden P, Grotta J, Davalos A, Davis SM, et al., SAINT I and II Investigators (2008) NXY-059 for the treatment of acute stroke: pooled analysis of the SAINT I and II Trials. *Stroke* 39:1751–1758.
- Dikalov S, Griendling KK, Harrison DG (2007) Measurement of reactive oxygen species in cardiovascular studies. *Hypertension* 49:717–727.
- Dirnagl U, Iadecola C, Moskowitz MA (1999) Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. *Trends Neurosci* 22:391–397.
- Dobrin PB (1978) Mechanical properties of arteries. *Physiol Rev* 58:397–460.

- Donnan GA, Fisher M, Macleod M, Davis SM (2008) Stroke. *Lancet* 371:1612–1623.
- Dora KA, Gallagher NT, McNeish A, Garland CJ (2008) Modulation of endothelial cell  $K_{Ca}3.1$  channels during endothelium-derived hyperpolarizing factor signaling in mesenteric resistance arteries. *Circ Res* 102:1247-1255.
- Doyle KP, Simon RP, Stenzel-Poore MP (2008) Mechanisms of ischemic brain damage. *Neuropharmacology* 55:310–318.
- Drake RL, Vogl AW, Mitchell A (2015) Gray's anatomy for students. 3th ed. Elsevier Health Sciences, London.
- Dringen R (2002) Metabolism and functions of glutathione in brain. *Prog Neurobiol* 62:649–671.
- Du Y, Chen CP, Tseng CY, Eisenberg Y, Firestein BL (2007) Astroglia-mediated effects of uric acid to protect spinal cord neurons from glutamate toxicity. *Glia* 55:463–472.
- Dungan KM, Braithwaite SS, Preiser JC (2009) Stress hyperglycaemia. *Lancet* 373:1798–1807.
- Easton JD, Albers GW, Caplan LR, Saver JL, Sherman DG, TIA Working Group (2004) Discussion: Reconsideration of TIA terminology and definitions. *Neurology* 62:S29–S34.
- Eble JA, Niland S (2009) The extracellular matrix of blood vessels. *Curr Pharm Des* 15:1385–1400.
- Edwards G, Dora KA, Gardener MJ, Garland CJ, Weston AH (1998)  $K^+$  is an endothelium-derived hyperpolarizing factor in rat arteries. *Nature* 396:269–272.



- Ellinsworth DC, Shukla N, Fleming I, Jeremy JY (2014) Interactions between thromboxane A<sub>2</sub>, thromboxane/prostaglandin (TP) receptors, and endothelium-derived hyperpolarization. *Cardiovasc Res* 102:9–16.
- Emsley HC, Smith CJ, Tyrrell PJ, Hopkins SJ (2008) Inflammation in acute ischemic stroke and its relevance to stroke critical care. *Neurocrit Care* 9:125–138.
- Ersoy Y, Özerol E, Baysal Ö, Temel I, MacWalter RS, Meral Ü, et al. (2002). Serum nitrite levels in patients with rheumatoid arthritis, ankylosing spondylitis, and osteoarthritis. *Ann Rheum Dis* 61:76–78.
- Evadarone Acute Infarction Study Group (2003) Effect of a novel free radical scavenger Evadarone (MCI-186) on acute brain infarction. Randomized, placebo-controlled, double blind study at multicenters. *Cerebrovasc Dis* 15:222–229.
- Fabian RH, DeWitt DS, Kent TA (1995) In vivo detection of superoxide anion production by the brain using a cytochrome c electrode. *J Cereb Blood Flow Metab. J Cereb Blood Flow Metab* 15:242-247.
- Fabian RH, Kent TA (1999) Superoxide anion production during reperfusion is reduced by an antineutrophil antibody after prolonged cerebral ischemia. *Free Radic Biol Med* 15:242–247.
- Faraci FM (2006) Reactive oxygen species: influence on cerebral vascular tone. *J Appl Physiol* 100:739–743.
- Faraci FM, Baumbach GL, Heistad DD (1989) Myogenic mechanisms in the cerebral circulation. *J Hypertens Suppl* 7:S61–S64.

- Féléto M, Hoeffner U, Vanhoutte PM (1989) Endothelium-dependent relaxing factors do not affect the smooth muscle of portal mesenteric veins. *Blood Vessels* 26:21–32.
- Féléto M, Huang Y, Vanhoutte PM (2011) Endothelium-mediated control of vascular tone: COX-1 and COX-2 products. *Br J Pharmacol* 164:894–912.
- Féléto M, Vanhoutte PM (2006) Endothelium-derived hyperpolarizing factor. Where are you? *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26:1215–1225.
- Fields JD, Khatri P, Nesbit GM, Liu KC, Barnwell SL, Lutsep HL, et al. (2011) Meta-analysis of randomized intra-arterial thrombolytic trials for the treatment of acute stroke due to middle cerebral artery occlusion. *J Neurointerv Surg* 3:151–155.
- Flacco N (2014) Distribución, function y vías de señalización de los adrenoceptores  $\beta$  a nivel vascular. Tesis doctoral, Universitat de València.
- Fonarow GC, Smith EE, Saver JL, Reeves MJ, Bhatt DL, Grau-Sepulveda MV, et al. (2011) Timeliness of tissue-type plasminogen activator therapy in acute ischemic stroke: patient characteristics, hospital factors, and outcomes associated with door-to-needle times within 60 minutes. *Circulation* 123:750–758.
- Förstermann U, Boissel J, Kleinert H (1998) Expressional control of the constitutive isoforms of nitric oxide synthase (NOS I and NOS II). *Faseb J* 12:773–790.
- Förstermann U, Sessa WC (2012) Nitric oxide synthases: regulation and function. *Eur Heart J* 33:829–837.
- Fortuno A, Jose GS, Moreno MU, Diez J, Zalba G (2005) Oxidative stress and vascular remodelling *Exp Physiol* 90:457–462.

- Frijns CJ (2002) Inflammatory cell adhesion molecules in ischemic cerebrovascular disease. *Stroke* 33:2115–2122.
- Fukuyama N, Takizawa S, Ishida H, Hoshiai K, Shinohara Y, Nakazawa H (1998) Peroxynitrite formation in focal cerebral ischemia-reperfusion in rats occurs predominantly in the peri-infarct region. *J Cereb Blood Flow Metab* 18:123–129.
- Gao YJ, Lee RM (2005) Hydrogen peroxide is an endothelium-dependent contracting factor in rat renal artery. *Br J Pharmacol* 146:1061-1068.
- Gariballa SE, Hutchin TP, Sinclair AJ (2002) Antioxidant capacity after acute ischaemic stroke. *QJM* 95:685–90.
- Garland CJ, Hiley CR, Dora KA (2011) EDHF: spreading the influence of the endothelium. *Br J Pharmacol* 164:839–852.
- Garland CJ, Plane F, Kemp BK, Cocks TM (1995) Endothelium-dependent hiperpolarization: a role in the control of vascular tone. *Trends Pharmacol Sci* 146:1061–1068.
- Garland CJ, Weston AH (2011) The vascular endothelium: still amazing us 30 years on. *Br J Pharmacol* 164:837–838.
- Gauthier KM, Campbell WB, McNeish AJ (2014) Regulation of KCa2.3 and endothelium-dependent hyperpolarization (EDH) in the rat middle cerebral artery: the role of lipoxygenase metabolites and isoprostanes. *PeerJ* 2:e414.
- Geeson J, Larsson K, Hourani SM, Toms NJ (2002) Sodium nitroprusside-induced rat fundus relaxation is ryanodine-sensitive and involves L-type Ca<sub>2</sub>p channel and small conductance Ca(2p)-sensitive K<sub>p</sub> channel components. *Auton Autacoid Pharmacol* 22:297–301.

