



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

MAESTRIA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD  
ANIMAL

EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LA INMUNIZACIÓN CON COPAXONA SOBRE  
LA DEGENERACIÓN DEL TEJIDO NEURAL Y LA RECUPERACIÓN MOTORA  
EN UN MODELO DE ISQUEMIA CEREBRAL FOCAL CON REPERFUSIÓN

TESIS

PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

HÉCTOR AVENDAÑO CARRILLO

TUTOR:

IBARRA ARIAS JOSÉ JUAN ANTONIO

COMITÉ TUTORAL:

GUIZAR SAHAGÚN GABRIEL

GUTIÉRREZ OSPINA GABRIEL

México D.F Ciudad Universitaria  
2008



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.

✓ P.  
✓ ind

# Índice

## I. Abreviaturas

✓ 1. Resúmen.....	1
2. Antecedentes.....	2
✓ 3. Anatomía y Fisiología del Cerebro.....	4
3.1. Representación funcional del lóbulo frontal y parietal.....	4
3.2. Constitución celular de la corteza cerebral.....	5
3.3. Fibras corticales.....	8
3.4. Organización del movimiento.....	8
3.5. Áreas motoras de la corteza cerebral.....	14
3.6. Características fisiológicas.....	17
3.7. Circulación sanguínea cerebral.....	18
✓ 4. Etiología de los Accidentes Cerebrovasculares.....	23
4.1. Epidemiología.....	23
4.2. Clasificación.....	26
4.3. Sintomatología.....	27
✓ 5. Fisiopatología de la Isquemia Cerebral Focal.....	30
5.1. Excitotoxicidad.....	31
5.2. Aumento del Ca <sup>2+</sup> intracelular.....	32
5.3. Radicales Libres.....	33
5.4. Ruptura de la Barrera Hematoencefálica.....	33
5.5. Edema cerebral.....	34
5.6. Respuesta inflamatoria.....	34
5.7. Histopatología.....	36
5.8. Penumbra isquémica.....	37
✓ 6. Participación del Sistema Inmunológico en la lesión y restauración del SNC.....	41
6.1. Características de la inmunidad.....	41
6.2. Regulación celular y humoral de la Respuesta Inmunológica.....	47
6.3. Autorreactividad protectora.....	48
✓ 7. Modelos animales para el estudio de la Isquemia Cerebral.....	56
7.1. Oclusión de la ACM.....	57
✓ 8. Estrategias terapéuticas en Accidentes Cerebrovasculares Isquémicos.....	60
8.1. Trombólisis.....	61
8.2. Antitrombóticos.....	62
8.3. Medidas hemorreológicas.....	63
8.4. Vasodilatadores.....	63
8.5. Citoprotección.....	64
8.6. Utilidad de la nanobiotecnología en padecimientos del SNC.....	66
8.7. Estructuración molecular de Copaxone®.....	68
8.8. Propiedades inmunomoduladoras de Copaxone®.....	69

8.9.	Estudios pre-clínicos	70
8.9.1.	Uso Clínico	71
✓ 9.	Justificación	73
✓ 10.	Planteamiento del problema	74
✓ 11.	Hipótesis	74
✓ 12.	Objetivos	75
✓ 13.	Material y métodos	76
13.1.	Tamaño de la muestra	77
13.2.	Diseño experimental	77
13.3.	Procedimiento anestésico y monitoreo	78
13.4.	Modelo de ICF aguda con reperfusión	79
13.5.	Cuidados post-operatorios	82
13.6.	Desempeño locomotor	83
13.7.	Procesamiento histológico	84
13.8.	Técnica de tinción Eosina & Hematoxilina	85
13.9.	Descripción operativa de las variables	86
13.9.1.	Determinación del infarto.	86
✓ 14.	Resultados	87
14.1.	Análisis estadístico	87
14.2.	Monitoreo Anestésico	87
14.3.	Evaluaciones neurológicas	89
14.4.	Análisis Histológico	90
✓ 15.	Discusión	92
15.1.	Autorreactividad protectora en la Isquemia Cerebral.	92
✓ 16.	Conclusiones	98
✓ 17.	Referencias	99

