



Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Estudios Superiores Iztacala

ANÁLISIS DEL EFECTO DE LA INMUNIZACIÓN CON COP-1 (COPAXONA) SOBRE LA EXPRESIÓN DE FACTORES NEUOTRÓFICOS EN LA ZONA DE LESIÓN DE ANIMALES CON ISQUEMIA CEREBRAL FOCAL CON REPERFUSIÓN.

Que para obtener el título de BIÓLOGO presenta:

Jonathan Julio Ismael Lorea Hernández

Director de tesis:

Dr. José Juan Antonio Ibarra Arias

Sinodales:

Dr. Adolfo René Méndez Cruz

Dr. Diego Julio arenas Aranda

Dr. Eduardo Barrera Escorcía

Dr. José Rafael Jiménez Flores



Los Reyes Iztacala, Estado de México, 2011



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

INTRODUCCIÓN	4
MARCO TEÓRICO.....	6
Anatomía del cerebro	6
<i>Mielencéfalo</i>	6
<i>Metencéfalo</i>	6
<i>Mesencéfalo</i>	7
<i>Diencéfalo</i>	8
<i>Telencéfalo</i>	8
<i>Fibras corticales</i>	12
<i>Localización cortical de las funciones neurologicas.</i>	13
Isquemia cerebral	14
Fisiopatología de la isquemia cerebral.....	14
La penumbra isquémica.....	16
Autorreactividad protectora.....	21
Copolimero-1 (Cop-1), mecanismo de inmunomodulacion	23
Factores neurotróficos.....	24
JUSTIFICACIÓN	27
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	28
MATERIALES Y MÉTODOS.....	29
Definición de variables:.....	33
RESULTADOS.....	36
Evaluaciones neurológicas.....	36
Factores neurotróficos.....	38

DISCUSIÓN	43
CONCLUSIONES	43
PERSPECTIVAS.....	49
BIBLIOGRAFIA.	50

INTRODUCCIÓN

El cerebro es el órgano más complejo del sistema nervioso central (SNC), controla y regula las acciones y reacciones del cuerpo. El desarrollo evolutivo de este órgano en el ser humano le ha conferido una capacidad superior de aprendizaje, una memoria privilegiada y principalmente le confiere el poder del raciocinio (Schuster, 1996). Pese a su importancia este órgano es un sistema frágil, vulnerable como todos los componentes del cuerpo a factores patológicos, externos e internos.

Las enfermedades cerebro-vasculares (ECV) son un grupo de patologías de etiología heterogénea, donde por una isquemia o hemorragia un área del encéfalo es afectado de forma transitoria o permanente (Diez, 2001). En nuestro país en el año 2008 las ECV ocuparon el sexto lugar dentro de las 10 principales causas de mortalidad general (INEGI, 2008), además se han considerado como la principal causa de incapacidad laboral a nivel mundial y así mismo la segunda de mortalidad en adultos de países desarrollados (Murray, 1997). Isquemia y hemorragia tienen una proporción en torno al 85 y 15 por ciento de incidencia respectivamente, de esta manera la isquemia es una línea de investigación de alto interés para el ámbito de la salud. Se han desarrollado diversos modelos para su estudio, entre ellos se encuentra el de isquemia cerebral focal. Este modelo es altamente reproducible y de gran utilidad para evaluar diferentes estrategias terapéuticas.

A pesar de los esfuerzos realizados para encontrar el tratamiento que disminuya o evite el daño y que además provea los elementos necesarios para la restauración del tejido, las estrategias terapéuticas que existen hasta hoy para este tipo de enfermedades no son satisfactorias y los resultados son muy limitados (Kumai, 2004; Saigal, 2004).

Existen estudios que han demostrado el efecto favorable del COP-1 sobre la preservación del tejido neuronal después de un fenómeno isquémico (Ibarra,

2007). Por otra parte, la inmunización con COP-1 también puede ser capaz de promover la restauración del tejido (Gorantla, 2007), además de que se ha reportado que los linfocitos T anti-COP-1 liberan factores neurotróficos y también estimulan la liberación por parte de otras células de estos factores. En la presente tesis se evaluará la capacidad de la inmunización con cop-1 para incrementar la concentración de factores neurotróficos en el sitio de lesión de animales sometidos a una isquemia cerebral focal con reperusión.

MARCO TEÓRICO

Anatomía del cerebro

Dentro de la neuroanatomía el cerebro de los cordados generalmente es dividido en 6 grandes regiones:

Mielencéfalo

Representado por el bulbo raquídeo, inicia en el límite del primer nervio cervical y termina justo en la protuberancia por el surco transversal. La superficie del bulbo posee cisuras y surcos longitudinales que sirven para dividirlo en diversas áreas.

El bulbo raquídeo es la zona por donde se conducen las vías principales de fibras nerviosas entre la médula espinal y el cerebro; también es el sitio responsable de funciones autónomas vitales como la digestión, la respiración y el control de la frecuencia cardíaca (Ranson et al., 1963).

Metencéfalo

Este constituido de 2 porciones, la primera es el cerebelo. Esta porción del encéfalo está formada por tres partes:

- Porción central única.
- El vermis.
- Dos hemisferios.

Los largos y angostos pliegues de la Folia, cubren un núcleo central de sustancia blanca que continúa de un hemisferio al otro a través del vermis, embebidos en este centro medular, se encuentran grupos de sustancia gris, los cuales son llamados los núcleos cerebelosos, el mayor y más lateral es el núcleo dentado (House et al., 1992) .

El cerebelo regula la fuerza y la amplitud de los movimientos, participa también en el desarrollo del aprendizaje de las capacidades motoras. (Ranson et al., 1963)

La protuberancia es la otra región, también es llamada puente, su superficie dorsal está completamente cubierta por el cerebelo, donde forma la base o piso del cuarto ventrículo; su superficie ventral es convexa tanto longitudinalmente como transversalmente, el surco mediano llamado surco basilar se extiende a todo lo largo de la superficie ventral, las raíces del nervio trigémino emergen de la cara ventrolateral del puente. Este sistema intrincado de fibras conecta el bulbo raquídeo con los hemisferios cerebrales. En la protuberancia se localizan los núcleos para el quinto, sexto, séptimo y octavo (V, VI, VII y VIII) pares de nervios craneales (Tortora G. y Derrickson B., 2006).

Mesencéfalo

El tectum está compuesto por cuatro abultamientos redondeados: los cuerpos cuadrigéminos o colículos, dos surcos en forma de cruz dividen a los cuatro abultamientos en dos pares de colículos superiores e inferiores. (House et al., 1992)

La cavidad del mesencéfalo, el acueducto cerebral (de Silvio), es un pequeño canal casi siempre triangular con el vértice dirigido centralmente, está rodeado por una zona gruesa de materia gris que se continúa a lo largo del tercer ventrículo, dorsal al acueducto se halla el tectum, formado por sustancia blanca y sustancia gris. De manera ventral al acueducto, se encuentran los pedúnculos de la base y el Tegmento; el primero está compuesto por un área grande de fibras que corren longitudinalmente, el tegmento es un área de formación reticular compuesta por masas nucleares grises como de fibras continuas; entre la base de los pedúnculos y el tegmento, se interpone una zona de color más oscuro; la sustancia negra (Ranson et al., 1963).

El mesencéfalo controla principalmente muchas de las funciones motoras y sensitivas, como los movimientos oculares y la coordinación de los reflejos visuales y auditivos (House et al., 1992).

Diencefalo.

Constituido por 2 estructuras también. El tálamo es la que ocupa la mayor parte del diencefalo y está limitado centralmente por el surco hipotalámico. El tálamo se presenta como dos masas ovals oblicuamente dispuestas con su eje mayor extendido desde el tubérculo caudado anterior; es una gran masa de materia gris dividida en cierto número de grupos nucleares. Éste procesa la información que llega a la corteza cerebral procedente del resto del SNC (House et al., 1992).

El hipotálamo está formado por varias regiones: láminas terminales, el receso óptico, el quiasma óptico, el tuber cinereum y los cuerpos mamilares. La parte media del hipotálamo es predominantemente celular y contiene muchos grupos nucleares; la porción lateral contiene células nerviosas dispersas y abundantes fibras mielínicas que corren longitudinalmente. (Tortora G. and Derrickson B., 2006)

Constituye una parte muy pequeña del volumen del encéfalo anterior y sin embargo juega un papel muy importante en la organización de una variedad de procesos autónomos y de la conducta, es fundamental para la regulación de la temperatura, el metabolismo del agua y el metabolismo en general; modula y controla las respuestas simpáticas y parasimpáticas, algunos de estos procesos involucran interacciones de las neuronas hipotalámicas y de la hipófisis, en consecuencia, controlan la función endocrina (House et al., 1992).

Telencéfalo

El telencéfalo está constituido por diferentes estructuras, una es bulbo olfatorio que ocupa el surco olfatorio en la superficie basal del lóbulo frontal; corre posteriormente dentro del triángulo olfatorio proyectándose hacia delante como un largo y delgado tallo, mostrando un abultamiento terminal, lo que es propiamente el bulbo, éste, está en contacto con el saco nasal, al cual da cierto número de finos haces nerviosos, los cuales en conjunto constituyen el nervio olfatorio o primer nervio craneal (Tortora G. y Derrickson B., 2006).

Los ganglios basales son cuatro masas nucleares comprenden los ganglios basales: el caudado, el lenticular, la amígdala y el claustró. Cuando la cápsula

interna y los núcleos caudado y lenticular adyacentes se consideran en conjunto, se les llama cuerpo estriado (Ranson et al., 1963).

Los ganglios basales están comprometidos como otro componente de los sistemas motores, su principal responsabilidad es modular la actividad de la corteza sensorio motora (Tortora G. and Derrickson B., 2006).

La última es la corteza cerebral forma una lámina gris replegada sobre sí misma que cubre los hemisferios cerebrales cuyo grosor varía de 4mm en la circunvolución cerebral anterior a 1.25mm cerca del polo occipital. Los hemisferios cerebrales están divididos en lóbulos por distintas cisuras o surcos (Tortora G. y Derrickson B., 2006), formando cuatro de ellos (Figura 1).

LÓBULO FRONTAL.- Está limitado en la parte posterior por el surco central (cisura de Rolando) y en la inferior por la cisura cerebral lateral (cisura de Silvio); este lóbulo se ocupa en gran medida de la planificación de acciones futuras y del control del movimiento (Kandel et al., 2000).

LÓBULO PARIETAL.- Este lóbulo yace posterior al surco central que lo separa del lóbulo frontal. En su parte inferior está separado del lóbulo temporal por la cisura lateral y por una línea que se extiende desde el ángulo de la rama posterior de la cisura lateral hasta el polo occipital. En esta región se desarrollan y controlan las sensaciones somáticas, con la formación del esquema corporal y la relación de éste con el espacio extra personal (Kandel et al., 2000).

LÓBULO OCCIPITAL.-Solamente una pequeña porción de este lóbulo se ve desde el costado lateral. Está separado delante de los lóbulos parietal y temporal por una línea que se extiende del extremo superior de la cisura parieto-occipital a la escotadura pre-occipital. En este lóbulo se controla principalmente la visión (Kandel et al., 2000)

LÓBULO TEMPORAL.- Está separado de la frontal por la cisura cerebral lateral, y del lóbulo parietal por una línea arbitraria trazada entre el ángulo occipital. En él se controla la audición y a través de sus estructuras profundas, controla aspectos del aprendizaje, la memoria y las emociones (Kandel et al., 2000).

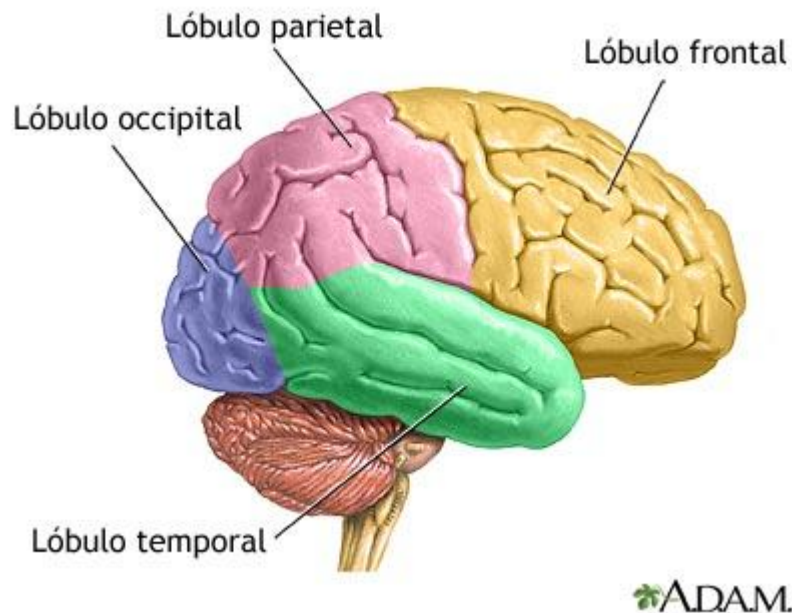


Figura 1. Organización de la porción cortical del cerebro humano en los 4 diferentes lóbulos anteriormente descritos.