- Golding EM, Marrelli SP, You J, Bryan RM Jr (2002) Endothelium-derived hyperpolarizing factor in the brain: a new regulator of cerebral blood flow? *Stroke* 33:661–663.
- Gorina R (2007) La via JAK/STAT com a mediadora de respostes a l'estrès oxidatiu, la inflamació i la immunitat innata en astròcits. Tesis doctoral, Universitat de Barcelona.
- Gorovoy M, Niu J, Bernard O, Profirovic J, Minhall R, Neamu R, et al. (2005) LIM kinase 1 coordinates microtubule stability and actin polymerization in human endothelial cells. *J Biol Chem* 280:26533–26542.
- Gourley JK, Heistad DD (1984) Characteristics of reactive hyperemia in the cerebral circulation. *Am J Physiol* 246:H52–H58.
- Granger DN, Benoit JN, Suzuki M, Grisham MB (1989) Leukocyte adherence to venular endothelium during ischemia-reperfusion. *Am J Physiol* 257:G683–G688.
- Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skiper PL, Wishnock JS, Tannenbaum SR (1982) Analysis of nitrate, nitrite and [<sup>15</sup>N]nitrate in biological fluids. *Anal Biochem* 126:131–138.
- Griendling KK, Sorescu D, Ushio-Fukai M (2000) NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease. *Circ Res* 86:494–501.
- Grover AK, Samson SE (1988) Effect of superoxide radical on Ca<sup>2+</sup> pumps of coronary artery. *Am J Physiol* 255:297–303.
- Gruber J, Tang SY, Jenner AM, Mudway I, Blomberg A, Behndig A, et al. (2009) Allantoin in human plasma, serum, and nasal-lining fluids as a biomarker of oxidative stress: avoiding artifacts and establishing real in vivo concentrations. *Antioxid Redox Signal* 11:1767–1776.

- Gryglewski RJ, Palmer RM, Moncada S (1986) Superoxide anion is involved in the breakdown of endothelium-derived vascular relaxing factor. *Nature* 32:454–456.
- Guo ZY, Yan ZQ, Bai L, Zhang ML, Jiang ZL (2008) Flow shear stress affects macromolecular accumulation through modulation of internal elastic lamina fenestrae. *Clin Biomech* 1:S104–S111.
- Gutteridge JMC, Westermarck T, Halliwell B (1986) Oxygen radical damage in biological systems. *Free Radicals, Aging, and Degenerative Diseases*, Johnson Jr JE, Walford R, Harman D y Miquel J Alan R Liss ed, pp 99–139 New York.
- Guzik TJ, West NE, Pillai R, Taggart DP, Channon KM (2002) Nitric oxide modulates superoxide release and peroxynitrite formation in human blood vessels. *Hypertension* 39:1088–1094.
- Haas TL, Duling BR (1997) Morphology favors an endothelial cell pathway for longitudinal conduction within arterioles. *Microvasc Res* 53:113–120.
- Han W, Li H, Villar VA, Pascua AM, Dajani MI, Wang X, et al. (2008) Lipid rafts keep NADPH oxidase in the inactive state in human renal proximal tubule cells. *Hypertension* 51:481–487.
- Hayabuchi Y, Nakaya Y, Matsuoka S, Kuroda Y (1998) Hydrogen peroxide-induced vascular relaxation in porcine coronary arteries is mediated by Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels. *Heart Vessels* 13:9–17.
- Hayden MR, Sowers JR (2007) Redox imbalance in diabetes. *Antioxid Redox Signal* 9:865–867.

- Heinzel B, John M, Klatt P, Bohme E, Mayer B (1992) Ca<sup>2+</sup>/calmodulin dependent formation of hydrogen peroxide by brain nitric oxide synthase. *Biochem J* 281:627–630.
- Heiss WD, Sobesky J, Hesselmann V (2004) Identifying thresholds for penumbra and irreversible tissue damage. *Stroke* 35:2671–2674.
- Herrmann J, Samee S, Chade A, Rodriguez Porcel M, Lerman LO, Lerman A (2005) Differential effect of experimental hypertension and hypercholesterolemia on adventitial remodeling. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25:447–453.
- Hicks M, Wong LS, Day RO (1993) Identification of products from oxidation of uric acid induced by hydroxyl radicals. *Free Radic Res Commun* 18:337–351.
- Hilgers RH, Webb RC (2005) Molecular aspects of arterial smooth muscle contraction: focus on Rho. *Exp Biol Med (Maywood)* 230:829–835.
- Hill MA, Davis MJ, Meininger GA, Potocnik SJ, Murphy TV (2006) Arteriolar myogenic signalling mechanisms: implications for local vascular function. *Clin Hemorheol Microcirc* 34:67–79.
- Hirst GD, Edwards FR (1989) Sympathetic neuroeffector transmission in arteries and arterioles. *Physiol Rev* 69:546–604.
- Hong JM, Bang OY, Chung CS, Joo IS, Gwag BJ, Ovbiagele B (2010) Influence of recanalization on uric acid patterns in acute ischemic stroke. *Cerebrovasc Dis* 29:431–439.
- Hori M, Nishida K (2009) Oxidative stress and left ventricular remodelling after myocardial infarction. *Cardiovasc Res* 81:457–464.