## Resumen

---

Los Accidentes Cerebrovasculares se caracterizan por la suspensión abrupta del Flujo Sanguíneo Cerebral a nivel regional o generalizado, provocando consecuencias devastadoras que abarcan desde la inhabilidad laboral hasta la muerte. La inflamación se ha asociado tradicionalmente con la exacerbación del daño; sin embargo en modelos de lesiones agudas del Sistema Nervioso Central, la inmunomodulación con péptidos no encefalitogénicos estimula mecanismos anti-inflamatorios que favorecen la recuperación anatomofuncional. Tomando en cuenta la actividad del Sistema Inmunológico durante y después de la Isquemia Cerebral (inflamación/neuroprotección/neurogénesis), se evaluó en ratas Sprague-Dawley el efecto de la inmunización con Copaxone sobre la recuperación funcional y la preservación del tejido cerebral en un modelo de Isquemia Cerebral Focal aguda, comparada con otro grupo al que solo se le administro Solución Salina Fisiológica; siete días después de la lesión, el grupo inmunizado con Copaxone presentó una recuperación neurológica significativamente superior a la del grupo tratado con Solución Salina Fisiológica ( $1.2 \pm 0.4$  **versus**  $2.8 \pm 0.5$  m  $\pm$  D.E respectivamente) y así mismo, menor área de infarto ( $4.8 \pm 1.5$  **versus**  $32.2 \pm 8.6$  respectivamente;  $p=0.004$ ); de acuerdo a los resultados obtenidos, la inmunización con Copaxone en ratas Sprague-Dawley disminuye el área de lesión cerebral y favorece la recuperación funcional en la fase sub-aguda de la Isquemia Cerebral Focal.

Palabras clave: Isquemia Cerebral, Inmunomodulación, Copaxone.

## Antecedentes

El término **–\*Ictus–** deriva de un vocablo latino, que de forma similar a su correspondiente anglosajón **–Stroke–**, significan "**Golpe**"; ambos términos describen el carácter brusco y súbito de la patología (Díez, 2001), causada por la reducción o suspensión abrupta del Flujo Sanguíneo Cerebral (**FSC**) a nivel focal (trombos/émbolos[85%], aneurismas, traumatismo cráneo-encefálico) (Leker, 2002) o generalizado (paro cardiorespiratorio, complicaciones anestésicas [pacientes de neurocirugía o riesgo anestésico ASA IV, diabéticos, etc.], trasplantes cardíacos [suspensión de la circulación sanguínea], choque hipoglucémico, crisis convulsivas prolongadas, intoxicación aguda por monóxido de carbono, etc.) (Herrerías, 2002) hasta niveles insuficientes para mantener el débito metabólico de la unidad anatomofuncional del cerebro; por otro lado, destaca como la principal causa de invalidez laboral a nivel mundial y en países industrializados, ocupa el segundo lugar en la incidencia de mortalidad (1 de 3 fallece) (Murray, 1997).

El proceso inflamatorio durante la **Isquemia Cerebral (IC)** ha sido asociado tradicionalmente con la exacerbación de la lesión; sin embargo, se ha demostrado de manera contundente en estudios pre-clínicos de lesiones agudas del **Sistema Nervioso Central (SNC)**, que inmunomodular ciertos aspectos de la respuesta inflamatoria a través de **Ligandos de Péptidos Alterados (LPA)**, evita la propagación del daño y favorece la neuroprotección. Tomando en cuenta la función que desempeña el **Sistema Inmunológico (SI)** durante y después de la **IC**

(inflamación/neuroprotección/neurogénesis), se formuló la hipótesis de evaluar en un modelo de **Isquemia Cerebral Focal (ICF)**, la efectividad de una innovadora estrategia inmunomoduladora a través de **Copaxone®** (Copaxona, Acetato de Glatiramer, Cop-1).

Cop-1 está aprobado a nivel Internacional por la agencias reguladoras de salud para el control de la sintomatología neurológica causada por la **Esclerosis Múltiple (EM)**; su mecanismo de acción se caracteriza por regular la liberación de citocinas pro-inflamatorias provenientes de los **Linfocitos T (LT) Th1** (Aharoni, 2000) e inducir la expresión de un fenotipo anti-inflamatorio (IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 y TGF  $\beta$ ) *in situ* (Aharoni, 2000-2003; Vieira, 2003) a través de los **LT Th2/Th3** (Prat, 2005; Duda, 2000).