La organización de la corteza cerebral se caracteriza por dos rasgos importantes:

1) Cada hemisferio se ocupa fundamentalmente de los procesos sensitivos y motores del lado contralateral del cuerpo; por lo tanto, la información sensitiva que llega a la médula espinal desde la parte izquierda del cuerpo, cruza al lado derecho del sistema nervioso en su camino hacia la corteza

2) Aunque los hemisferios son de aspecto similar, no son completamente simétricos respecto a su estructura ni equivalentes en cuanto a su función. (Tortora G. and Derrickson B., 2006) En la corteza ingresan fibras mielinicas procedentes del centro blanco formando haces que en general tienen dirección perpendicular a la superficie cortical; estos haces separan las células nerviosas en grupos columnares, disposición que da a la corteza una estratificación radial. (House et al., 1992)

Las neuronas de la corteza están dispuestas en capas bastante bien definidas, cada capa está conformada por diferentes tipos de neuronas (House et al., 1992).

Constitución celular de la corteza cerebral

La corteza cerebral cubre la superficie de los hemisferios y se constituye de los siguientes tipos de células y capas:

CÉLULAS PIRAMIDALES. Son las más características del sistema nervioso y su distribución abarca todas las regiones corticales; su soma es piramidal y su vértice está orientado hacia la parte superficial del que emerge una dendrita apical larga, en ocasiones asciende hasta la capa molecular de la corteza y emite colaterales en los estratos que atraviesa; según su tamaño se clasifican en pequeñas, medianas, grandes y gigantes, éstas últimas llamadas de Betz, se encuentran en la corteza motora precentral. (Valverde, 2002)

CÉLULAS GRANULOSAS O ESTRELLADAS. Tienen un cuerpo celular pequeño, redondeado o poligonal y presentan un gran número de dendritas que se expanden a corta distancia en todos los sentidos del soma; su axón es corto y se encuentran en toda la región cortical.

CÉLULAS FUSIFORMES. Algunos neurólogos las consideran como células piramidales modificadas, se encuentran principalmente en la sexta capa cortical; su soma es fusiforme, ovoide, poligonal, etc.; sus dendritas se ramifican en las capas supraadyacentes y su axón se dirige a la sustancia blanca sub-cortical.

CÉLULAS HORIZONTALES DE CAJAL. Presentan un cuerpo fusiforme y se encuentran en la capa molecular, sus dendritas se arborizan cerca del soma y el axón se distribuye horizontalmente en el estrato en que se encuentran.

CÉLULAS DE MARTINOTTI. Se encuentran en diferentes capas corticales, su axón se dirige a los estratos superficiales (emite colaterales) hasta alcanzar la capa molecular donde se ramifica.

CÉLULAS ESPECIALES. En algunas regiones de la corteza existen tipos particulares de células: las piramidales gigantes de Betz en la V capa de la corteza motora; las

células gigantes de Meynert en la corteza occipital, las células mitrales en el bulbo olfatorio etc.

CAPAS CORTICALES. En el isocortex se reconocen seis capas con características estructurales definidas. De la superficie a la profundidad son las siguientes:

CAPA MOLECULAR (DENOMINADA TAMBIÉN PLEXIFORME). Está constituido por dendritas situadas en capas más profundas y eventualmente por axones de las células Martinotti; contiene células horizontales de soma pequeño cuyas prolongaciones se distribuyen tangencialmente en ésta capa.

CAPA GRANULAR EXTERNA. Contiene células granulares o estrelladas, células de Martinotti y piramidales de pequeño tamaño.

CAPA DE CÉLULAS PIRAMIDALES. En éste estrato se encuentran numerosas células piramidales de mediano tamaño y algunas grandes en la zona profunda.

CAPA GRANULAR INTERNA. En ella abundan las células granulares y se hacen escasas las piramidales; así mismo, se recibe la información sensorial específica que procede de los núcleos talámicos correspondientes.

CAPA GANGLIONAR O DE CÉLULAS PIRAMIDALES GRANDES. Contiene células piramidales de gran tamaño y en el área motora se encuentran células gigantes de Betz cuyos axones se incorporan al sistema córtico-espinal conduciendo impulsos a las motoneuronas.

CAPA POLIMÓRFICA O MULTIFORME. Está formada por células fusiformes, triangulares, redondeadas, etc., cuyos axones se dirigen a la sustancia blanca subcortical (López, 2003; Kandel, 2001).

Fibras corticales

La corteza cerebral recibe fibras aferentes y emite fibras eferentes; las aferentes proceden del tálamo (tálamocorticales), de regiones corticales del mismo hemisferio (asociación intrahemisférica) o del hemisferio ipsilateral (comisurales) (Valverde, 2002).

Fibras tálamocorticales. Casi todos los impulsos que provienen de niveles subcorticales alcanzan la corteza a través del tálamo, una proporción proviene de núcleos talámicos específicos relacionados con los sistemas sensoriales: núcleo ventral posterior (somestesia), cuerpo geniculado lateral (visión), cuerpo geniculado medial (audición) o con el cerebelo (núcleo ventral lateral); ésta proyección tálamocortical se organiza de manera precisa, de modo que una región talámica determinada está en relación con una zona particular de la corteza. Las fibras talámicas que proceden de los núcleos sensoriales específicos terminan básicamente en la capa IV, donde los axones se arborizan profusamente (López, 2003).

Localización cortical de las funciones neurológicas.

La idea de que determinadas zonas de la corteza ejercen funciones especiales ha sido muy estudiada, demostrando que si bien, si se pueden identificar algunas zonas funcionales, hay que recordar y poner énfasis en que el SN trabaja normalmente en forma integrada. (Kandel et al., 2000)

La región generalmente denominada área motora o área 4 de Brodmann, está constituida principalmente por células piramidales gigantes (de Betz); aproximadamente éstas incluyen una parte del lóbulo frontal anterior al surco cerebral y parte del lóbulo parietal inmediatamente posterior a este surco, estas dos regiones se conocen como corteza sensoriomotora e incluyen las áreas de Brodmann 8, 6 y 4 de la corteza frontal y las áreas 3, 1, 2 y 5 del lóbulo parietal. (House et al., 1992)

Las principales funciones de la corteza motora son:

- 1.- Es la única capaz de iniciar movimientos voluntarios aislados.
- 2.- Facilita los mecanismos fundamentales para el mantenimiento del tono muscular.
- 3.- Mantiene los reflejos profundos a un umbral bajo (Guyton and Hall, 2000).

Isquemia cerebral

El término ictus representa de forma genérica un grupo de trastornos que incluyen el infarto cerebral, la hemorragia cerebral y la hemorragia subaracnoidea (Diez, 2001). La mayor parte de ictus son de tipo isquémico, como ya se había mencionado, y tienen su origen en el estrechamiento gradual (aterotrombosis) o en la oclusión súbita (embolismo) de alguna de las grandes arterias cerebrales, el fenómeno común a los distintos subtipos etiológicos de ictus se denomina isquemia cerebral, que se define como la reducción del aporte sanguíneo hasta niveles insuficientes para mantener el metabolismo y funcionamiento normales de las células cerebrales (Torregrosa, 2007).

Fisiopatología de la isquemia cerebral

Los procesos fisiopatológicos de la isquemia cerebral son el resultado de una secuencia de fenómenos celulares y moleculares a corto y largo plazo que confluyen en 2 modalidades de muerte celular necrosis y apoptosis. Generalmente después de producirse una lesión (lesión primaria) se desencadenan una serie de mecanismos que originan una destrucción mayor del tejido neural (lesión secundaria). La lesión primaria está directamente relacionada con el déficit energético, donde la insuficiencia de oxígeno y nutrientes resultan en la necrosis del tejido, generando el denominado infarto cerebral. Al regresar la perfusión, la zona antes isquémica se ve una vez más abastecida de oxígeno y glucosa y en algunas áreas afectadas por la isquemia se presentan una serie de procesos que pueden aumentar la pérdida de tejido nervioso, entre los que se encuentra la segunda modalidad de muerte celular, la apoptosis, que requiere de un adecuado aporte energético para llevarse a cabo (Lemke y cols. 1987 ; Arango, 2004).

Durante un episodio isquémico existen condiciones que determinan la aparición de un infarto, algunos son la hipoxia, la hipoglucemia, las alteraciones del flujo sanguíneo cerebral y el estado de la circulación colateral entre otras. Si la isquemia es focalizada, estos factores se suman a la heterogeneidad que existe

en la reducción del flujo sanguíneo dentro de la región afectada, se pueden generar entonces 2 zonas con características particulares y definidas que se pueden distinguir en parte por la integridad estructural de las neuronas halladas en estas y el momento en que se presenta necrosis (figura 2). La primera de estas zonas es la de infarto, también denominada “foco isquémico”, donde la muerte celular es de tipo necrótica y que corresponde a la región irrigada directamente por la arteria que haya sido ocluida. La segunda es una zona donde la isquemia no ha sido tan severa gracias a los aportes de la circulación colateral, esta es la zona de “penumbra isquémica” donde se presenta muerte de tipo necrótica si las condiciones no se restablecen a nivel de homeostasis, se plantea un período de 4-8 h en el que las células "en riesgo" pueden permanecer viables mediante la reperfusión o la administración de fármacos que eviten la extensión del área de penumbra dentro del infarto (Alexandrova, 2005; Sánchez, 1999); de no ser así, la cascada isquémica se torna imparable y es incluso ocasionada por una reperfusión incompleta (falta de reflujo). Lo que lleva a que se presenten fenómenos como “maduración del infarto” y “daño cerebral tardío” que pueden ser minimizados con citoprotectores en un tiempo de 8-12 h; también se puede presentar apoptosis o muerte celular programada en el área después de la reperfusión (Arango, 2004; Mergenthaler, 2004).

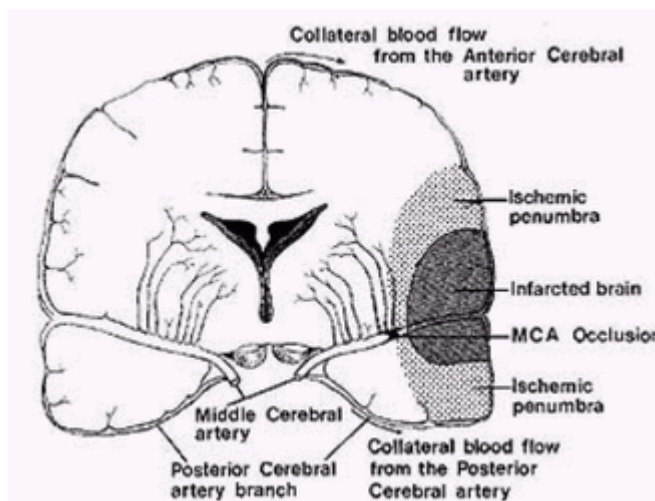


Figura 2. Tras un evento isquémico por oclusión de la arteria cerebral medio o MCAO (del inglés Middle Cerebral Artery Occlusion) se generan 2 zonas:

infarto cerebral (foco isquémico) y penumbra isquémica. Se muestran también la dinámica del flujo colateral que atenúa el proceso isquémico en la zona de penumbra.

La penumbra isquémica

Después de un episodio isquémico focalizado se puede distinguir una zona moderadamente hipoperfundida que se encuentra entre la zona del infarto y el parénquima cerebral normalmente perfundido donde el flujo sanguíneo cerebral es mayor a 50ml/100g/min, su extensión depende directamente de la circulación colateral; en ella se logran diferenciar dos regiones: una ligeramente hipoperfundida con flujo sanguíneo cerebral mayor a 22ml/100g/min en la que la transformación en infarto sólo sucede en circunstancias especialmente adversas, esta se denomina zona oligohémica, y la otra, que es denominada penumbra isquémica, con una perfusión cerebral críticamente disminuida equivalentes a valores menores de 22ml/100g/min, pero en la que el consumo de oxígeno es todavía suficiente para preservar la supervivencia tisular (Castillo et al., 2003)

Las neuronas que se encuentran dentro de la penumbra isquémica conservan su integridad estructural, pero su funcionalidad ha sido abolida.

Una vez iniciado el episodio isquémico el flujo sanguíneo se reduce y la cantidad de oxígeno en la región afectada deja de ser suficiente para mantener el metabolismo oxidativo de la glucosa, lo que origina acidosis tisular al acumularse lactato vía glucólisis anaerobia. (Cheng et al., 2004) ya que el ácido pirúvico no entra al ciclo de Krebs, originando la consiguiente disminución de ATP, en consecuencia todas las reacciones y mecanismos dependientes de ATP cesan. Entre ellos las bombas intercambiadoras de iones; los fallos de las bombas de Na^+ y K^+ originan una rápida depleción de K^+ intracelular provocando la despolarización de la membrana neural. Una vez despolarizada la membrana se liberan de forma indiscriminada diversos aminoácidos neuroexcitadores, entre los que se encuentra el glutamato que produce una hiperexcitación de los receptores

glutamatergicos de N-metil-D-aspartato (NMDA) ionotróficos y metabotróficos, y los receptores del ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropionico (AMPA) lo que confluye en la muerte de la neurona por un aumento masivo de calcio intracelular (García, 1999). Además la sobreexcitación de los receptores de AMPA lleva también al aumento en las concentraciones intracelulares de Na^+ y Cl^- . En conjunto esto produce un desajuste masivo de la homeostasis iónica, entrada pasiva de agua al interior de la célula (edema celular). Los cambios en el volumen celular pueden finalizar con la lisis osmótica de la neurona. La exitotoxicidad puede ser también la señal de inicio para la apoptosis y procesos inflamatorios.