- Hougaard C, Eriksen BL, Jørgensen S, Johansen TH, Dyhring T, Madsen LS, et al. (2007) Selective positive modulation of the SK3 and SK2 subtypes of small conductance Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels. *Br J Pharmacol* 151:655–665.
- Howitt L, Morris MJ, Sandow SL, Murphy TV (2014) Effect of diet-induced obesity on BK(Ca) function in contraction and dilation of rat isolated middle cerebral artery. *Vascul Pharmacol* 61:10–15.
- Huang JS, Ramamurthy SK, Lin X, Le Breton GC (2004) Cell signaling through thromboxane A2 receptors. *Cellular Signalling* 16:521–533.
- Humphreys SA, Koss MC (1998) Role of nitric oxide in post-ischemic cerebral hyperemia in anesthetized rats. *Eur J Pharmacol* 347:223–229.
- Huot, J, Houle F, Marceau F, Landry J (1997) Oxidative stress-induced actin reorganization mediated by the p38 mitogen-activated protein kinase/heat shock protein 27 pathway in vascular endothelial cells. *Circ Res* 80:383–392.
- Hwa JJ, Ghibaudi L, Williams P, Chintala M, Zhang R, Chatterjee M, et al. (1996) Evidence for the presence of a proteinase-activated receptor distinct from the thrombin receptor in vascular endothelial cells. *Circ Res* 78:581–588.
- Iadecola C, Davisson RL (2008) Hypertension and cerebrovascular dysfunction. *Cell Metab* 7:476–484.
- Ikeda Y, Long DM (1990) The molecular basis of brain injury and brain edema: the role of oxygen free radicals. *Neurosurgery* 27:1–11.
- Intengan HD, Schiffrin EL (2001) Vascular remodeling in hypertension: roles of apoptosis, inflammation, and fibrosis. *Hypertension* 38:581–587.

- Ischiropoulos H, Zhu L, Chen J, Tsai M, Martin JC, Smith CD, et al. (1992) Peroxynitrite-mediated tyrosine nitration catalyzed by superoxide dismutase. *Arch Biochem Biophys* 298:431–437.
- Ito Y, Pagano PJ, Tornheim K, Brecher P, Cohen RA (1996) Oxidative stress increases glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase mRNA levels in isolated rabbit aorta. *Am J Physiol* 270:H81–H87.
- Jensen MP, Riley DP (2002) Peroxynitrite decomposition activity of iron porphyrin complexes. *Inorg Chem* 41:4788–97.
- Jiang Z, Li C, Arrick DM, Yang S, Baluna AE, Sun H (2014) Role of nitric oxide synthases in early blood-brain barrier disruption following transient focal cerebral ischemia. *PLoS One* 9:e93134.
- Jiménez-Altayó F, Caracuel L, Pérez-Asensio FJ, Martínez-Revelles S, Messeguer A, Planas AM, et al. (2009) Participation of oxidative stress on rat middle cerebral artery changes induced by focal cerebral ischemia: beneficial effects of 3,4-dihydro-6-hydroxy-7-methoxy-2,2-dimethyl-1(2H)-benzopyran (CR-6). *J Pharmacol Exp Ther* 331:429–436.
- Jiménez-Altayó F, Martín A, Rojas S, Justicia C, Briones AM, Giraldo J, et al. (2007) Transient middle cerebral artery occlusion causes different structural, mechanical, and myogenic alterations in normotensive and hypertensive rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 293:H628–H635.
- Johnson RJ, Tittle S, Cade JR, Rideout BA, Oliver WJ (2005) Uric acid, evolution and primitive cultures. *Semin Nephrol* 25:3–8.
- Justicia C, Martín A, Rojas S, Gironella M, Cervera A, Panés J, et al. (2006) Anti-VCAM-1 antibodies did not protect against ischemic damage either in rats or in mice. *J Cereb Blood Flow Metab* 26:421–432.



- Kagota S, Chia E, McGuire JJ (2011) Preserved arterial vasodilation via endothelial protease-activated receptor-2 in obese type 2 diabetic mice. *Br J Pharmacol* 164:358–371.
- Kahles T, Luedike P, Endres M, Galla HJ, Steinmetz H, Busse R, et al. (2007) NADPH oxidase plays a central role in blood-brain barrier damage in experimental stroke. *Stroke* 38:3000–3006.
- Kantachuvesiri S, Fleming S, Peters J, Peters B, Booker G, Lammie AG, et al. (2001) Controlled hypertension, a transgenic toggle switch reveals differential mechanisms underlying vascular disease. *J Biol Chem* 276:36727–36733.
- Kawabata A, Kanke T, Yonezawa D, Ishiki T, Saka M, Kabeya M, et al. (2004) Potent and metabolically stable agonists for protease-activated receptor-2: evaluation of activity in multiple assay systems in vitro and in vivo. *J Pharmacol Exp Ther* 309:1098–1107.
- Kawai H, Nakai H, Suga M, Yuki S, Watanabe T, Saito KI (1997) Effects of a novel free radical scavenger, MCI-186, on ischemic brain damage in the rat distal middle cerebral artery occlusion model. *J Pharmacol Exp Ther* 281:921–927.
- Kidwell CS, Jahan R, Gornbein J, Alger JR, Nenov V, Ajani Z, et al., MR RESCUE Investigators (2013) A trial of imaging selection and endovascular treatment for ischemic stroke. *N Engl J Med* 368:914–923.
- Kidwell CS, Saver JL, Mattiello J, Starkman S, Vinuela F, Duckwiler G, et al. (2001) Diffusion-perfusion MRI characterization of post-recanalization hyperperfusion in humans. *Neurology* 57:2015–21.

- Kikuchi K, Miura N, Kawahara KI, Murai Y, Morioka M, Lapchak PA, et al. (2013) Edaravone (Radicut), a free radical scavenger, is a potentially useful addition to thrombolytic therapy in patients with acute ischemic stroke. *Biomed Rep* 1:7–12.
- Kim DJ, Kim DI, Lee SK, Suh SH, Lee YJ, Kim J, et al. (2006) Protective effect of agmatine on a reperfusion model after transient cerebral ischemia: temporal evolution on perfusion MR imaging and histopathologic findings. *AJNR Am J Neuroradiol* 27:780–785.
- Kim KM, Henderson GN, Ouyang X, Frye RF, Sautin YY, Feig DI, et al. (2001) A sensitive and specific liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the determination of intracellular and extracellular uric acid. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 877:2032–2038.
- Kirino T (2002) Ischemic tolerance. *J Cereb Blood Flow Metab* 22:1283–1296.
- Koo DD, Welsh KI, West NE, Channon KM, Penington AJ, Roake JA, et al. (2001) Endothelial cell protection against ischemia/reperfusion injury by lecithinized superoxide dismutase. *Kidney Int* 60:786–796.
- Korthuis RJ, Granger DN (1993) Reactive oxygen metabolites, neutrophils, and the pathogenesis of ischemic-tissue/reperfusion. *Clin Cardiol* 16:119–126.
- Koumura A, Hamanaka J, Kawasaki K, Tsuruma K, Shimazawa M, Hozumi I, et al. (2011) Fasudil and ozagrel in combination show neuroprotective effects on cerebral infarction after murine middle cerebral artery occlusion. *J Pharmacol Exp Ther* 338:337–344.