*\*Con la finalidad de evitar confusiones terminológicas en el lector, es conveniente mencionar que en la presente tesis utilizamos la siguiente sinonimia: Ictus, **Accidentes Cerebrovasculares (ACV's)**, Aneurismas, **Enfermedades Cerebrovasculares (ECV's)**, Isquemia Cerebral, Infarto cerebral y Embolia Cerebral (haciendo referencia a la **ICF**).*

# Anatomía y Fisiología del Cerebro

---

**Hemisferios Cerebrales.** El cerebro se constituye por dos hemisferios (izquierdo y derecho), unidos por las comisuras interhemisféricas; cada hemisferio está parcialmente separado en la línea media por la cisura interhemisférica; así mismo, en la superficie dorsolateral, se localizan dos cisuras profundas: la central de Rolando y la lateral de Silvio (López, 2003).

## ∞ Representación funcional del lóbulo frontal y parietal

El lóbulo frontal se extiende desde el polo frontal del hemisferio hasta las cisuras central y lateral (Kandel, 2001); ocupa la mayor parte de la circunvolución precentral y la zona anterior del lóbulo paracentral, en donde se sitúa el área motora que corresponde en gran parte al área 4 de Brodmann; la parte dorsal del área, parece estar relacionada con los movimientos de los miembros inferiores, la parte media con los de la extremidad superior y tronco, y la parte inferior con los de la cabeza y cuello. Rostral al área 4s se encuentra el área 6, que se extiende también a la superficie medial del hemisferio (ha sido dividida en áreas 6 $\alpha$  y 6 $\beta$ ) (López, 2003). El área 6 $\alpha$  (que es paralela al área 4) al ser estimulada produce efectos parecidos a los que se obtienen de la propia área 4. La estimulación del área 6 $\beta$  (que queda rostral a la 6 $\alpha$ ) provoca desviación de la cabeza y del tronco hacia el lado opuesto a la estimulación. El área 6 (considerada por algunos neurólogos como extrapiramidal) complementa

probablemente la acción del área 4 (López, 2003); ésta parte del lóbulo frontal tiene numerosas conexiones con regiones corticales y subcorticales que integran mecanismos asociativos relacionados con las más complejas funciones intelectuales y de expresión afectiva de la conducta (Kandel, 2001); por otro lado, en la circunvolución post-central se encuentran las áreas 3, 1 y 2, que en su conjunto forman una zona que inferiormente llega al nivel en que termina el área 4, ésta zona constituye el área somestésica, en donde arriban las vías específicas que conducen información exteroceptiva cutánea y propioceptiva general (López, 2003).

### ∞ **Constitución celular de la corteza cerebral**

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

**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, que 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 supra-adyacentes y su axón se dirige a la sustancia blanca subcortical.

**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, que son de pequeño y mediano tamaño; 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 córticoespinal 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).

### ∞ **Organización del movimiento**

El movimiento es el resultado de una integración sensoriomotora que ocurre en todos los niveles del sistema nervioso; su entendimiento es de especial interés para identificar la región afectada en pacientes con **ACV's**.

**Nivel efector.** Se constituye por las motoneuronas que descargan desde diferentes niveles del sistema nervioso estímulos al músculo estriado y así mismo las del complejo efector. Las neuronas que constituyen la vía de salida de los impulsos al músculo estriado se clasifican en dos grupos: eferentes somáticas (que inervan los músculos) y eferentes viscerales (que están en relación con la musculatura que se origina en los arcos branquiales); las eferentes somáticas se encuentran en la lámina IX del asta ventral de la médula de donde parten los impulsos a los músculos del cuello, tronco y miembros a través de los nervios espinales, y en la columna eferente somática situada en el tallo cerebral, cuyos núcleos inervan los músculos extraoculares y linguales por medio de los nervios craneales III, IV, VI y XII; por otro lado, las neuronas eferentes viscerales se localizan en los núcleos de la columna homónima y en el tallo cerebral a través de los nervios V, VII, IX y X que activan los músculos masticadores, faciales, del oído medio, faringe, laringe, y algunos del cuello (todos de origen branquial) (López, 2003).