Al ser incapaz de mantener la polarización de la membrana en la neurona se bloquean los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje y se desbloquean los canales de Ca^{2+} dependientes de los receptores (Castillo, 2004) ocasionando un incremento en la concentración de este ión de manera intracelular, como consecuencia, el calcio provoca una cascada metabólica que activa enzimas proteolíticas y lipolíticas que pueden llevar a abolir de forma irreversible la regulación del metabolismo neuronal. (Castillo et al., 2003) La activación de la fosfolipasa A2 produce ácido araquidónico que origina tromboxanos A2 y leucotrienos, con acción vasoconstrictora y promotora de agregación plaquetaria, evitando un posible reflujo sanguíneo. La activación enzimática induce degradación proteica, despolimerización de microtúbulos, liberación de calcio de los depósitos intracelulares, liberación de neurotransmisores y, en definitiva, daño de membrana y de los propios canales de calcio, cerrando un círculo que amplificaría el daño celular. (Hansen, 1989).

Durante la isquemia y, especialmente, durante la reperfusión se generan radicales libres. El producto de la reacción del superóxido y el óxido nítrico, que es generado después de los tipos dependientes de calcio-calmodulina de la óxido nítrico sintasa, es el más altamente reactivo de los radicales peróxido nitrito.

Otro factor como la activación de la microglía, en colaboración con los astrocitos, también contribuye al daño tisular isquémico a través de varios mecanismos, como

la producción de citocinas, óxido nítrico o NO (del inglés nitric oxide) y otros radicales libres (castillo, 2003).

Los radicales pueden reaccionar prácticamente con todos los elementos que conforman a la célula, desde fosfolípidos hasta ácidos nucleicos. Estos compuestos producen los estados iniciales y tardíos de la isquemia cerebral mediante mecanismos fisiopatológicos diferentes: se producen especies reactivas de oxígeno por el metabolismo del ácido araquidónico y la NO sintasa neuronal; en estados intermedios, los radicales libres de oxígeno son el aporte correspondiente a la infiltración de neutrófilos en área isquémica, y en estados ms tardíos interviene en la síntesis y activación de las enzimas NO sintasa inducible (iNOS) y la ciclooxigenasa-2 (COX-2) (Mergenthaler, 2004; Arango, 2004)

Como ya se ha mencionado, en la zona de penumbra la muerte neuronal es en parte el resultado de un proceso apoptótico (Traystman, 1991). Como consecuencia de la acción de endonucleasas o de las ROS el DNA sufre daños, se da inicio al mecanismo autodestructivo en el que implica una alteración de la expresión genética; también las reducciones moderadas del ATP mitocondrial originan la liberación de caspasas y citocromo c, que actúan como iniciadores de la muerte neuronal apoptótica. (Castillo, 2003) Todos los eventos bioquímicos se pueden sintetizar y agrupar en el siguiente diagrama:

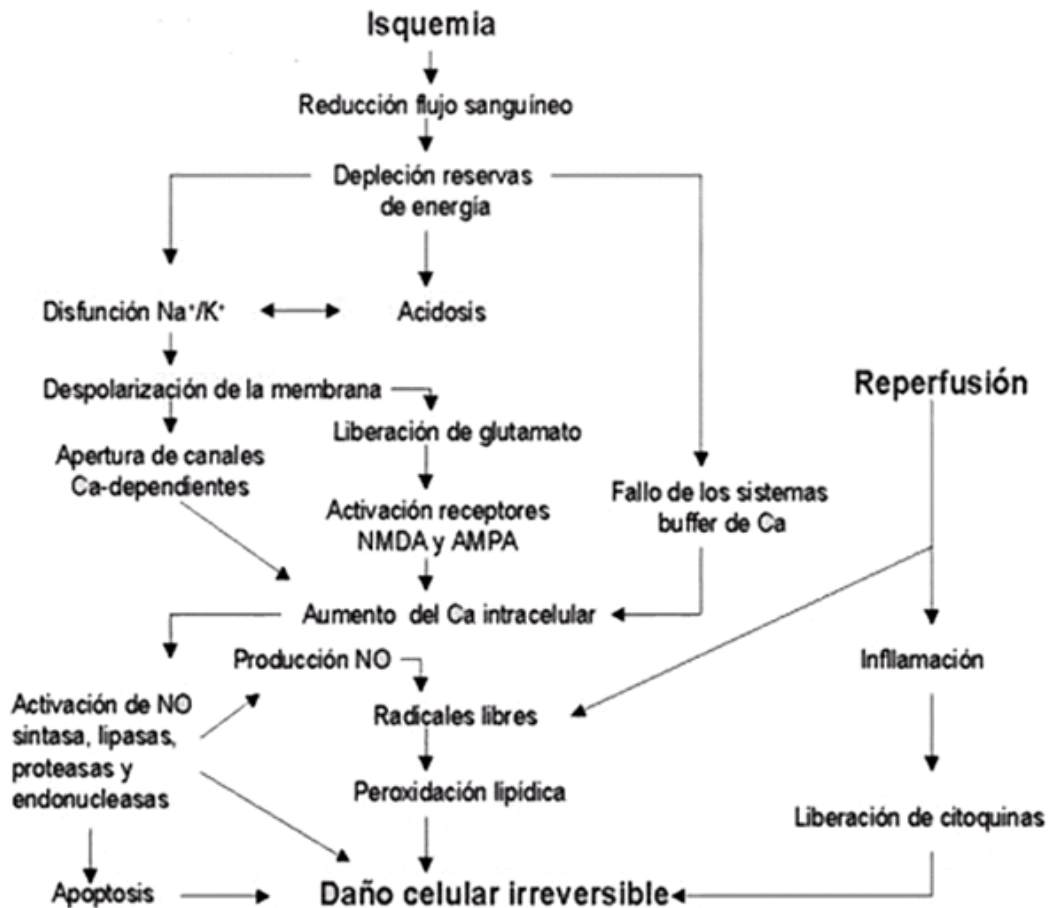


Figura 3. Diagrama de los principales eventos celulares, moleculares y patológicos resultantes de un evento isquémico.

La isquemia misma y la reperfusión posterior, inducen una respuesta inflamatoria iniciada en la microcirculación, que coadyuvará a la destrucción celular (Iadecola, 2001). La producción y liberación de citocinas proinflamatorias y quimiocinas es uno de los primeros eventos inflamatorios que se desencadenan después de una lesión. Citocinas como IL1, IL6 y TNF α son conocidas como mediadores de respuesta inflamatoria periférica, y son sintetizadas y liberadas por varias células en el SNC (Zhai, 1997; Pan, 2003). Los neutrófilos son las primeras células reclutadas con el objetivo de limpiar el sitio de posibles patógenos y restos celulares a través del proceso de fagocitosis (primeras fases de reparación). Sin embargo, al estar activados también dan inicio a la liberación de una importante cantidad de neurotoxinas tales como: ROS y radicales de nitrógeno (RN), así como quimiocinas y una variedad de enzimas que promueven la destrucción

tisular (Schurer, 1990; Taoka, 1997). La microglia y los macrófagos sanguíneos son otras de las células inflamatorias que llegan al sitio de lesión, éstas constituyen la mayoría de células inflamatorias presentes (Popovich, 1999; Block, 2005). Estas células participan importantemente en los procesos desarrollados después de la lesión liberando citocinas y neurotoxinas (Giulian, 1993; Bethea, 1998; Schilling, 2005).

En lo referente a los macrófagos, su activación se acompaña de la liberación de factores microbicidas como la mieloperoxidasa y elastasa mismas que contribuyen al daño tisular (Giulian y cols. 1993; Popovich y cols. 2002). Sin embargo también se sabe que los macrófagos participan en las fases tempranas de reparación tisular (Bomstein y cols. 2003; Schilling y cols. 2005). La microglia por otro lado, es un grupo de células pluripotenciales capaces de desarrollar diferentes fenotipos. Con la salida excesiva de glutamato después de una lesión al SNC, la microglia adquiere un fenotipo (microglia reactiva) que expresa muy bajas cantidades de moléculas MHC II y es incapaz de mantener una buena interacción con los linfocitos T (Shaked, 2004). Este fenotipo se caracteriza por la liberación excesiva de NO, TNF α e IL-1 β llevando a la toxicidad (Merrill, 1993).

Por otra parte la microglia activada al igual que los macrófagos, remueve los despojos celulares después de la lesión y es capaz también de promover la neovascularización en el área de lesión, facilitando así la liberación de factores tróficos y nutrientes para la supervivencia y la proliferación de las células migrantes en el área dañada (Shaked, 2004). Además, la microglia, es capaz de expresar transportadores para glutamato (van Landeghem, 2001) lo cual aparentemente contribuye a amortiguar las concentraciones de glutamato. La microglía activada es capaz también de producir factores neurotróficos como factor neurotrófico del crecimiento (NGF, del inglés Neurotrophic Growth factor), factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF, del inglés Brain Derived Neurotrophic Factor) (Nakajima, 2001), factor neurotrófico derivado de la línea glial (GDNF, del inglés Glial cell line-derived neurotrophic factor) (Hashimoto y cols. 2005) y neurotrofinas como NT3, NT4/5 (Elkabes, 1998). Los linfocitos son las células que modulan la intensidad de la respuesta inflamatoria. Su participación después de una lesión al

SNC también ha sido relacionada con el daño al tejido neural (Jones y cols. 2004). Sin embargo, en diversos estudios se ha informado que la presencia de linfocitos T en el sitio de lesión favorece la recuperación funcional (Moalem, 1999; Hauben, 2000b). Los linfocitos T son capaces de sintetizar NGF, BDNF y diversas neurotrofinas (NT3, NT4/5) (Santambrogio, 1994; Moalem, 1999). Además, un gran número de células inflamatorias (linfocitos B, macrófagos, microglia, mastocitos, eosinófilos y basófilos) pueden ser estimuladas también por los linfocitos T para liberar NGF (Torcia, 1996). Estos factores neurotróficos pueden desempeñar una función regeneradora o neuroprotectora; por ejemplo, el BDNF al igual que la interleucina 10 (IL-10) bloquea la expresión de iNOS y promueve hasta un 40% la sobrevivencia de las motoneuronas (Novikov, 1997). Al momento varios estudios han informado el efecto nocivo (Jones y cols. 2002; Becker y cols. 2003) y el efecto benéfico (Kipnis y Schwartz; 2002; Butovsky, 2005) de la respuesta inmunológica desarrollada después de una lesión al SNC. Con respecto al aspecto benéfico, diferentes estudios han sugerido la existencia de una respuesta autorreactiva contra constituyentes neurales con propiedades protectoras y restauradoras originada como consecuencia a una agresión al SNC (Hauben, 2000b). Dicha respuesta se ha manejado en el marco de un nuevo concepto denominado “autorreactividad protectora” (Schwartz, 2003) que es una respuesta fisiológica al trauma (Yoles, 2001) controlada genéticamente (Kipnis, 2001).

Autorreactividad protectora.

La transferencia pasiva de células T específicas para el auto-antígeno proteína básica de la mielina (MBP, del inglés Myelin Basic Protein), reduce el daño neuronal después de una lesión al SNC en roedores (Hauben y cols. 2000a; Fisher y cols. 2001). La inmunización activa con derivados no encefalitogénicos de péptidos asociados a la mielina como el copolímero-1 [COP-1; polímero sintético compuesto por: L-alanina, L-lisina, L-ácido glutámico y L-tirosina (6:2:5:1), llamado también acetato de glatiramer (Copaxona)] (Kipnis y Schwartz; 2002),

puede reducir la degeneración secundaria de neuronas y promover una mejor recuperación motora en animales con lesión al SNC (Kipnis y Schwartz; 2002; Kipnis y cols. 2003). La copaxona fue sintetizada con el objetivo de determinar las características químicas mínimas necesarias para crear una molécula inmunogénica compuesta por aminoácidos hallados en la MBP y que fuera capaz de inducir la EAE que es un modelo experimental de la esclerosis múltiple en ratas y ratones. Al ser probado no exhibió ninguna actividad encefalitogénica y no indujo la EAE, por el contrario, mostró un efecto supresor de la enfermedad (Scheindlin, 2004).