- Krick S, Hänze J, Eul B, Savai R, Seay U, Grimminger F, et al. (2005) Hypoxia-driven proliferation of human pulmonary artery fibroblasts: cross-talk between HIF-1alpha and an autocrine angiotensin system. *FASEB J* 19:857–859.
- Kunz A, Park L, Abe T, Gallo EF, Anrather J, Zhou P, et al. (2007) Neurovascular protection by ischemic tolerance: role of nitric oxide and reactive oxygen species. *J Neurosci* 27:7083–7093.
- Kuroiwa T, Shibutani M, Okeda R (1989) Nonhyperemic blood flow restoration and brain edema in experimental focal cerebral ischemia. *J Neurosurg* 70:73–80.
- Lagaud G, Davies KP, Venkateswarlu K, Christ GJ (2002) The physiology, pathophysiology and therapeutic potential of gap junctions in smooth muscle. *Curr Drug Targets* 3:427–440.
- Lakhan SE, Kirchgessner A, Hofer M (2009) Inflammatory mechanisms in ischemic stroke: therapeutic approaches. *J Transl Med* 7:97.
- Lansberg MG, Straka M, Kemp S, Mlynash M, Wechsler LR, Jovin TG, et al., DEFUSE 2 study investigators (2012) MRI profile and response to endovascular reperfusion after stroke (DEFUSE 2): a prospective cohort study. *Lancet Neurol* 11:860–867.
- Lapchak PA, Zivin JA (2009) The lipophilic multifunctional antioxidant edaravone (radicut) improves behavior following embolic strokes in rabbits: a combination therapy study with tissue plasminogen activator. *Exp Neurol* 215:95–100.

- Le Brocq M, Leslie SJ, Milliken P, Megson IL (2008) Endothelial dysfunction: from molecular mechanisms to measurement, clinical implications, and therapeutic opportunities. *Antioxid Redox Signal* 10:1631–1674.
- Lee RM (1995) Morphology of cerebral arteries. *Pharmacol Ther* 66:149-173.
- Lee MY, Griendling KK (2008) Redox signaling, vascular function, and hypertension. *Antioxid Redox Signal* 10:1045–1059.
- Levina NN, Lew RR, Heath IB (1994) Cytoskeletal regulation of ion channel distribution in the tip-growing organism *Saprolegnia ferax*. *J Cell Sci* 107:127–134.
- Li J, Li W, Altura BT, Altura BM (2005) Peroxynitrite-induced relaxation in isolated rat aortic rings and mechanisms of action. *Toxicol Appl Pharmacol* 209:269–276.
- Liao Y, Kristiansen AM, Oksvold CP, Tuvnes FA, Gu N, Rundén-Pran E, et al. (2010) Neuronal  $\text{Ca}^{2+}$ -activated  $\text{K}^+$  channels limit brain infarction and promote survival. *PLoS One* 5:e15601.
- Lipton P (1999) Ischemic cell death in brain neurons. *Physiol Rev* 79:1431–1568.
- Liu Y, Terata K, Chai Q, Li H, Kleinman LH, Gutterman DD (2002) Peroxynitrite inhibits  $\text{Ca}^{2+}$ -activated  $\text{K}^+$  channel activity in smooth muscle of human coronary arterioles. *Circ Res* 91:1070–1076.
- Logallo N, Naess H, Idicula TT, Brogger J, Waje-Andreassen U, Thomassen L (2011) Serum uric acid: neuroprotection in thrombolysis. The Bergen NORSTROKE study. *BMC Neurol* 11:114.

- Luykenaar KD, El-Rahman RA, Walsh MP, Welsh DG (2009) Rho-kinase-mediated suppression of KDR current in cerebral arteries requires an intact actin cytoskeleton. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 296:917–926.
- Lyle AN, Deshpande NN, Taniyama Y, Seidel-Rogol B, Pounkova L, Du P, et al. (2009) Poldip2, a novel regulator of Nox4 and cytoskeletal integrity in vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 105: 249–259.
- Ma YH, Su N, Chao XD, Zhang YQ, Zhang L, Han F, Luo P, et al. (2012) Thioredoxin-1 attenuates post-ischemic neuronal apoptosis via reducing oxidative/nitrative stress. *Neurochem Int* 60:475–483.
- Macfarlane R, Moskowitz MA, Sakas DE, Tasemiroglu E, Wei EP, Kontos HA (1991) The role of neuroeffector mechanisms in cerebral hyperperfusion syndromes. *J Neurosurg* 75:845–855.
- Maiellaro-Rafferty K, Weiss D, Joseph G, Wan W, Gleason RL, Taylor WR (2011) Catalase overexpression in aortic smooth muscle prevents pathological mechanical changes underlying abdominal aortic aneurysm formation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 301:H355–H362.
- Maneen MJ, Hannah R, Vitullo L, DeLance N, Cipolla MJ (2006) Peroxynitrite diminishes myogenic activity and is associated with decreased vascular smooth muscle F-actin in rat posterior cerebral arteries. *Stroke* 37:894–899.
- Maneen MJ, Cipolla, MJ (2007) Peroxynitrite diminishes myogenic tone in cerebral arteries: role of nitrotyrosine and F-actin. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 292:1042–1050.
- Marín J, Rodríguez-Martínez MA (1997) Nitric oxide, oxygen-derived free radicals and vascular endothelium. *J Auton Pharmacol Ther* 15:279–307.

- Márquez-Martín A, Jiménez-Altayó F, Dantas AP, Caracuel L, Planas AM, Vila E (2012) Middle cerebral artery alterations in a rat chronic hypoperfusion model. *J Appl Physiol* 112:511–518.
- Marrelli SP, Eckmann MS, Hunte MS (2003) Role of endothelial intermediate conductance KCa channels in cerebral EDHF mediated dilations. *Am J Physiol* 285:H1590–H1599.
- Marrelli SP, Khorovets A, Johnson TD, Childres WF, Bryan RM Jr (1999) P2 purinoceptor-mediated dilations in the rat middle cerebral artery after ischemia-reperfusion. *Am J Physiol* 276:33–41.
- Mathiassen ON, Buus NH, Sihm I, Thybo NK, Mørn B, Schroeder AP, et al. (2007) Small artery structure is an independent predictor of cardiovascular events in essential hypertension. *J Hypertens* 25:1021–1026.
- McCord JM (1985) Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury. *N Engl J Med* 312:159–163.
- McCord JM, Fridovich I (1969) Superoxide dismutase. A enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein) *J Biol Chem* 244:6049–6055.
- McGrath JC, Arribas SM, Daly CJ, Gordon JF (1995) Confocal microscopy for structure and real-time pharmacology in blood vessels. *J Hum Hypertens* 9:645–647.
- McNeish AJ, Dora KA, Garland CJ (2005) Possible role for K<sup>+</sup> in endothelium-derived hyperpolarizing factor-linked dilatation in rat middle cerebral artery. *Stroke* 36:1526–1532.
- McNeish AJ, Garland CJ (2007) Thromboxane A<sub>2</sub> inhibition of SKCa after NO synthase block in rat middle cerebral artery. *Br J Pharmacol* 151:441–449.