**Unión neuromuscular.** Al llegar al músculo estriado los axones de las neuronas eferentes terminan formando parte de la unión neuromuscular, cuya organización morfofuncional es de gran importancia; las fibras nerviosas penetran al músculo estriado, alcanzan el espacio endomisial y finalmente se ponen en contacto con el

sarcolema de la fibra muscular; la terminación nerviosa puede adoptar el tipo placa o en racimo; en la placa, el axón forma una dilatación discoidea hacia el centro de la fibra muscular (que es propiamente la llamada placa motora terminal) (López, 2003).

**Haz córticoespinal.** Éste sistema conduce impulsos desde la corteza cerebral hasta las motoneuronas del tallo cerebral y la médula espinal, sobre las que tiene efecto por medio de las interneuronas. De la región post-central, en el lóbulo parietal, se han encontrado fibras que parten de las áreas 1, 2, 3, 5 y 7 y probablemente de la corteza temporal y occipital; el aporte de fibras del sistema córticoespinal y los lóbulos parietal, temporal y occipital, sugiere que su función no es solamente conducir impulsos para activar a las motoneuronas del tallo cerebral y la médula espinal, sino que pueden tener influencia sobre otros grupos neuronales. Las fibras del sistema córticoespinal (desde su origen en la corteza) cursan por la sustancia blanca del hemisferio hasta la cápsula interna; después de pasar por la cápsula interna, llegan al mesencéfalo situándose en los tres quintos medios de la base del pedúnculo cerebral; al llegar al puente descienden por la porción basilar donde son disociadas en un número variable de fascículos por las fibras transversales pontocerebelosas; en el bulbo, el sistema córticoespinal ocupa las pirámides hasta el límite con la médula, donde ocurre la decusación de gran parte de sus fibras, en éste nivel se ha determinado una disposición somatotópica con la cara (representada dorsomedialmente) y el miembro inferior (ventrolateralmente). Durante su trayecto por el tallo cerebral, el sistema córticoespinal emite fibras que terminan en relación con las neuronas de los núcleos que forman las columnas eferentes somática y eferente visceral especial, y con

neuronas de la formación reticular, a través de la cual es posible que tenga influencia sobre las células de núcleos sensoriales: núcleo principal del V, núcleos gracilis y cuneatus, etc. El efecto del sistema córticoespinal sobre los núcleos motores es probable que también se lleve a cabo a través de interneuronas, algunos núcleos motores reciben fibras cruzadas y directas por ejemplo, el del III, el del XII y el ambiguo; lo mismo ocurre con la parte del núcleo del VII que inerva los músculos de la parte superior de la cara (López, 2003).

**Decusación córticoespinal.** Al llegar al límite caudal del tallo cerebral, el sistema está formado exclusivamente por el componente córticoespinal, cuyas fibras terminan en la médula espinal; gran parte (del 70 al 90%) cruza al lado opuesto de su origen en la decusación córticoespinal o piramidal que se encuentra en la parte ventral del bulbo; después de cruzarse, descienden por el cordón lateral de la médula formando el haz córticoespinal lateral; parte de las fibras córticoespinales no pasan por la decusación, sino que descienden directamente a la médula (del mismo lado en que se originaron constituyendo el haz córticoespinal ventral). Las fibras que provienen de la corteza sensorial post-central transmiten impulsos que probablemente modulan la información sensorial que llega a los núcleos aferentes del tallo cerebral al asta dorsal de la médula; por otra parte, las fibras motoras córticoespinales parecen ejercer una acción facilitadora sobre las neuronas flexoras  $\alpha$  y  $\gamma$ , y un efecto inhibitor sobre las motoneuronas extensoras (López, 2003; Kandel, 2001).

**Haz rubroespinal.** Se origina en las células grandes y pequeñas de tipo motor; después de su origen las fibras de lado opuesto en la decusación segmental ventral descienden por el tallo cerebral hasta la médula espinal, en ésta última ocupan el cordón lateral y alcanzan la región lumbosacra (por consiguiente éste haz es totalmente cruzado). La somatotopía que se conserva a través de la proyección córticorubral, rubroespinal y la terminación de las fibras córticoespinales y rubroespinales sobre las láminas del asta dorsal de la médula, sugiere un tipo de influencia similar en los dos sistemas (sobre las neuronas flexoras, que se haría a través de una vía córticoespinal y de otra córticorubroespinal) (López, 2003).