La autoreactividad protectora en algunos trabajos relativamente recientes ha demostrado ser capaz de brindar protección al tejido neural y recuperación neurológica en modelos experimentales como el de trauma craneoencefálico (Kipnis, 2003), lesión de nervio óptico (Kipnis, 2000), enfermedad de Parkinson (Benner, 2004), esquizofrenia (Kipnis, 2004), esclerosis lateral amiotrófica (Angelov, 2003), e incluso enfermedad de Alzheimer (Avidan, 2004). Por otra parte, la autoreactividad protectora podría también estar modulando la restauración del tejido dañado. El implante de macrófagos autólogos activados contra proteínas de la mielina y productores de $IL-1\beta$, y BDNF en el sitio de lesión de la médula espinal, ha demostrado promover en forma significativa crecimiento neural y recuperación motora (Bomstein, 2003). Otros estudios han demostrado que la inmunomodulación con péptidos neurales modificados (COP-1) en modelos con EAE induce linfocitos Th2 que además de secretar altos niveles de citocinas anti-inflamatorias (IL-10) también liberan TGF- β y BDNF en los sitios de lesión del SNC, promoviendo neuroprotección y neurogénesis (Aharoni, 2003). Los hallazgos hasta el momento nos sugieren que la limitada capacidad de crecimiento presentada por el tejido neural después de una lesión puede ser revertida por la presencia de células inflamatorias y además sustentan la hipótesis de que la falla en los fenómenos de regeneración del SNC puede ser debida, al menos parcialmente, al desarrollo de una inadecuada respuesta inflamatoria, misma que podría ser modulada por la autoreactividad protectora. La inmunización activa con péptidos no-encefalitogénicos, especialmente COP-1 (Kipnis y Schwartz, 2002;

Ibarra, 2004), ha originado resultados muy alentadores; sin embargo, no se conocen los mecanismos por medio de los cuales la respuesta inducida por dichos péptido promueve protección o podría generar restauración del tejido neural.

Copolimero-1 (Cop-1), mecanismo de inmunomodulación

El Cop-1 se une en forma muy eficiente y promiscua a diversas moléculas del MHC clase II (HLA-DR) sin necesidad de ser procesado (Fridkis-Hareli et al. 1999). Es un antagonista del epitopo 82-100 de la MBP (Arnon et al. 1996), que presenta una fuerte reacción cruzada con esta molécula compitiendo así con la MBP por el sitio de unión en el MHC y al correspondiente TCR, esto puede conducir la inhibición de varias funciones patológicas (Fridkis-Hareli et al., 2002). El COP-1 disminuye la gravedad de la EAE en modelos murinos, y en seres humanos ha demostrado disminuir la severidad de la esclerosis múltiple (Azoulay et al. 2005). Es un importante inductor de linfocitos Th2 reguladores, mismos que liberan grandes cantidades de IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 y TGF-beta. Estos linfocitos ingresan al SNC donde pueden ser estimulados por la MBP (por reacción cruzada) y como resultado de su activación, modulan la liberación de citocinas pro-inflamatorias provenientes de los linfocitos Th1 (Teitelbaum et al. 1999).

El incremento en la producción de la IL-10 se da a través de la modulación de las células dendríticas. Esta modulación en las CPA's es un paso muy importante para llevar a cabo la modulación benéfica en la respuesta inmune dañina causada por varios antígenos (Arnon y Aharoni, 2004).

Así, la acción básica de Cop-1 es modular la liberación de citocinas pro-inflamatorias y con ello el efecto dañino de los linfocitos T contra MBP. Después de una lesión al SNC se ha observado que se desencadena una respuesta contra la MBP, misma que es predominantemente Th1 (Jones y cols. 2002; Jones y cols. 2004) y es capaz de originar una gran destrucción al tejido nervioso si no es modulada. Sin embargo, otros autores han demostrado que la presencia de dicho fenotipo no es sólo importante, sino esencial para que la autoreactividad

protectora ejerza su efecto benéfico (Kipnis y cols. 2002b) ya que son estas células las que liberan el INF- γ , citocina que estimula la expresión de moléculas del MHC clase II (indispensables para la comunicación y modulación de las células de la microglia por parte de los Th1). Aunque pareciera paradójico, la presencia de las células Th1 y de células inflamatorias parece ser pieza clave para el funcionamiento óptimo de la autoreactividad protectora después de una lesión al SNC (Barouch y Schwartz; 2002; Schwartz y cols. 2003). La modulación de dichos elementos a través de la inmunización con A91 o COP-1 puede ser una valiosa alternativa terapéutica en lesiones al SNC, ya que al permitir sólo la acción necesaria y no exagerada de dichas células (Th1 y células inflamatorias) permitiría obtener los beneficios que puede proveer el sistema inmunológico: factores de crecimiento y neuroprotectores, amortiguación de sustancias excitotóxicas etc. (Guzik y cols. 2003).

El perfil de citocinas Th2 (prácticamente anti-inflamatorias) podría estar liberando factores que promueven el crecimiento neural (BDNF, NT, TGF- β) (Aharoni y cols. 2003; Aharoni y cols. 2005) y regulan la función de los linfocitos Th1 para que, ya sea por parte de ellos mismos, o a través de la activación de las células de la microglia, también se liberen factores promotores del crecimiento neural (BDNF, NT-3, NT-4/5, NGF) para con ello iniciar la restauración del tejido dañado (Elkabes y cols. 1998; Nakajima y cols. 2001a; Barouch y Schwartz; 2002).

Factores neurotróficos.

Desde el descubrimiento del factor de crecimiento nervioso (NGF del inglés nerve growth factor) en los años 50's del siglo pasado (Levi-Montalcini y Hamburger, 1951) se ha desarrollado todo un marco conceptual que permite entender mas de las relaciones existentes entre las neuronas y sus dianas de inervación, este marco conceptual es conocido como teoría neurotrófica, que postula que solo sobrevivirán aquellas neuronas que en una fase crítica del desarrollo del SN, encuentren los factores derivados del órgano diana a inervar. Ya que estos factores son secretados de una forma limitada y limitante, esto determina la

supervivencia neuronal y por ende el desarrollo del SN y otros órganos (Sanz, 1997).

Estos factores se denominan como neurotróficos y son un grupo de proteínas que intervienen dentro de procesos de gran relevancia para el desarrollo y mantenimiento del SN (Henriques, 2010). Una de las actividades esenciales de estos factores es un efecto intrínseco de supervivencia autócrina que es modulada durante el desarrollo (Lamballe et al, 1994; Valdés-Sánchez et al, 2010). Otros efectos son la estimulación del crecimiento de las neuritas y la guía de axones (Tuttle y O'Leary, 1998; Huang y Reichardt, 2003), asegurando la correcta conexión entre el cerebro y la médula espinal. Por otra parte, factores de crecimiento en el SN influyen en la formación de sinapsis y dendritas, lo que impacta directamente sobre los mecanismos de plasticidad (Lo, 1998; Vicario-Abejon et al, 2002). Una actividad complementaria de muchos factores de crecimiento en el sistema nervioso es que son factores que influyen en la proliferación, migración y diferenciación de células troncales en el desarrollo embrionario y el sistema nervioso adulto (Cattaneo y McKay, 1990; Kuipers y Bramham, 2006).

Estos factores actúan a través de dos tipos de receptores diferentes: el receptor de neurotrofinas “pan”, $p75^{NTR}$ (del inglés p75 neurotrophin receptor), y la familia de receptores tirosina quinasa (Trk). Todas las neurotrofinas se unen con similar afinidad con $p75$, pero cada uno se une con una afinidad específica a diferentes receptores Trk. $P75$ es un miembro de la familia del factor de necrosis tumoral que tiene una sola región transmembranal; la porción extracelular contiene cuatro dominios ricos en cisteína. Tiene un dominio de muerte intracelular de tipo II que está implicado en la apoptosis. Hay tres receptores Trk: TrkA, TrkB y TrkC (Figura 4). TrkA se une con NGF y BDNF, TrkB se une con NT-4 y se une TrkC con NT-3. La porción extracelular de cada uno de estos receptores Trk se puede subdividir en cinco diferentes dominios D1-D5. D5, la región más cercana a la membrana es capaz de unirse a sus ligandos neurotróficos sin la necesidad de que el otro dominio este presente. Los factores neutróficos existen como homodímeros y son capaces de reunir dos receptores tirosina quinasa. Esto da como resultado la

transfosforilación de los residuos de tirosina quinasa en el dominio intracelular de los receptores. Las tirosinas fosforiladas actúan como sitios de unión para las moléculas de señalización que regulan el crecimiento y la supervivencia celular a través de las vías Ras, PI3K (phosphoinositide 3-quinasa) y el PLC- γ (fosfolipasa C- γ). P75 es capaz de modificar la selectividad de la unión de las neurotrofinas a los receptores Trk. También indica de forma independiente a través de NF- κ B (factor nuclear κ B), Akt y JNK (c-Jun N-terminal quinasa). También está relacionada con el adaptador de varias proteínas asociadas con la inducción de la apoptosis y la supervivencia celular. Es evidente que las neurotrofinas no solo juegan un papel vital en desarrollo, sino también en el mantenimiento de las redes y los sistemas neuronales durante toda la vida. Recientemente se ha demostrado que BDNF y TrkB juegan un papel importante en la plasticidad sináptica y la memoria.

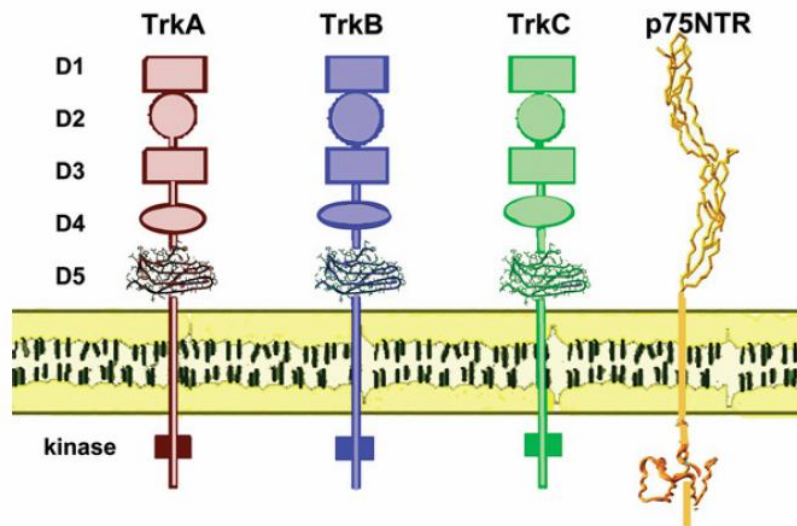


Figura 4. Los principales receptores de membrana con los que interactúan los factores neurotróficos, Trk A, B y C y p75. Se muestran los dominios de cada receptor y sus porciones intracelulares.

JUSTIFICACIÓN

La inmunización con péptidos neurales modificados (activación de la autoreactividad protectora) es una estrategia que ha brindado resultados alentadores ya que se basa en la estimulación y modulación de una respuesta propia del organismo que por sus características, puede ser capaz de restaurar el tejido neural después de una lesión. Uno de los más promisorios péptidos neurales modificados es el COP-1 (Copaxona), mismo que ya se ha utilizado como neuroprotector en diversas patologías neurodegenerativas. Éste péptido tiene la capacidad de inducir un perfil de citocinas Th2 y se ha relacionado importantemente con la expresión de factores que promueven el crecimiento neural (BDNF, NT, TGF- β) y regulan la función de los linfocitos Th1 para que, ya sea por parte de ellos mismos, o a través de la activación de las células de la microglia, también se liberen factores promotores del crecimiento neural para con ello iniciar la restauración del tejido dañado.

Algunos estudios han sugerido ya un efecto positivo de la inmunización con péptidos neurales modificados sobre la neurogénesis en el sitio de lesión de animales con isquemia cerebral focal. Sin embargo, no se han descrito con exactitud los mecanismos por medio de los cuales se lleva a cabo éste proceso de restauración. Un posible mecanismo es a través del incremento en la liberación de factores neurotróficos en la zona de lesión. Al momento no existen estudios al respecto.

De ahí el interés por desarrollar el presente trabajo, además de que el mejor conocimiento de los mecanismos inductores de restauración de ésta alternativa terapéutica podrá ayudarnos a establecer la mejor estrategia para una próxima aplicación clínica.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

¿La inmunización con COP-1 promueve un incremento en la expresión de los factores neurotróficos en la zona de lesión de animales con isquemia cerebral focal?

Hipótesis

La inmunización con COP-1 incrementará la expresión proteica de factores de crecimiento neural después de un proceso de isquemia cerebral focal con reperfusión.

Objetivo general

1. Evaluar en el modelo de ICF en ratas, el efecto de la inmunización con COP-1 sobre la expresión de BDNF y NT-3 en el sitio de lesión.

Objetivos particulares

1. Análisis del efecto de la inmunización con COP-1 + adyuvante completo de Freund (ACF) en el sitio de lesión de ratas con ICF sobre la expresión proteica de: BDNF y NT-3.
2. Análisis del efecto de la inmunización ACF + PBS (vehículo) en el sitio de lesión de ratas con ICF sobre la expresión proteica de: BDNF y NT-3.
3. Análisis de la expresión proteica de BDNF y NT-3 en animales sin isquemia cerebral (ratas sham).
4. Comparación de la expresión proteica de BDNF y NT3 en animales inmunizados con Cop-1 o únicamente con ACF+PBS.
5. Análisis y comparación del efecto de los diferentes tratamientos sobre la recuperación al déficit generado por ICF (evaluación motora).

MATERIALES Y MÉTODOS

Tipo de estudio: Experimental, controlado, aleatorizado, compartativo y transversal.

Población objetivo: Ratas Sprague Dawley.