- McNeish AJ, Jimenez-Altayo F, Cottrell GS, Garland CJ (2012) Statins and selective inhibition of Rho kinase protect small conductance calcium-activated potassium channel function (K(Ca)<sub>2.3</sub>) in cerebral arteries. *PLoS One* 7:e46735.
- McNeish AJ, Sandow SL, Neylon CB, Chen MX, Dora KA, Garland CJ (2006) Evidence for involvement of both IKCa and SKCa channels in hyperpolarizing responses of the rat middle cerebral artery. *Stroke* 37:1277–1282.
- Mehta JL, Chen LY, Kone BC, Mehta P, Turner P (1995) Identification of constitutive and inducible forms of nitric oxide synthase in human platelets. *J Lab Clin Med* 125:370–377.
- Meloche S, Pouyssegur J (2007) The ERK1/2 mitogen-activated protein kinase pathway as a master regulator of the G1- to S-phase transition. *Oncogene* 26:3227–3239.
- Michel JB, Thaunat O, Houard X, Meilhac O, Caligiuri G, Nicoletti A (2007) Topological determinants and consequences of adventitial responses to arterial wall injury. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 27:1259–1268.
- Miller AA, Drummond GR, Schmidt HH, Sobey CG (2005) NADPH oxidase activity and function are profoundly greater in cerebral versus systemic arteries. *Circ Res* 97:1055–1062.
- Miranda KM, Espey MG, Wink DA (2001) A rapid, simple spectrophotometric method for simultaneous detection of nitrate and nitrite. *Nitric Oxide* 5:62–71.

- Miura H, Bosnjak JJ, Ning G, Saito T, Miura M, Gutterman DD (2003) Role for hydrogen peroxide in flow-induced dilation of human coronary arterioles. *Circ Res* 92:e31–e40.
- Moldovan L, Irani K, Moldovan NI, Finkel T, Goldschmidt-Clermont PJ (1999) The actin cytoskeleton reorganization induced by Rac1 requires the production of superoxide. *Antioxid Redox Signal* 1:29–43.
- Mombouli JV, Vanhoutte PM (1997) Endothelium-derived hyperpolarizing factor(s): updating the unknown. *Trends Pharmacol Sci* 18:252–256.
- Momotani K, Artamonov MV, Utepbergenov D, Derewenda U, Derewenda ZS, Somlyo AV (2011) p63RhoGEF couples G $\alpha$ (q/11)-mediated signaling to Ca<sup>2+</sup> sensitization of vascular smooth muscle contractility. *Circ Res* 109:993–1002.
- Moncada S (1997) Nitric oxide in the vasculature: physiology and pathophysiology. *Ann N Y Acad Sci* 811:60–67.
- Moncada S, Palmer RM, Higgs EA (1991) Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev* 43:109–142.
- Motterlini R, Green CJ, Foresti R (2002) Regulation of heme oxygenase–1 by redox signals involving nitric oxide. *Antioxid Redox Signal* 4:615–624.
- Moskowitz MA, Macfarlane R, Tasdemiroglu E, Wei EP, Kontos HA (1990) Neurogenic control of the cerebral circulation during global ischemia. *Stroke* 21:168–171.
- Moskowitz MA, Lo EH, Iadecola C (2010) The science of stroke: mechanisms in search of treatments. *Neuron* 67:181–198.
- Mulvany MJ (2002) Small artery remodeling in hypertension. *Curr Hypertens Rep* 4:49–55.



- Mulvany MJ, Baumbach GL, Aalkjaer C, Heagerty AM, Korsgaard N, Schiffrin EL, et al. (1996) Vascular remodelling. *Hypertension* 28:505-506.
- Mulvany MJ, Halpern W (1976) Mechanical properties of vascular smooth muscle cells in situ. *Nature* 260:617–619.
- Mungrue IN, Gros R, You X, Pirani A, Azad A, Csont T, et al. (2002) Cardiomyocyte overexpression of iNOS in mice results in peroxynitrite generation, heart block, and sudden death. *J Clin Invest* 109:735–743.
- Murrell GA, Francis MJ, Bromley I (1990) Modulation of fibroblast proliferation by oxygen free radicals. *Biochem J* 265:659–665.
- Nieswandt B, Kleinschnitz C, Stoll G (2011) Ischaemic stroke: a thrombo-inflammatory disease? *J Physiol* 589:4115–4123.
- Nordberg J, Arner ES (2001) Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free Radic Biol Med* 31:1287–1312.
- Novensa L, Selent J, Pastor M, Sandberg K, Heras M, Dantas AP (2010) Equine estrogens impair nitric oxide production and endothelial nitric oxide synthase transcription in human endothelial cells compared with the natural 17 $\beta$ -estradiol. *Hypertension* 56:405–411.
- Olsen TS, Larsen B, Skriver EB, Herning M, Enevoldsen E, Lassen NA (1981) Focal cerebral hyperemia in acute stroke: incidence, pathophysiology and clinical significance. *Stroke* 12:598–607.
- Onetti Y, Meirelles T, Dantas AP, Schröder K, Vila E, Egea G, et al. (2016) NADPH oxidase 4 attenuates cerebral artery changes during the progression of Marfan syndrome. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 310:H1081–H1090.

- Osol G, Brekke JF, McElroy-Yaggy K, Gokina NI (2002) Myogenic tone, reactivity, and forced dilatation: a three-phase model of in vitro arterial myogenic behavior. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 283: H2260–H2267.
- Owens WB (2011) Blood pressure control in acute cerebrovascular disease. *J Clin Hypertens (Greenwich)* 13:205–211.
- Pacher P, Beckman JS, Liaudet L (2007) Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiol Rev* 87:315–424.
- Palmer RM, Ashton DS, Moncada S (1988) Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature* 333:664–666.
- Palomares SM, Cipolla MJ (2011) Vascular protection following ischemia and reperfusion. *J Neurol Neurophysiol* 20:S1–S004.
- Palomares SM, Cipolla MJ (2014) Myogenic tone as a therapeutic target for ischemic stroke. *Curr Vasc Pharmacol* 12:788–800.
- Pan J, Konstas AA, Bateman B, Ortolano GA, Pile-Spellman J (2007) Reperfusion injury following cerebral ischemia: pathophysiology, MR imaging, and potential therapies. *Neuroradiology* 49:93–102.
- Papadaki M, Tilton RG, Eskin SG, McIntire LV (1998) Nitric oxide production by cultured human aortic smooth muscle cells: stimulation by fluid flow. *Am J Physiol* 274:616–626.
- Papapetropoulos A, Desai KM, Rudic RD, Mayer B, Zhang R, Ruiz-Torres MP, et al. (1997) Nitric oxide synthase inhibitors attenuate transforming-growth-factor-beta 1-stimulated capillary organization in vitro. *Am J Pathol* 150:1835–1844.