**Sistema vestíbulo espinal.** Se origina en el núcleo vestibular lateral y medial; está constituido por dos haces: el vestíbulo espinal lateral que se inicia en el núcleo lateral y el vestíbulo espinal medial que proviene del núcleo homónimo. El haz lateral está formado por axones de las células grandes y pequeñas del núcleo de Deiters; desciende ipsilateralmente hasta la médula donde cursa por el cordón ventrolateral alcanzando niveles lumbosacros, termina en las láminas VII y VIII en relación con la interneuronas de ésta parte de la sustancia gris medular. El haz medial se inicia en el núcleo vestibular medial y desciende incorporado al fascículo longitudinal medial de ambos lados, algunas de sus fibras son cruzadas y llegan hasta niveles torácicos de la médula. El haz vestíbuloespinal lateral procede de la parte del núcleo vestibular lateral que recibe impulsos de la porción vermiana del cerebelo, del núcleo fastigiado y de la parte vestibular del cerebelo y ejerce una acción facilitadora sobre las motoneuronas extensoras e inhibitora sobre las flexoras. El haz vestíbulo espinal medial tiene

influencia sobre las neuronas que inervan el cuello, miembro superior y parte alta del tórax (López, 2003; Kandel, 2001).

**Sistema retículo espinal.** La formación reticular actúa sobre las motoneuronas  $\alpha$  y  $\gamma$  de la médula, a través de fibras que se originan en las células grandes de dicha estructura (situadas en los niveles pontino y bulbar); ambas descienden ipsi y contralateralmente a la médula; aunque algunas fibras bulbares alcanzan la lámina IX, las fibras pontinas terminan en situación más central que estas, los efectos que ejerce la formación reticular sobre la médula pueden ser de dos tipos: inhibidores o facilitadores. La acción de la formación reticular sobre las motoneuronas  $\gamma$  es predominantemente excitadora, aunque se ha postulado que puede ser también inhibidora (López, 2003).

**Haz tectoespinal.** Después de su origen en el tectum, las fibras rodean la sustancia gris periacueductual y pasan al lado opuesto de la decusación segmental dorsal; así mismo, descienden por la formación reticular del tallo cerebral hasta la médula espinal; se supone que constituye una vía por la que el tectum mesencefálico controla los movimientos de la cabeza y el miembro superior.

**Otros fascículos descendentes.** El haz intersticioespinal procede de las células del núcleo intersticial de Cajal situado en la parte rostral del mesencéfalo; por otro lado, el haz olivoespinal está formado por fibras que provienen de la oliva inferior y desciende ipsilateralmente hasta los segmentos cervicales de la médula.

## ∞ Áreas motoras de la corteza cerebral

Se ha establecido que la representación motora en la corteza cerebral tiene un componente precentral que comprende las áreas Ms-I y Ms-II y otro post-central que conforma las áreas Sm-I y Sm-II. El área Ms-I o somatomotora primaria abarca las áreas 4 y 6 de la carta de Brodmann; el área Ms-II o área motora suplementaria se encuentran en el lóbulo paracentral vecina a la prolongación del área Ms-I en la cara media del hemisferio. El área Sm-I o somatosensorial primaria corresponde a las áreas 3, 1 y 2 de Brodmann (área somestésica), y el área Sm-II se encuentra en el labio superior de la cisura lateral cercana a la parte inferior del área Sm-I y se extiende hasta la vecindad de la ínsula. Los movimientos evocados desde la corteza cerebral son generalmente contralaterales, especialmente en la musculatura de los miembros, pero pueden ser también bilaterales en algunos casos. Un punto determinado de la corteza motora puede provocar respuesta en un músculo o grupo de músculos de una parte del cuerpo (Kandel, 2001). Las áreas sensoriomotoras de la corteza cerebral ejercen una acción moduladora sobre la información sensorial que están recibiendo en los centros, este efecto se lleva a cabo a través de las fibras córticoespinales que parten de dichas áreas; estos efectos (sobre los núcleos y las vías sensoriales) forman parte de los mecanismos que discriminan la información sensorial que llegará a la propia corteza (López, 2003).