Muestra: 40 Ratas Sprague Dawley con un peso aproximado entre 290-340g.

Tamaño de la muestra: 16 ratas para cada grupo + 8 animales sham

Diseño Experimental

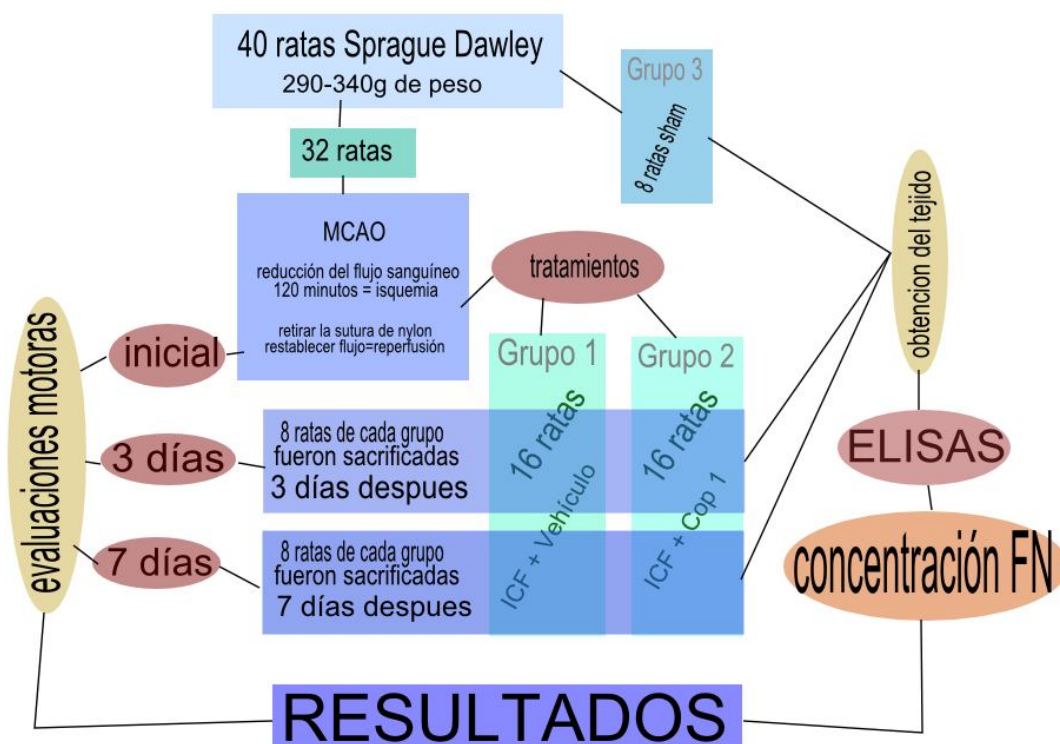


Figura 5. Esquema del diseño experimental.

Grupos: Se formaron 3 Grupos

I: Ratas con ICF + vehículo (ACF + PBS)

II: Ratas con ICF + inmunización con COP-1

III: Ratas sham (sin isquemia, solo procedimiento quirúrgico)

Consideraciones metodológicas

- 3 días posteriores al evento isquémico y a la administración del tratamiento 8 animales del grupo I y 8 del grupo II fueron seleccionados para ser sacrificados y evaluar la expresión de los diferentes factores en el cerebro de los animales. El resto de los animales en ambos grupos fue sacrificado a los 7 días posteriores al evento isquémico y la administración del tratamiento con el mismo fin.
- Se analizó también la expresión de las proteínas en animales sin isquemia

Obtención de Muestras

Al término de cada uno de los periodos designados a los grupos, de 3 y 7 días, 8 animales por grupo se seleccionaron y fueron sacrificados con pentobarbital sódico, se craneoatomizó cada animal para exponer completamente el cerebro y extraerlo.

Los cerebros se colocaron por 2 minutos a -20°C para facilitar la toma de la muestra (figura 5), al tornarse un poco más firme el tejido cada cerebro se colocó en una matriz de corte (figura 6). La porción frontal del encéfalo se retiró y se obtuvo después una rebanada de 3 mm de grosor para su procesamiento.



Figura 5. Los cerebros extraídos se enfrían unos minutos para que la firmeza del tejido aumente y se pueda retirar con facilidad la rebanada de la muestra.

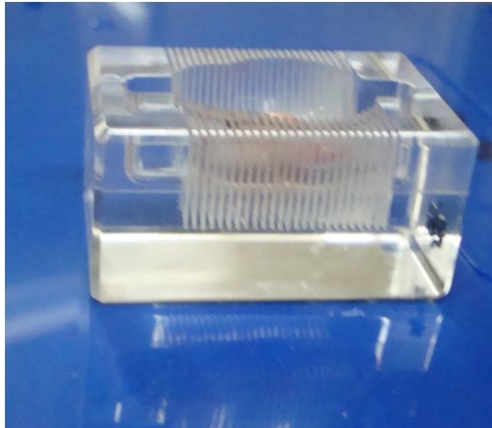


Figura 6. Matriz utilizada para obtener la rebanada de muestra, se utilizo la división en septos de la matriz para homogeneizar el grosor de las muestras considerando adecuadas porciones con 2 septos de grosor al momento de ser cortadas.

Para el procesamiento de las muestras se tomo una parte del lóbulo infartado (figura 7) de las rebanadas que se cortaron, este tejido se macero y ya homogeneizado se empleo para hacer los ensayos de ELISA y así determinar la concentración de BDNF y Nt3 en los grupos con los diferentes tratamientos.

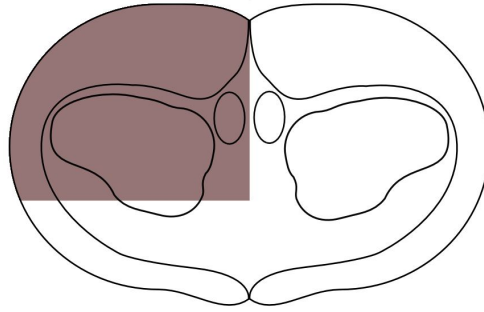


Figura 7. Una vez cortada la rebanada de cerebro, se toma una porción del lóbulo infartado para su procesamiento. En este corte coronal se resalta en gris la porción utilizada.

Definición de variables:

VARIABLES INDEPENDIENTES.

Isquemia cerebral focal con reperfusión

Se utilizó halotano para llevar a los animales a un estado de anestesia profunda, posteriormente se les rasuró la piel a nivel de la región cervical ventral, se embrocó la región rasurada y se colocaron en posición de decúbito dorsal.

El episodio de ICF se realizó mediante la oclusión de la arteria cerebral media siguiendo el procedimiento descrito y propuesto por Zea Longa (Zea, 1989), para ello se realizó una incisión quirúrgica en la piel a aproximadamente 1.5 cm de largo. Se localizó la arteria carótida común izquierda, arteria carótida interna izquierda y arteria carótida común externa izquierda y se disecó cuidadosamente el tejido involucrado del nervio vago. Se ubicó la arteria pterigoidea y la occipital cauterizándose. La porción distal de la arteria carótida externa a nivel proximal se ligó, coaguló y cortó (Peña, 2004). Haciendo una pequeña incisión sobre el muñón de la rama externa de la carótida se abrió un acceso, por donde se introdujo un monofilamento de nylon 3-0 al cual previamente se le había engrosado la punta con calor (figura 8). La sutura se introdujo 18 mm aproximadamente dentro de la arteria carótida interna sin resistencia de paso en el lumen vascular, situando el embolo donde la carótida interna ramifica en la arteria cerebral media, provocando la obstrucción de la arteria cerebral media.

La disminución del flujo sanguíneo por un lapso de 120 minutos fue considerado como isquemia cerebral.

Después de transcurrido este tiempo, se retiró la sutura de nylon permitiendo la reperfusión sanguínea.

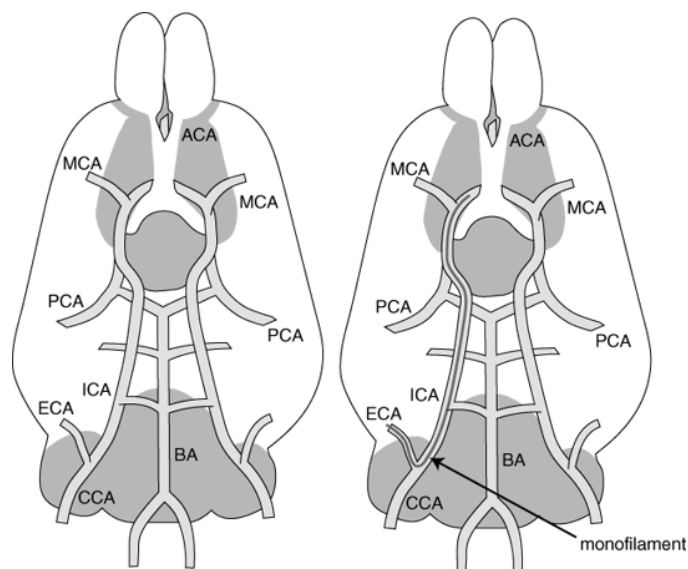


Figura 8. Modelo de isquemia cerebral focal (ICF) por inserción de un monofilamento de nylon, en la imagen del lado derecho; en la arteria cerebral media (ACM).

Inmunización activa

Las ratas se inmunizaron mediante una inyección subcutánea, en la región interescapular con 200 µg de copaxona disuelta en solución salina fisiológica y emulsificada en adyuvante completo de Freud que contenía 5 mg/ml de *Mycobacterium tuberculosis* H37 RA (Ibarra, 2004). El mismo procedimiento se realizó para el tratamiento “vehículo” donde volúmenes iguales de ACF y PBS fueron emulsificador y posteriormente administrados a los animales.

VARIABLES DEPENDIENTES

Expresión de los diferentes factores neurotróficos

Se utilizó un kit de ELISA en sandwich de la marca CHAMICON, número de catálogo CYT302, para hacer la determinación de la cantidad total (pg totales/mL) de NT-3; para hacer la determinación de la cantidad total de BDNF se utilizó también un kit de ELISA en sandwich, este de la marca MILLIPORE con número de catálogo CYT306. Los ensayos se realizaron por triplicado, una vez revelado el cromógeno en las placas se hizo la lectura de la absorbancia con el

espectrofotómetro a una longitud de onda de 450 nm siguiendo las indicaciones del manual de cada kit.

Para cada tratamiento los valores resultantes se promediaron y se presentan en las graficas correspondientes al apartado de resultados.

Evaluación motora

La evaluación se llevó a cabo a las 24 horas de la cirugía y a los 3 y 7 días dependiendo el momento en que se fueran a sacrificar. La escala neurológica para la evaluación motora utilizada fu la propuesta por Zea Longa (Zea Longa et al., 1989) bajo las siguientes escalas:

0. Sin déficit.
1. Falla para extender el miembro superior izquierdo totalmente.
2. Círculos hacia la izquierda.
3. Caídas hacia la izquierda.
4. No camina espontáneamente y mantiene un nivel de conciencia muy deprimido.

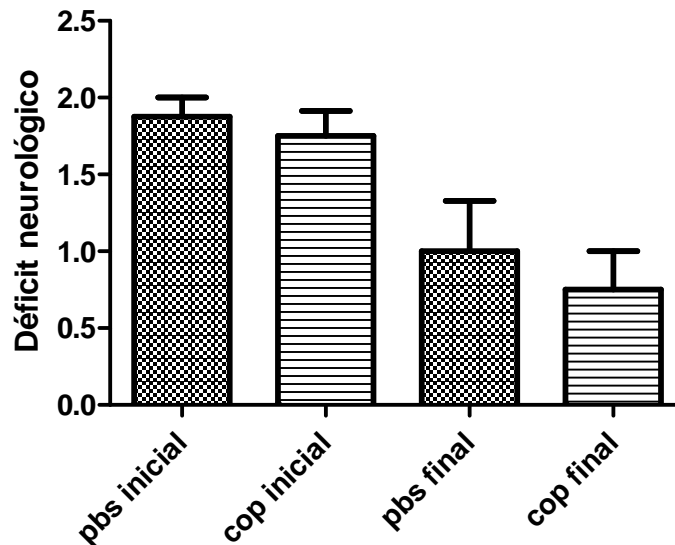
RESULTADOS

Evaluaciones neurológicas

Terminada la cirugía de ICF se suspendió el suministro de anestésico sobre los animales, se les permitió la completa recuperación de la consciencia y fueron evaluados para determinar la severidad del déficit neurológico (evaluación inicial). Al término de los periodos de seguimiento se evaluó nuevamente el déficit para determinar la recuperación final de los grupos (evaluación final).

En el primer experimento (seguimiento a 3 días pos isquemia), la evaluación inicial nos permitió observar que los 2 grupos estudiados presentaron un importante déficit neurológico: PBS (1.87 ± 0.35 = media \pm SD) y Cop-1 (1.75 ± 0.46). El déficit fue muy similar entre ellos ($p=0.27$ t de Student; gráfica 1). Tres días después de la isquemia la evaluación final reportó una mejoría en ambos grupos. El déficit neurológico disminuyó importantemente y aunque en el grupo tratado con Cop-1 el déficit se observó ligeramente menor (0.75 ± 0.7) en comparación con el grupo tratado con PBS (1 ± 0.92), al realizar el análisis estadístico no se observó ninguna diferencia significativa ($p=0.27$ t de Student).