- Paravicini TM, Touyz RM (2008) NADPH oxidases, reactive oxygen species, and hypertension: clinical implications and therapeutic possibilities. *Diabetes Care* 2:S170–S180.
- Paulson OB (1970) Regional cerebral blood flow in apoplexy due to occlusion of the middle cerebral artery. *Neurology* 20:63–77.
- Pérez-Asensio FJ, de la Rosa X, Jiménez-Altayó F, Gorina R, Martínez E, Messeguer A, et al. (2010) Antioxidant CR-6 protects against reperfusion injury after a transient episode of focal brain ischemia in rats. *J Cereb Blood Flow Metab* 30:638–652.
- Peterson EC, Wang Z, Britz G (2011) Regulation of cerebral blood flow. *Int J Vasc Med* 2011:823525.
- Pietraforte D, Salzano AM, Marino G, Minetti M (2003) Peroxynitrite-dependent modifications of tyrosine residues in hemoglobin. Formation of tyrosyl radical(s) and 3-nitrotyrosine. *Amino Acids* 25:341–350.
- Pires PW, Girgla SS, McClain JL, Kaminski NE, van Rooijen N, Dorrance AM (2013) Improvement in middle cerebral artery structure and endothelial function in stroke-prone spontaneously hypertensive rats after macrophage depletion. *Microcirculation* 20:650–661.
- Plane F, Garland CJ (1996) Influence of contractile agonists on the mechanism of endothelium-dependent relaxation in rat isolated mesenteric artery. *Br J Pharmacol* 119:191–193.
- Prasain N, Stevens, T (2009) The actin cytoskeleton in endothelial cell phenotypes. *Microvasc Res* 77:53–63.

- Puato M, Boschetti G, Rattazzi M, Zanon M, Pesavento R, Faggin E, et al. (2016) Intima-media thickness remodelling in hypertensive subjects with long-term well-controlled blood pressure levels. *Blood Press* 24:1-6.
- Pulsinelli WA, Waldman S, Rawlinson D, Plum F (1982) Moderate hyperglycemia augments ischemic brain damage: a neuropathologic study in the rat. *Neurology* 32:1239–1246.
- Quast MJ, Wei J, Huang NC, Brunder DG, Sell SL, Gonzalez JM, et al. (1997) Perfusion deficit parallels exacerbation of cerebral ischemia/reperfusion injury in hyperglycemic rats. *J Cereb Blood Flow Metab* 17:553–559.
- Rabelink TJ, Luscher TF (2006) Endothelial nitric oxide synthase: host defense enzyme of the endothelium? *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26:267–271.
- Radermacher KA, Wingler K, Langhauser F, Altenhofer S, Kleikers P, Hermans JJ, et al. (2013) Neuroprotection after stroke by targeting NOX4 as a source of oxidative stress. *Antioxid Redox Signal* 18:1418–1427.
- Rafikov R, Fonseca FV, Kumar S, Pardo D, Darragh C, Elms S, et al. (2011) eNOS activation and NO function: structural motifs responsible for the posttranslational control of endothelial nitric oxide synthase activity. *J Endocrinol* 210:271–284.
- Randriamboavonjy V, Kiss L, Falck JR, Busse R, Fleming I (2005) The synthesis of 20-HETE in small porcine coronary arteries antagonizes EDHF-mediated relaxation. *Cardiovas Res* 65:487–494.
- Rang HP, Dale MM, Ritter JM, Flower RJ (2016) Rang & Dale's Pharmacology. 8th ed. Elsevier Health Sciences, London.

- Redout EM, van der Toorn A, Zuidwijk MJ, van de Kolk CW, van Echteld CJ, Musters RJ, et al. (2010) Antioxidant treatment attenuates pulmonary arterial hypertension-induced heart failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 298:1038–1047.
- Rezaie AR (2014) Protease-activated receptor signalling by coagulation proteases in endothelial cells. *Thromb Haemost* 112:876–882.
- Rizzoni D, Porteri E, Boari GE, De Ciuceis C, Sleiman I, Muiesan ML, et al. (2003) Prognostic significance of small-artery structure in hypertension. *Circulation* 108:2230–2235.
- Rizzoni D, Rosei EA (2009) Small artery remodeling in diabetes mellitus. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 19:587–592.
- Romanos E, Planas AM, Amaro S, Chamorro A (2007) Uric acid reduces brain damage and improves the benefits of rt-PA in a rat model of thromboembolic stroke. *J Cereb Blood Flow Metab* 27:14–20.
- Sánchez-Ferrer CF, Marín J (1990) Endothelium-derived contractile factors. *Gen Pharmacol* 21:589–603.
- Sadow SL, Hill CE (2000) Incidence of myoendothelial gap junctions in the proximal and distal mesenteric arteries of the rat is suggestive of a role in endothelium-derived hyperpolarizing factor-mediated responses. *Circ Res* 86:341–346.
- Santos CX, Anjos EI, Augusto O (1999) Uric acid oxidation by peroxynitrite: multiple reactions, free radical formation, and amplification of lipid oxidation. *Arch Biochem Biophys* 372:285–294.
- Sappino AP, Masouyé I, Saurat JH, Gabbiani G (1990) Smooth muscle differentiation in scleroderma fibroblastic cells. *Am J Pathol* 137:585–591.

- Sase K, Michel T (1995) Expression of constitutive endothelial nitric oxide synthase in human blood platelets. *Life Sci* 57:2049–2055.
- Sastre E, Márquez-Rodas I, Blanco-Rivero J, Balfagón G (2010) Perivascular innervation of the superior mesenteric artery: pathophysiological implications. *Rev Neurol* 50:727–737.
- Schiffrin EL (2004) Remodeling of resistance arteries in essential hypertension and effects of antihypertensive treatment. *Am J Hypertens* 17:1192–1200.
- Schwarz PM, Kleinert H, Forstermann U (1999) Potential functional significance of brain-type and muscle-type nitric oxide synthase I expressed in adventitia and media of rat aorta. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 19:2584–2590.
- Schweizer S, Meisel A, Märschenz S (2013) Epigenetic mechanisms in cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 33:1335–1346.
- Shao Q, Cheng HJ, Callahan MF, Kitzman DW, Li WM, Cheng CP (2016) Overexpression myocardial inducible nitric oxide synthase exacerbates cardiac dysfunction and beta-adrenergic desensitization in experimental hypothyroidism. *Int J Cardiol* 204:229–241.
- Sharma SS, Gupta S (2007) Neuroprotective effect of MnTMPyP, a superoxide dismutase/catalase mimetic in global cerebral ischemia is mediated through reduction of oxidative stress and DNA fragmentation. *Eur J Pharmacol* 561:72–79.
- Shi Y, Zhang L, Pu H, Mao L, Hu X, Jiang X, et al. (2016) Rapid endothelial cytoskeletal reorganization enables early blood-brain barrier disruption and long-term ischaemic reperfusion brain injury. *Nat Commun* 7:10523.
- Shi ZD, Ji XY, Qazi H, Tarbell JM (2009) Interstitial flow promotes vascular fibroblast, myofibroblast, and smooth muscle cell motility in 3-D collagen I

via upregulation of MMP-1. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 297:H1225–H1234.