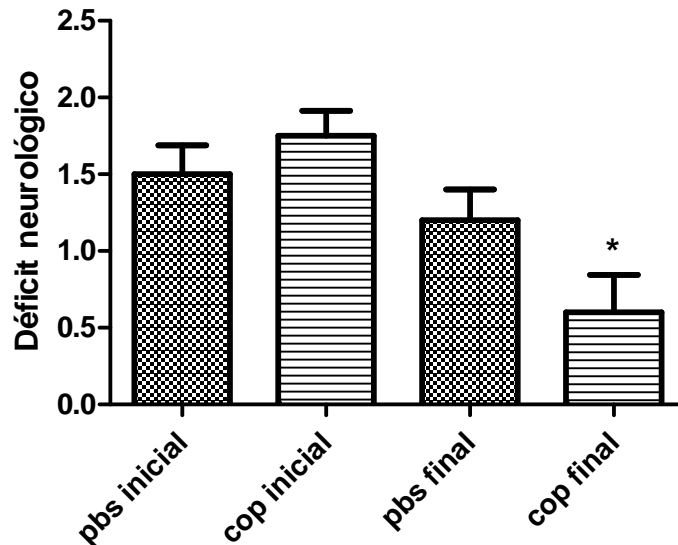
Evaluaciones Neurológicas grupos 3 días



Gráfica 1. Evaluaciones neurológicas en los tratamientos. Valores registrados en un momento inicial y al término de un periodo de 3 días después de la inmunización de los animales (final), en ningún momento se demostró alguna diferencia significativa.

En el segundo experimento (seguimiento a 7 días pos isquemia) la evaluación inicial reportó nuevamente un déficit importante, mismo que fue muy similar entre los grupos estudiados ($p=0.16$ t de Student; gráfica 2): PBS (1.5 ± 0.53) y Cop-1 (1.75 ± 0.46). Siete días después de la isquemia, se observó una mejor recuperación neurológica en los animales tratados con Cop-1 (0.6 ± 0.54). El déficit neurológico de estos animales fue significativamente menor al presentado por el grupo tratado con PBS (1.2 ± 0.44 ; $p=0.04$ t de Student).

Evaluaciones Neurológicas grupos 7 días



Gráfica 2. Evaluación neurológica de los tratamientos. Al término de periodo de 7 días asignado a estos animales, el tratamiento Cop-1 presento una reducción significativa del déficit neurológico.

Factores neurotróficos

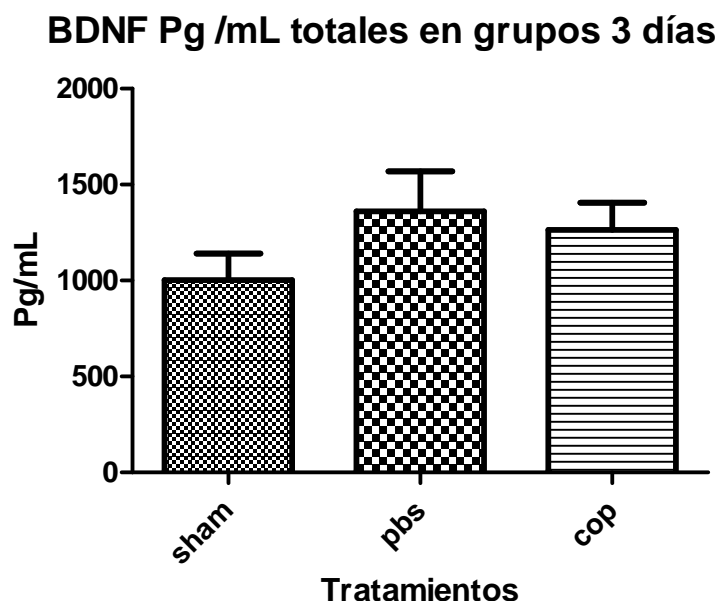
Al término de los periodos de tratamiento los animales fueron sacrificados con una sobredosis de pentobarbital sódico y se extrajo la masa encefálica de cada animal para su procesamiento. La muestra de tejido fue tomada como se describió anteriormente en el apartado de materiales y métodos.

Los picogramos totales de cada factor se determinaron por medio de los kits descritos en el apartado de materiales y métodos, se analizo también tejido de animales pertenecientes a un grupo SHAM (animales sometidos al procedimiento quirúrgico pero sin oclusión de la MCA, sin isquemia).

BDNF

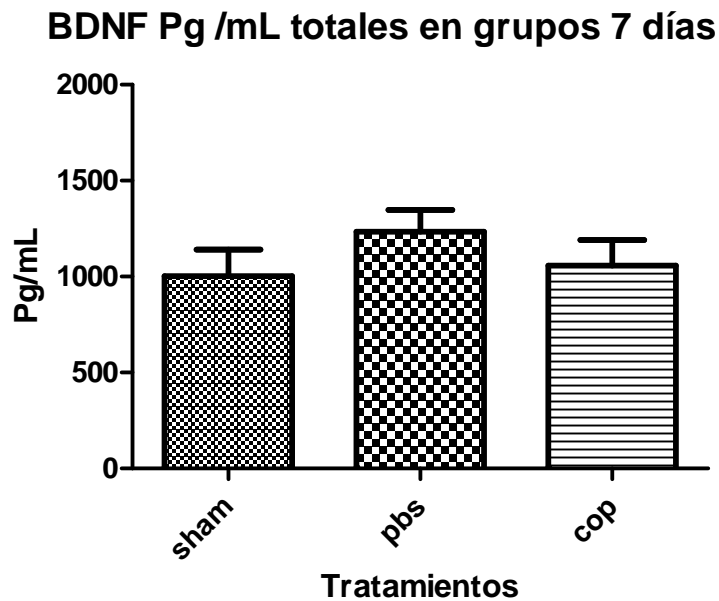
Tres días posteriores a la inmunización las concentraciones de BDNF fueron muy similares entre los diferentes tratamientos (grafica 3): Cop-1 (1264.5 pg/mL ±

344.2 = media \pm SD) y PBS (1360.3 pg/mL \pm 510.9) comparados también contra un grupo SHAM (1002.3 pg/mL \pm 393.5); para comprobar la similitud de los grupos se realizó un análisis de Kruskal-Wallis sin encontrar diferencias estadísticamente significativas ($p= 0.33$).



Gráfica 3. Concentraciones (pg/mL totales) de BDNF en los diferentes grupos encontradas 3 días después de la inmunización de los animales. Se muestra también la concentración del factor en un grupo sin isquemia (SHAM).

Las concentraciones de BDNF 7 días después de la inmunización fueron nuevamente muy similares entre los grupos (grafica 4): Cop-1 (1057.1 \pm 377.9) y PBS (1234.2 \pm 252.1). Al realizar el análisis estadístico con la prueba de Kruskal-Wallis se verificó que no existía diferencias significativas entre los tratamientos y el grupo SHAM ($p= 0.51$).



Gráfica 4. Tras un periodo de 7 días a la inmunización, no hubo diferencia respecto a la concentración de BDNF en los diferentes grupos estudiados.

NT3

Tres días después de la isquemia, se observó una mayor concentración de la neurotrofina 3 (NT-3) en los 2 grupos de animales con isquemia; sin embargo, solo el grupo con Cop-1 ($1124.1 \text{ pg/mL} \pm 185.7$) fue significativamente diferente al de los animales SHAM (787 ± 202.4 ; $p= 0.01$, Kruskal Wallis seguida de la prueba de U de Mann-Whitney). El grupo tratado con PBS (969.6 ± 218.6) no fue significativamente diferente al grupo SHAM ($p > 0.05$)

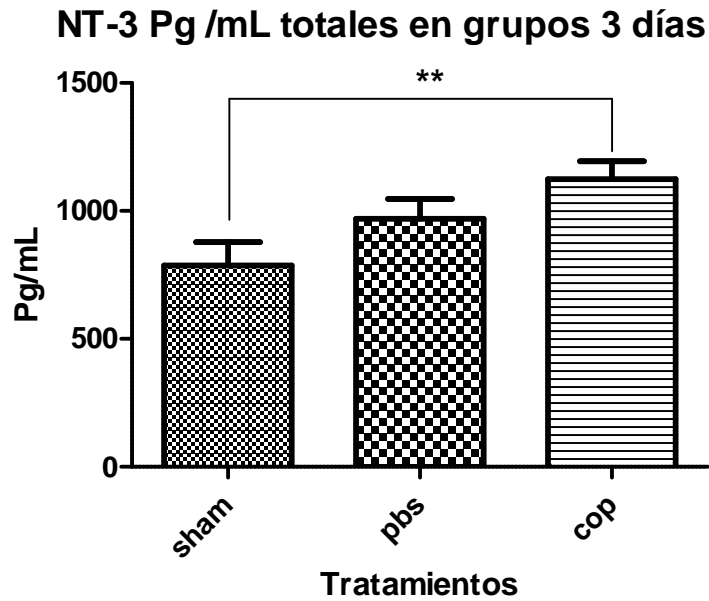


Gráfico 5. Concentraciones de NT-3 después de 3 días de la inmunización de los grupos. Solo se encontró diferencia entre el tratamiento Cop-1 y el grupo SHAM.

Siete días después de la isquemia las concentraciones de NT-3 en los animales tratados con Cop-1 (1182.2 ± 414) y PBS (865.2 ± 125) permanecieron por encima del grupo SHAM (787 ± 202.4). Cop-1 sin embargo, promovió una mayor concentración del factor neurotrófico (grafica 6; $p= 0.05$, prueba de Kruskal Wallis seguida de U de Mann-Whitney).

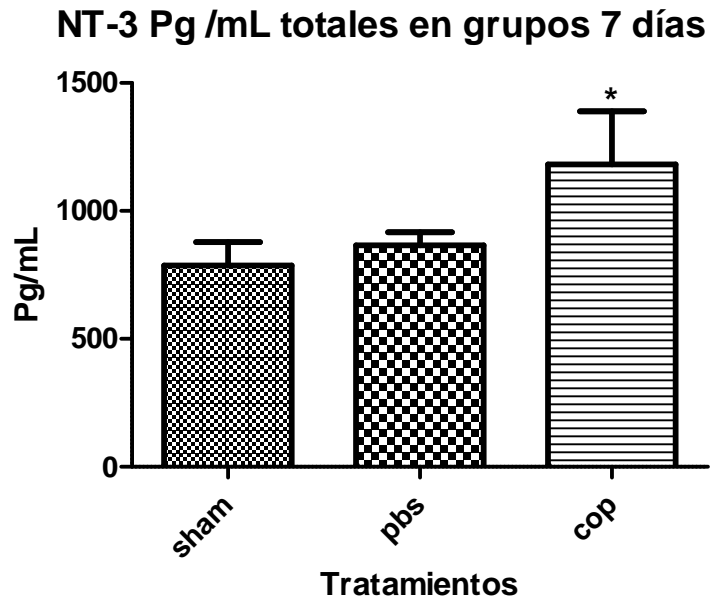


Gráfico 6. Después de 7 días de la inmunización los niveles en la concentración de NT-3 fueron significativamente mayores en el grupo tratado con Cop-1.

DISCUSIÓN

Aunque el proceso inflamatorio se ha asociado tradicionalmente con un incremento en el daño neurológico, se ha planteado la importancia de modular la respuesta inflamatoria en lugar de suprimirla cuando ocurre una lesión en el SNC (Hauben et al. 2003). Se mencionó ya que la inmunización activa con derivados no encefalitogénicos de péptidos asociados a la mielina puede reducir la degeneración secundaria de neuronas y estimula mecanismos anti-inflamatorios que favorecen la recuperación anatomofuncional en animales que han sufrido una lesión en el SNC (Kipnis y Schwartz; 2002; Kipnis et al., 2003).

La inmunización activa con Cop-1 (Fridkis-Hareli et al., 2002) modula la respuesta inmune generada por una lesión en SNC. La manifestación de evento isquémico o cualquier otra forma de lesión, compromete la integridad de la barrera hematoencefálica, permitiendo la migración de los linfocitos T reactivos producto de la inmunización hacia el parénquima cerebral. De esta manera los linfocitos T reactivos pueden arribar al sitio de lesión. (Yenari, 2006)

En un estudio anterior en nuestro grupo de investigación, se demostró que la inmunización activa con cop-1 en el modelo de ICF promueve una mejora en el déficit neurológico de los animales lesionados; además, el volumen del infarto fue significativamente menor en el grupo tratado con Cop-1 (Ibarra et al, 2007).

En el presente estudio y acorde a lo anteriormente reportado en las evaluaciones clínicas, se pudo apreciar mejoría en el déficit neurológico de los animales tratados con Cop-1.