Shimokawa H, Yasutake H, Fujii K, Owada MK, Nakaike R, Fukumoto Y, et al. (1996) The importance of the hyperpolarizing mechanism increases as the vessel size decreases in endothelium-dependent relaxations in rat mesenteric circulation. *J Cardiovasc Pharmacol* 28:703–711.

Skinner KA, White CR, Patel R, Tan S, Barnes S, Kirk M, et al. (1998) Nitrosation of uric acid by peroxynitrite. Formation of a vasoactive nitric oxide donor. *J Biol Chem* 273:24491–24497.

Smeda JS, McGuire, JJ (2007) Effects of poststroke Losartan versus Captopril treatment on myogenic and endothelial function in the cerebrovasculature of SHRsp. *Stroke* 38:1590–1596.

Sobey CG, Cocks TM (1998) Activation of protease-activated receptor-2 (PAR-2) elicits nitric oxide-dependent dilatation of the basilar artery in vivo. *Stroke* 29:1439–1444.

Sobey CG, Heistad DD, Faraci FM (1997) Mechanisms of bradykinin-induced cerebral vasodilatation in rats. Evidence that reactive oxygen species activate K<sup>+</sup> channels. *Stroke* 28:2290–2294.

Sobey CG, Moffatt JD, Cocks TM (1999) Evidence for selective effects of chronic hypertension on cerebral artery vasodilatation to protease-activated receptor-2 activation. *Stroke* 30:1933–1940.

Soccio M, Toniato E, Evangelista V, Carluccio M, De Caterina R (2005) Oxidative stress and cardiovascular risk: the role of vascular NAD(P)H oxidase and its genetic variants. *Eur J Clin Invest* 35:305–314.

- Spector I, Shochet NR, Blasberger D, Kashman Y (1989) Latrunculins-novel marine macrolides that disrupt microfilament organization and affect cell growth: I. Comparison with cytochalasin D. *Cell Motil Cytoskeleton* 13:127–144.
- Squadrito GL, Cueto R, Splenser AE, Valavanidis A, Zhang H, Uppu RM, et al. (2000) Reaction of uric acid with peroxynitrite and implications for the mechanism of neuroprotection by uric acid. *Arch Biochem Biophys* 376:333–337.
- Stefanadis C, Vlachopoulos C, Karayannacos P, Boudoulas H, Stratos C, Filippides T, et al. (1995) Effect of vasa vasorum flow on structure and function of the aorta in experimental animals. *Circulation* 91:2669–2678.
- Stenmark KR, Yeager ME, El Kasmi KC, Nozik-Grayck E, Gerasimovskaya EV, Li M, et al. (2013) The adventitia: essential regulator of vascular wall structure and function. *Annu Rev Physiol* 75:23–47.
- Stevens A, Lowe J (2015) *Histología Humana*. 4th ed. Elsevier Health Sciences, Barcelona.
- Stuehr DJ, Cho HJ, Kwon NS, Weise MF, Nathan CF (1991) Purification and characterization of the cytokine-induced macrophage nitric oxide synthase: an FAD- and FMN-containing flavoprotein. *Proc Natl Acad Sci USA*. 88:7773–7777.
- Sumimoto H (2008) Structure, regulation and evolution of Nox-family NADPH oxidases that produce reactive oxygen species. *FEBS J* 275:3249–3277.
- Sumpio BE, Riley JT, Dardik A (2002) Cells in focus: endothelial cell. *Int J Biochem Cell Biol* 34:1508–1512.



- Sutliff RL, Hilenski LL, Amanso AM, Parastatidis I, Dikalova AE, Hansen L, et al. (2013) Polymerase delta interacting protein 2 sustains vascular structure and function. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 33:2154–2161.
- Szabó C, Zingarelli B, O'Connor M, Salzman AL (1996) DNA strand breakage, activation of poly (ADP-ribose) synthetase, and cellular energy depletion are involved in the cytotoxicity of macrophages and smooth muscle cells exposed to peroxynitrite. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:1753–1758.
- Szabó C, Papapetropoulos A (2011) Hydrogen sulphide and angiogenesis: mechanisms and applications. *Br J Pharmacol* 164:853–865.
- Tamura A, Asano T, Sano K (1980) Correlation between rCBF and histological changes following temporary middle cerebral artery occlusion. *Stroke* 11:487–493.
- Tayag EC, Nair SN, Wahhab S, Katsetos CD, Lighthall JW, Lehmann JC (1996) Cerebral uric acid increases following experimental traumatic brain injury in rat. *Brain Res* 733:287–291.
- Telo P, Lostaglio S, Dejana E (1997) Structure of intercellular junctions in the endothelium. *Therapie* 52:395–398.
- Terashima M, Ohashi Y, Azumi H, Otsui K, Kaneda H, Awano K, et al. (2009) Impact of NAD(P)H oxidase-derived reactive oxygen species on coronary arterial remodeling: a comparative intravascular ultrasound and histochemical analysis of atherosclerotic lesions. *Circ Cardiovasc Interv* 2:196–204.
- The National Institute of Neurological Disorders and Stroke rt-PA Stroke Study Group (1995) Tissue plasminogen activator for acute ischemic stroke. *N Engl J Med* 333:1581–1587.

- Thiyagarajan M, Kaul CL, Sharma SS (2004) Neuroprotective efficacy and therapeutic time window of peroxynitrite decomposition catalysts in focal cerebral ischemia in rats. *Br J Pharmacol* 142:899–911.
- Ti Y, Xie GL, Wang ZH, Ding WY, Zhang Y, Zhong M, et al. (2016) Tribbles 3: A potential player in diabetic aortic remodelling. *Diab Vasc Dis Res* 13:69–80.
- Tiago T, Ramos S, Aureliano M, Gutierrez-Merino C (2006) Peroxynitrite induces F-actin depolymerization and blockade of myosin ATPase stimulation. *Biochem Biophys Res Commun* 342:44–49.
- Tirilazad International Steering Committee (2000) Tirilazad mesylate in acute ischemic stroke: A systematic review. *Stroke* 31:2257–2265.
- Todd NV, Picozzi P, Crockard HA (1986) Quantitative measurement of cerebral blood flow and cerebral blood volume alter cerebral ischaemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 6:338–341.
- Touyz RM (2004) Reactive oxygen species, vascular oxidative stress, and redox signaling in hypertension: what is the clinical significance? *Hypertension* 44:248–252.
- Touyz RM (2005) Reactive oxygen species as mediators of calcium signaling by angiotensin II: implication in vascular physiology and pathophysiology. *Antioxid Redox Signal* 7:1302–1314.
- Touyz RM, Briones AM, Sedeek M, Burger D, Montezano AC (2011) NOX isoforms and reactive oxygen species in vascular health. *Mol Interv* 11:27–35.
- Traupe H, Kruse E, Heiss WD (1982) Reperfusion of focal ischemia of varying duration: postischemic hyper- and hypo-perfusion. *Stroke* 13:615–622.