En ambos casos, el efecto benéfico se observó solamente a los 7 días después de la isquemia. La falta de recuperación a los 3 días pos isquemia puede explicarse en forma muy sencilla: para esas etapas de evolución, la cantidad de células inmunes y en especial de LT anti-Cop-1 (orquestadores de la respuesta benéfica) en el sitio de lesión es mínima. Una vez que los LT son activados con Cop-1 pasan una serie de eventos que determinan si finalmente estos logran alcanzar su diana y modular la respuesta inflamatoria. Se ha estimado que se requiere de un

lapso aproximado de 4 a 5 días después del reconocimiento del antígeno (Abbas, 2008) para que los LT puedan migrar en cantidades adecuadas y así logren iniciar sus funciones moduladoras en el sitio de lesión. Estudios previos realizados en un modelo de nervio óptico demostraron que es hasta los 7 días después de la lesión en que se puede encontrar el pico máximo de acumulación de linfocitos T (Hirschberg et al., 1998; Moalem et al., 1999). Otro estudio en modelos de lesión de la médula espinal demostró que la mayor infiltración de células inmunes al sitio dañado ocurre entre cuatro a siete días (Shechter, 2009). Aunque en ICF no se ha determinado con certeza cuando se da el arribo de estas células autorreactivas es importante destacar que existe una gran posibilidad de que los LT anti Cop-1 lleguen también al sitio isquémico en un periodo muy similar al reportado en los estudios antes mencionados.

Con las observaciones anteriores podemos entonces pensar que 3 días después de la isquemia es poco probable que la inmunización con Cop-1 genere el micro ambiente (autorreactividad protectora, figura 9) propicio para provocar una mejoría en el déficit neurológico.

Es importante mencionar que a los 3 días ya se encontraron niveles superiores de NT-3 en los animales tratados con Cop-1, en comparación con los animales no lesionados; sin embargo, estas concentraciones no fueron significativamente diferentes a las presentadas por el grupo lesionado y tratado con PBS. A los 7 días pos isquemia, los niveles de NT-3 en el grupo de Cop-1 se mantuvieron elevados mientras que en el caso del grupo con PBS disminuyeron significativamente. Esta diferencia podría estar influyendo sobre el efecto positivo que vemos en la función neurológica de los animales tratados con Cop-1.

A los siete días pos isquemia, podríamos entonces esperar una cantidad óptima de células inmunológicas reactivas a Cop-1 capaces de producir diversos factores neurotróficos (Nakajima et al., 2001; Hashimoto et al., 2005; Santambrogio et al., 1994; Moalem et al., 1999), producto de la inmunización activa con Cop-1. Estas células pueden estar generando el micro ambiente propicio para la

conservación y recuperación del tejido, originando esto, una mayor recuperación del déficit neurológico.

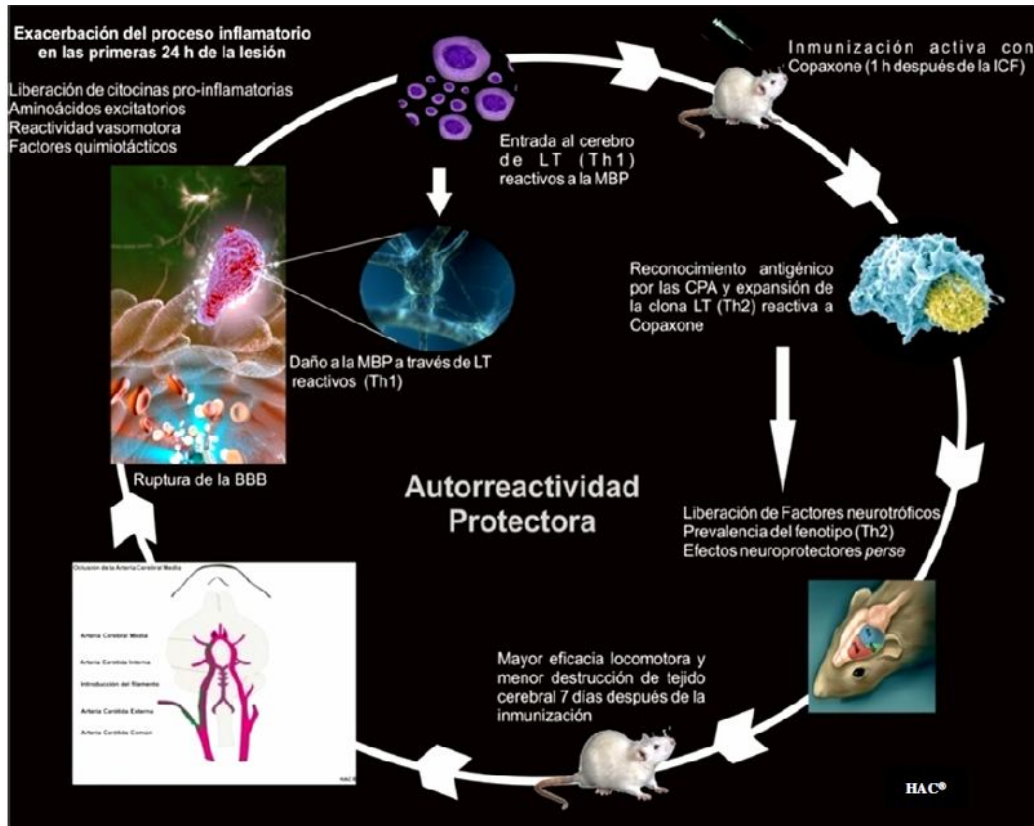


Figura 9. La inflamación en la isquemia cerebral provoca ruptura de la barrera hematoencefálica favoreciendo el ingreso de leucocitos al parénquima cerebral; la liberación de citocinas inflamatorias y antígenos locales podría ocasionar la activación de LT reactivos a los componentes de la mielina. La inmunización con Cop-1 en la región interescapular facilita el reconocimiento antigénico y la presencia de LT Th2/Th3; promoviendo la liberación de citocinas anti-inflamatorias y factores neurotróficos in situ.

Por otra parte, estudios anteriores han reportado que los LT anti Cop-1, son capaces de producir concentraciones significativas de BDNF en cultivos celulares. Un trabajo previo reportó una liberación importante de BDNF pero una muy baja producción de NT-3 por parte de los LT anti Cop-1 *in vitro* (Kipnis, 2000).

En nuestro estudio, *in vivo*, se observaron resultados totalmente contrarios a estos hallazgos: una mayor cantidad de NT-3 en animales inmunizados con Cop-1, mientras que la concentración de BDNF no presento un incremento significativo.

El factor "*in vivo - in vitro*" se ha observado que tiene un gran impacto sobre la expresión de factores neurotróficos. Aharoni menciona en su estudio del 2003 que los LT anti Cop-1 produjeron BDNF, pero solo en cultivos celulares mas no en modelos *in vivo* (Thoenen, 1995; Kipnis, 2000; Ziemssen , 2002).

En estudios *in vivo* Yang y cols., evaluaron los cambios en la expresión de factores neurotróficos en la retina de ratas con glaucoma después de una inmunización con Cop-1. Estos autores encontraron que los niveles de mensajeros para NT-3 se elevaban mientras que los mensajeros para BDNF y otros FN descendían (Yang, 2010). Estos resultados apoyan en cierta forma nuestros hallazgos y nos permiten suponer que *in vivo* la neurotrofina producida por los LT anti Cop-1 puede ser la NT-3. Esto último también lo apoya el hecho de que en estudios en médula espinal lesionada realizados en nuestro laboratorio, se encontró una mayor producción de NT-3 después de una inmunización con péptidos neurales modificados que teóricamente estimulan la respuesta inmune de la misma manera en que lo hace Cop-1(Artículo en preparación).

Al igual que el BDNF, la NT-3 es capaz de ejercer la regeneración axonal (Sterne, 1997), de la misma forma NT-3 provee un efecto antiapoptótico a neuronas a través de la inactivación de la caspasa 3 (Liot, 2004). Esta neurotrofina actúa sobre las células susceptibles a su efecto a través de los receptores Trk C con el cual tiene mayor afinidad y Trk B que es su receptor de mediana afinidad (Tessarollo, 1993).

Cristofaro reporto que NT-3 tiene un efecto proangiogénico mediado también por Trk C que puede ayudar a la recuperación del tejido afectado por un evento isquémico (Cristofaro, 2010), situación que podría ser otro de los mecanismos de protección al tejido nervioso en isquemia cerebral.

El efecto neuroprotector de esta proteína puede derivar de su capacidad de apoyar la supervivencia y la diferenciación de neuronas en tejido embrionario y

adulto, además alienta la neuroregeneración a través de la formación y la diferenciación de nuevas neuronas, y la plasticidad a través de la sinaptogénesis y elongación axonal (Maisonpierre et al., 1990).

Por todo lo anterior podemos pensar que las concentraciones elevadas de NT-3 en nuestro grupo tratado con Cop-1 pueden estar contribuyendo en forma significativa a promover un menor daño pero también a restaurar el tejido neural. Este último punto deberá ser explorado en futuros estudios.

El presente trabajo sugiere que Cop-1 incrementa las concentraciones de la neurotrofina NT-3 y que este incremento puede estar influyendo en la recuperación neurológica de los animales sometidos a isquemia cerebral. Lo anterior demuestra nuevamente el efecto benéfico de la autorreactividad protectora en enfermedades neurodegenerativas agudas.

CONCLUSIONES

1. Cop-1 mostro inducir una mayor recuperación del déficit neurológico tras un periodo de 7 días post inmunización.
2. La inmunización con COP-1 incrementa la concentración de NT-3 en el sitio isquémico.
3. La inmunización con COP-1 no mostro tener un efecto sobre la expresión proteica de BDNF.

PERSPECTIVAS

Hacer un monitoreo del tiempo de migración de las células auto-reactivas hasta alcanzar el sitio de la lesión.

Determinar el efecto de la inmunización con Cop-1 sobre la neurogénesis en el sitio isquémico.

BIBLIOGRAFIA.

- Aharoni R, Kayhan B, Eilam R, Sela M, and Arnon R. Glatiramer acetate-specific T cells in the brain express T helper 2/3 cytokines and brain-derived neurotrophic factor in situ. *Proc Natl Acad Sci U S A* 25-11-2003; 100: 14157-14162.
- Alexandrova M and Bochev P. Oxidative stress during the chronic phase after stroke. *Free Radical Biology & Medicine* 39 (2005) 297–316 1 (1996). From *Lucy to language*. New York: Simon and Schuster, p. 80.
- Angelov DN, Waibel S, Guntinas-Lichius O, Lenzen M, Neiss WF, Tomov TL, Yoles E, Kipnis J, Schori H, Reuter A, Ludolph A, and Schwartz M. Therapeutic vaccine for acute and chronic motor neuron diseases: Implications for amyotrophic lateral sclerosis. *PNAS* 15-4-2003; 100: 4790-4795.
- Arango D, Escobar B, Cardona G y Pimienta J. Fisiopatología de la isquemia cerebral focal: aspectos básicos y proyección a la clínica. *Rev Neurol* (2004); 39 (2): 156-165
- Avidan H, Kipnis J, Butovsky O, Caspi RR, and Schwartz M. Vaccination with autoantigen protects against aggregated beta-amyloid and glutamate toxicity by controlling microglia: effect of CD4+CD25+ T cells. *Eur J Immunol* 2004; 34: 3434-3445.
- Azoulay D, Vachapova V, Shihman B, Miler A, Karni A. Lower brain-derived neurotrophic factor in serum of relapsing remitting MS: reversal by glatiramer acetate. *J Neuroimmunol*. 2005;167(1-2):215-8.
- Bethea JR, Castro M, Keane RW, Lee TT, Dietrich WD, and Yezierski RP. Traumatic spinal cord injury induces nuclear factor-kappaB activation. *J Neurosci* 1-5-1998; 18: 3251-3260.
- Block F, Dihne M, and Loos M. Inflammation in areas of remote changes following focal brain lesion. *Progress in Neurobiology* 2005; 75: 342-365.

- Bomstein Y, Marder JB, Vitner K, Smirnov I, Lisaey G, Butovsky O, Fulga V, and Yoles E. Features of skin-coincubated macrophages that promote recovery from spinal cord injury. *J Neuroimmunol* 2003; 142: 10-16.
- Butovsky O, Talpalar AE, Ben-Yaakov K, and Schwartz M. Activation of microglia by aggregated [beta]-amyloid or lipopolysaccharide impairs MHC-II expression and renders them cytotoxic whereas IFN-[gamma] and IL-4 render them protective. *Molecular and Cellular Neuroscience* 2005; 29: 381-393.
- Castillo J, Álvarez-Sabin J, Dávalos E, Díez-Tejedor E, Lizasoain I, Martínez-Vila E, Vivancos J, y Zarranz J (2003) Revisión de Consenso. Neuroprotección Farmacológica en la Isquemia Cerebral: ¿es todavía una opción terapéutica? *Rev Neurología* 18(7):368-384.
- Cheng Y, Al-Khoury L, Zivin J. (2004) Neuroprotection for Ischemic Stroke: Two Decades of Success and Failure. *The Journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics* 1:36-45.
- Doherty EA, Doudna JA. 2001. Ribozyme structures and mechanisms. *Annu Rev Biophys Biomol Struct.* 2001;30:457-75.
- Elkabes S, Peng L, and Black IB. Lipopolysaccharide differentially regulates microglial trk receptor and neurotrophin expression. *J Neurosci Res* 1-10-1998; 54: 117-122.
- Ernfors P, Wetmore C, Olson L, Persson H. 1990. Identification of cells in rat brain and peripheral tissues expressing mRNA for members of the nerve growth factor family. *Neuron.* 1990 Oct;5(4):511-26.
- Fisher J, Levkovitch-Verbin H, Schori H, Yoles E, Butovsky O, Kaye JF, Ben-Nun A, and Schwartz M. Vaccination for neuroprotection in the mouse optic nerve: implications for optic neuropathies. *J Neurosci* 1-1-2001; 21: 136-142.
- Fridkis-Hareli M, Aharoni R, Teitelbaum D, Arnon R, Sela M, and Strominger JL. Binding of random copolymers of three amino acids to class II MHC

- molecules. *Int Immunol* 1999; 11: 635-641.
- Giulian D, Corpuz M, Chapman S, Mansouri M, and Robertson C. Reactive mononuclear phagocytes release neurotoxins after ischemic and traumatic injury to the central nervous system. *J Neurosci Res* 15-12-1993; 36: 681-693.
- Gorantla S, Liu J, Sneller H, Dou H, Holguin A, Smith L, Ikezu T, Volsky D, Poluektova L y Gendelman H; Copolymer-1 Induces Adaptive Immune Anti-inflammatory Glial and Neuroprotective Responses in a Murine Model of HIV-1 Encephalitis; *The Journal of Immunology*, 2007, 179, 4345 -4356
- Gorantla S, Liu J, Wang T, Holguin A, Sneller HM, Dou H, Kipnis J, Poluektova L, Gendelman H. 2008. Modulation of innate immunity by copolymer-1 leads to neuroprotection in murine HIV-1 encephalitis. *Glia*. 2008 Jan 15;56(2):223-32.
- Hauben E, Nevo U, Yoles E, Moalem G, Agranov E, Mor F, Akselrod S, Neeman M, Cohen IR, and Schwartz M. Autoimmune T cells as potential neuroprotective therapy for spinal cord injury. *Lancet* 22-1-2000b; 355: 286-287.
- Hauben E, Butovsky O, Nevo U, Yoles E, Moalem G, Agranov E, Mor F, Leibowitz-Amit R, Pevsner E, Akselrod S, Neeman M, Cohen IR, and Schwartz M. Passive or active immunization with myelin basic protein promotes recovery from spinal cord contusion. *J Neurosci* 1-9-2000a; 20: 6421-6430.
- Hansen A, Lundbaek J (1989) Ion distributions in brain during ischemia. *J Neurosurg Anesth* 1:353-356.
- Hashimoto M, Nitta A, Fukumitsu H, Nomoto H, Shen L y Furukawa S. Involvement of glial cell line-derived neurotrophic factor in activation processes of rodent macrophages. *Journal of Neuroscience* 2005. Vol. 79; issue 4: 476–487.
- Henriques A, Pitzer C, Schneider A. 2010. Neurotrophic growth factors for the treatment of amyotrophic lateral sclerosis: where do we stand? *Front Neurosci*.11;4:32.

- Hirschberg L, Moalem G, He J, Mor F, Cohen I, Schwartz M. 1998. Accumulation of passively transferred primed T cells independently of their antigen specificity following central nervous system trauma. *J Neuroimmunol*. Aug 14;89(1-2):88-96.
- Hofer M, Psgliusi SR, Hohd A, Leibrock J, Barde YA. 1990. Regional distribution of brain-derived neurotrophic factor mRNA in the adult mouse brain. *EMBO journal* 9:2459-2464.
- Iadecola C, Alexander M. 2001. Cerebral ischemia and inflammation. *Curr Opin Neurol* 14(1):89-94.
- Ibarra A, Avendaño H, Cruz Y. 2007. Copolymer-1 (Cop-1) improves neurological recovery after middle cerebral artery occlusion in rats. *Neurosci Lett*. Sep 25;425 (2):110-3. Epub 2007 Aug 28.
- Ibarra A, Hauben E, Butovsky O, Schwartz M. 2004. The therapeutic window after spinal cord injury can accommodate T cell-based vaccination and methylprednisolone in rats. *Eur J Neurosci*. Jun; 19(11):2984-90.
- Jones TB, Ankeny DP, Guan Z, McGaughy V, Fisher LC, Basso DM, and Popovich PG. Passive or active immunization with myelin basic protein impairs neurological function and exacerbates neuropathology after spinal cord injury in rats. *J Neurosci* 14-4-2004; 24: 3752-3761.
- Kipnis J, Yoles E, Porat Z, Cohen A, Mor F, Sela M, Cohen IR, and Schwartz M. 2000. T cell immunity to copolymer 1 confers neuroprotection on the damaged optic nerve: possible therapy for optic neuropathies. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 97: 7446-7451.
- Kipnis J, Yoles E, Schori H, Hauben E, Shaked I, and Schwartz M. Neuronal survival after CNS insult is determined by a genetically encoded autoimmune response. *J Neurosci* 1-7-2001; 21: 4564-4571.

- Kipnis J y Schwartz M. Dual action of glatiramer acetate (COP-1) in the treatment of CNS autoimmune and neurodegenerative disorders. *Trends Mol Med* 2002; 8: 319-323
- Kipnis J, Nevo U, Panikashvili D, Alexandrovich A, Yoles E, Akselrod S, Shohami E and Schwartz M. Therapeutic vaccination for closed head injury. *Journal of Neurotrauma* 2003; 20, 559–569.
- Kumai Y, Ooboshi H, Takada J, Kamouchi M, Kitazono T, Egashira K, Ibayashi S, and Iida M. Anti-monocyte chemoattractant protein-1 gene therapy protects against focal brain ischemia in hypertensive rats. *J Cereb Blood Flow Metab* 2004; 24: 1359-1368.
- Lambelle F, Smeyne R, Barbacid M. 1994. Developmental expression of trkC, the neurotrophin-3 receptor, in the mammalian nervous system. *Journal of Neuroscience*. 14:14-28.
- Lemke M, Demediuk P, McIntosh TK, Vink R, and Faden AI. Alterations in tissue Mg⁺⁺, Na⁺ and spinal cord edema following impact trauma in rats. *Biochem Biophys Res Commun* 30-9-1987; 147: 1170-1175.
- Levi-Montalcini R, Hambueger V. 1951. Selective growth-stimulating effects of mouse salivary glands on the sympathetic system of mammals. *Journal of Experimental Zoology*. 116:321-351
- Maisonpierre P, Belluscio L, Squinto S, Ip N, Furth M, Lindsay R, Yancopoulos, G. 1990. Neurotrophin-3: a neurotrophic factor related to NGF and BDNF" *Science* 247 (4949 Pt 1): 1446–51.
- Moalem G, Monsonogo A, Shani Y and cols. Differential T cell response in central and peripheral nerve injury: connection with immune privilege. *The FASEB Journal*. (1999a) Vol. 13.
- Moalem G, Leibowitz R, Yoles E and cols. Autoimmune T cells protect neurons from secondary degeneration after central nervous system axotomy. *Nat Med*. (1999b) 5, 49–55

- Murray C and Lopez A. Mortality by cause for eight regions of the world: Global Burden of Disease Study. *The Lancet*. 1997 Volume 349(9061)
- Nakajima K, Honda S, Tohyama Y, Imai Y, Kohsaka S y Kurihara T. Neurotrophin secretion from cultured microglia. *Journal of Neuroscience* 2001; vol. 65; issue 4: 322–331
- Novikov L, Novikova L, and Kellerth J. Brain-derived neurotrophic factor promotes axonal regeneration and long-term survival of adult rat spinal motoneurons in vivo. *Neuroscience* 1997; 79: 765-774.
- Pan W, Zhang L, Liao J, Csernus B, and Kastin AJ. Selective increase in TNF alpha permeation across the blood-spinal cord barrier after SCI. *J Neuroimmunol* 2003; 134: 111-117.
- Peña-Tapia P, Díaz A, Torres J. (2004) Oclusión endovascular permanente de la arteria cerebral media en ratas Wistar: descripción del abordaje a través de la arteria carótida interna . *Rev Neurol* 39 (11).
- Popovich PG. Pathological CNS autoimmune disease triggered by traumatic spinal cord injury: implications for autoimmune vaccine therapy. *J Neurosci* 1-4-2002; 22: 2690-2700.
- Saigal R, Renzi C, and Mushahwar VK. Intraspinal microstimulation generates functional movements after spinal-cord injury. *IEEE Trans Neural Syst Rehabil Eng* 2004; 12: 430-440.
- Sánchez CJ. El área de penumbra. *Rev Neurol* (1999) 28; 8: 810-816.
- Santambrogio L, Benedetti M, Chao MV, Muzaffar R, Kulig K, Gabellini N, and Hochwald G. Nerve growth factor production by lymphocytes. *J Immunol* 15-11-1994; 153: 4488-4495.
- Sanz C. 1997. Regulación neurotrófica de la supervivencia neuronal durante el desarrollo embrionario: caracterización de mecanismos de transducción implicados. Tesis doctoral. Universidad de Lleida. Departamento de ciencias medicas básicas. Lérida, España.
- Scheindlin S. Copolymer 1: An Off-Beat Drug Development Story. *Molecular Interventions* 2004; Volume 4, Issue 1.

- Schilling M, Besselmann M, Muller M, Strecker JK, Ringelstein EB, and Kiefer R. Predominant phagocytic activity of resident microglia over hematogenous macrophages following transient focal cerebral ischemia: An investigation using green fluorescent protein transgenic bone marrow chimeric mice. *Experimental Neurology* 2005; 196: 290-297
- Schurer L, Groggaard B, Gerdin B, and Arfors KE. Effects of neutrophil depletion and superoxide dismutase on postischemic hypoperfusion of rat brain. *Adv Neurol* 1990; 52: 57-62.
- Schwartz M. Therapeutic vaccination for closed head injury. *J Neurotrauma* 2003; 20: 559-569.
- Shaked I, Porat Z, Gersner R, Kipnis J, and Schwartz M. Early activation of microglia as antigen-presenting cells correlates with T cell-mediated protection and repair of the injured central nervous system. *J Neuroimmunol* 2004; 146: 84-93.
- Shechter R, London A, Varol C, Raposo C, Cusimano M, Yovel G, Rolls A, Mack M, Pluchino S, Martino G, Jung S, Schwartz M. 2009. Infiltrating blood-derived macrophages are vital cells playing an anti-inflammatory role in recovery from spinal cord injury in mice. *PLoS Med.* Jul;6 (7):e1000113. Epub 2009 Jul 28.
- Taoka Y, Okajima K, Uchiba M, Murakami K, Kushimoto S, Johno M, Naruo M, Okabe H, and Takatsuki K. Role of neutrophils in spinal cord injury in the rat. *Neuroscience* 1997; 79: 1177-1182.
- Tessarollo L, Tsoulfas P, Martin-Zanca D, Gilbert D, Jenkins N, Copeland N, Parada L. 1993. trkC, a receptor for neurotrophin-3, is widely expressed in the developing nervous system and in non-neuronal tissues. *Development* 118 (2): 463-75.
- Torcia M, Bracci-Laudiero L, Lucibello M, Nencioni L, Labardi D, Rubartelli A, Cozzolino F, Aloe L, and Garaci E. Nerve growth factor is an autocrine survival factor for memory B lymphocytes. *Cell* 3-5-1996; 85: 345-356.

- Traystman R, Kirsch J, Koehler RC (1991) Oxygen radical mechanisms of brain injury following ischemia and reperfusion. *J Appl Physiol* 71:1185-1193.
- Valdés-Sánchez T, Kirstein M, Pérez-Villalba A, Vega JA, Fariñas I. 2010. BDNF is essentially required for the early postnatal survival of nociceptors. *Dev Biol.* 2010 Mar 15;339(2):465-76. Epub 2010 Jan 11.
- Van Landeghem FK, Stover JF, Bechmann I, Bruck W, Unterberg A, Buhner C, and Von DA. Early expression of glutamate transporter proteins in ramified microglia after controlled cortical impact injury in the rat. *Glia* 2001; 35: 167-179.
- Yang B, Shan L, Song W, Xiao Z, Shi L y Yuan H. *Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics*. February 2010, 26(1): 11-20. doi:10.1089/jop.2009.0037.
- Yenari MA, Xu L, Tang XN, Qiao Y, Giffard RG.2006. Microglia potentiate damage to blood-brain barrier constituents: improvement by minocycline in vivo and in vitro. *Stroke*. 2006 Apr;37(4):1087-93. Epub 2006 Feb 23.
- Yoles E, Hauben E, Palgi O, Agranov E, Gothilf A, Cohen A, Kuchroo V, Cohen IR, Weiner H, and Schwartz M. Protective autoimmunity is a physiological response to CNS trauma. *J Neurosci* 1-6-2001; 21: 3740-3748.
- Zea Longa, Weinstein P, Carlson S, Cummins R (1989) Reversible middle cerebral artery occlusion without craniotomy in rats. *Stroke* 20.
- Zhai QH, Futrell N, and Chen FJ. Gene expression of IL-10 in relationship to TNF-alpha, IL-1beta and IL-2 in the rat brain following middle cerebral artery occlusion. *J Neurol Sci* 25-11-1997; 152: 119-124.