- Tsuchida R, He QP, Smith ML, Siesjö BK (1997) Regional cerebral blood flow during and after 2 h of middle cerebral artery occlusion in the rat. *J Cereb Blood Flow Metab* 17:1066–1073.
- Tsuji K, Aoki T, Tejima E, Arai K, Lee SR, Atochin DN, et al. (2005) Tissue plasminogen activator promotes matrix metalloproteinase-9 upregulation after focal cerebral ischemia. *Stroke* 36:1954–1959.
- Uemura K, Goto K, Ishii K, Ito Z, Hen R, Kawakami H (1978) Sequential changes of regional cerebral circulation in cerebral infarction. *Neuroradiol* 16:228–232.
- Uemura Y, Miller JM, Matson WR, Beal MF (1991) Neurochemical analysis of focal ischemia in rats. *Stroke* 22:1548–1553.
- Valdez LB, Alvarez S, Arnaiz SL, Schopfer F, Carreras MC, Poderoso JJ, et al. (2000) Reactions of peroxynitrite in the mitochondrial matrix. *Free Radic Biol Med* 29:349–56.
- Vallance P, Collier J, Moncada S (1989) Effects of endothelium-derived nitric oxide on peripheral arteriolar tone in man. *Lancet* 2:997–1000.
- Vessièrès E, Freidja ML, Loufrani L, Fassot C, Henrion D (2012) Flow (shear stress)-mediated remodeling of resistance arteries in diabetes. *Vascul Pharmacol* 57:173–178.
- Wagenseil JE, Mecham RP (2009) Vascular extracellular matrix and arterial mechanics. *Physiol Rev* 89:957–989.
- Wakatsuki T, Schwab B, Thompson NC, Elson EL (2001) Effects of cytochalasin D and latrunculin B on mechanical properties of cells. *J Cell Sci* 114:1025–1036.

- Walsh JG, Muruve DA, Power C (2014) Inflammasomes in the CNS. *Nat Rev Neurosci* 15:84–97.
- Warner DS, Sheng H, Batinić-Haberle I (2004) Oxidants, antioxidants and the ischemic brain. *J Exp Biol* 207:3221–3231.
- Webb RC (2003) Smooth muscle contraction and relaxation. *Adv Physiol Educ* 27:201–206.
- Welch G, Loscalzo J (1994) Nitric oxide and the cardiovascular system. *J Card Surg* 9:361–371.
- White CR, Brock TA, Chang LY, Crapo J, Briscoe P, Ku D, et al. (1994) Superoxide and peroxynitrite in atherosclerosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:1044–1048.
- Whiteman M, Ketsawatsakul U, Halliwell B (2002) A reassessment of the peroxynitrite scavenging activity of uric acid. *Ann N Y Acad Sci* 962:242–259.
- Wight TN (2008) Arterial remodeling in vascular disease: a key role for hyaluronan and versican. *Front Biosci* 13:4933–4937.
- Wong LC, Langille BL (1996) Developmental remodeling of internal elastic lamina of rabbit arteries: effect of blood flow. *Circ Res* 78:799–805.
- Wu XW, Muzny DM, Lee CC, Caskey CT (1992) Two independent mutational events in the loss of urate oxidase during hominoid evolution. *J Mol Evol* 34:78–84.
- Xu J, Zou MH (2009) Molecular insights and therapeutic targets for diabetic endothelial dysfunction. *Circulation* 120:1266–1286.
- Xu S, Touyz RM (2006) Reactive oxygen species and vascular remodelling in hypertension: still alive. *Can J Cardiol* 22:947–951.

- Yamagami S, Miyamoto O, Nakamura T, Okada Y, Negi T, Hayashida Y, et al. (1998) Suppression of hyperemia after brain ischemia by L-threo-3,4-dihydroxyphenylserine. *Neuroreport* 9:2939–2943.
- Yamashita A, Shoji K, Tsuruda T, Furukoji E, Takahashi M, Nishihira K, et al. (2008) Medial and adventitial macrophages are associated with expansive atherosclerotic remodeling in rabbit femoral artery. *Histol Histopathol* 23:127–136.
- Yamashita K, Kotani Y, Nakajima Y, Shimazawa M, Yoshimura S, Nakashima S, et al. (2007) Fasudil, a Rho kinase (ROCK) inhibitor, protects against ischemic neuronal damage in vitro and in vivo by acting directly on neurons. *Brain Res* 1154:215–224.
- Yang GY, Betz AL (1994) Reperfusion-induced injury to the blood-brain barrier after middle cerebral artery occlusion in rats. *Stroke* 25:1658–1664.
- You J, Johnson TD, Marrelli SP, Bryan RM Jr (1999) Functional heterogeneity of endothelial P2 purinoceptors in the cerebrovascular tree of the rat. *Am J Physiol* 277:H893–H900.
- Yu S, Liebeskind DS, Dua S, Wilhalme H, Elashoff D, Qiao XJ, et al, UCLA Stroke Investigators (2015) Postischemic hyperperfusion on arterial spin labeled perfusion MRI is linked to hemorrhagic transformation in stroke. *J Cereb Blood Flow Metab* 35:630–637.
- Yu ZF, Bruce-Keller AJ, Goodman Y, Mattson MP (1998) Uric acid protects neurons against excitotoxic and metabolic insults in cell culture, and against focal ischemic brain injury in vivo. *J Neurosci Res* 53:613–625.
- Zhang RL, Chopp M, Chen H, Garcia JH (1994) Temporal profile of ischemic tissue damage, neutrophil response, and vascular plugging following

permanent and transient (2H) middle cerebral artery occlusion in the rat. *J Neurol Sci* 125:3–10.

Zhang RZ, Yang Q, Yim AP, Huang Y, He GW (2004) Different role of nitric oxide and endothelium derived hyperpolarizing factor in endothelium-dependent hyperpolarization and relaxation in porcine coronary arterial and venous system. *J Cardiovasc Pharmacol* 43:839–850.

Zielonka J, Vasquez-Vivar J, Kalyanaraman B (2008) Detection of 2-hydroxyethidium in cellular systems: a unique marker product of superoxide and hydroethidine. *Nat Protoc* 3:8-2.

Referencias correspondientes a las páginas *web* utilizadas:

<http://www.lab.anhb.uwa.edu.au/mb140>

<http://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2015/ra/c4ra17255h>

<http://www.reumatologiaclinica.org/es/tecnicas-inmunologicas-que-apoyan-el/articulo/13149602/>

<https://www.thermofisher.com/es/es/home/life-science/protein-biology/protein-assays-analysis/overview-active-gtpase-pull-down-detection-kits.html>

[http://www.waters.com/waters/es\\_ES/How-Does-High-Performance-Liquid-ChromatographWork%3F/nav.htm?cid=10049055&locale=es\\_ES](http://www.waters.com/waters/es_ES/How-Does-High-Performance-Liquid-ChromatographWork%3F/nav.htm?cid=10049055&locale=es_ES)