**Sistema córticorubro-espinal.** Los impulsos que se originan en la corteza motora son descargados al núcleo rojo y éste envía fibras a la médula espinal a través del haz

rubroespinal; dicho sistema termina en la sustancia gris de la médula y tiene acción activadora sobre las motoneuronas flexoras e inhibidora sobre las extensoras. Con base a la similitud funcional, se propone la existencia de un gran sistema formado por el conjunto de fibras córticoespinales y rubroespinales que tendrían influencia preponderadamente sobre las motoneuronas situadas en la parte lateral de la lámina IX que inervan los músculos distales (López, 2003; Kandel, 2001).

**Sistema vestíbulo espinal.** El haz vestíbuloespinal lateral tiene acción facilitadora sobre las neuronas extensoras e inhibidora sobre las flexoras, por consiguiente su función es mantener activados los músculos extensores y contribuir en el mantenimiento de la postura; por otra parte, el núcleo vestibular lateral recibe impulsos de la región del cerebelo que está en relación con la información propioceptiva originada en los receptores musculares y tendinosos; siendo su función principal la regulación del tono y la postura (López, 2003).

**Sistema retículoespinal.** La formación reticular tiene influencia sobre las motoneuronas  $\alpha$  y  $\gamma$  de la médula espinal, su efecto sobre las  $\gamma$  parece ser fundamentalmente excitador, manteniendo activados los usos musculares, de ésta manera interviene en el mantenimiento del tono muscular. La acción sobre las motoneuronas  $\alpha$  puede ser facilitadora o inhibidora; las fibras retículoespinales transmiten a la médula impulsos que expresan los mecanismos integrativos (López, 2003; Kandel, 2001).

**Otros haces.** El haz tectoespinal que proviene del tectum mesencefálico probablemente tiene la función de regular los movimientos de los músculos del cuello en relación con reflejos tectales, visuales o auditivos. Los haces vestíbulo espinales, tectoespinal y retículoespinal parecen constituir en conjunto un sistema subcortical a través del cual actúa sobre la vía final común para integrar respuestas en relación con el mantenimiento y regulación del tono, y reflejos que implican movimientos de la cabeza, miembro superior y tronco, en respuesta a diferentes tipos de información: propioceptiva, visual, auditiva, etc.

De la organización descrita, se deduce que el “**nivel de salida**” hacia los efectores, está sujeto a la modulación central y en un momento dado ocupa la vía final común, en una forma similar a la que ocurren en el filtrado de la información sensorial; ésta modulación traduce la actividad que ocurre en los centros cuando llega un impulso sensorial o se descarga un impulso motor, así el sistema nervioso ordena sus reacciones en espacio y tiempo. Las lesiones del sistema córticoespinal se manifiestan clínicamente por parálisis de los movimientos voluntarios (especialmente los finos discriminativos), destreza motora, disminución transitoria del tono muscular (que es sustituida por espasticidad), aumento de los reflejos ósteotendinosos (con respuesta clónica), abolición de los reflejos abdominales y cremasteriano e inversión del reflejo plantar o signo de Babinski (López, 2003).

## ↪ Características fisiológicas del Cerebro

El **SNC**, es indudablemente el dispositivo más complejo creado por la naturaleza; su unidad anatomofuncional es la neurona, células especializadas en generar, recibir y transmitir señales de y para otros sistemas. En humanos, el cerebro representa 2.5% del peso corporal pero recibe el 15% del flujo cardíaco y en condiciones fisiológicas consume 20% del O<sub>2</sub> aportado, teniendo un radio de recaptura entre el O<sub>2</sub> y la glucosa de 6 (Secher, 2005) pudiéndose incrementar hasta 3.5 veces en comparación a otras especies primates. A diferencia de lo que ocurre en otros tejidos, el **FSC** total se mantiene entre 55 ml/min/100 gr de tejido cerebral, y su interrupción por tan solo 5 segundos provoca pérdida de la conciencia (Levy, 2006). Algunos parámetros del metabolismo energético cerebral como: el **FSC**, consumo de O<sub>2</sub> y metabolismo glucogénico (tasa metabólica cerebral) se han estudiado extensamente en humanos y animales de experimentación utilizando marcadores, autoradiografía, **Tomografía Axial Computarizada** (TAC), **Tomografía por emisión de positrones** (PET) y **Resonancia Magnética** (RM) (Timiras,1997); se ha comprobado que las neuronas del **SNC** dependen esencialmente de glucosa como sustrato energético (excepto en circunstancias de cetosis y ayuno prolongado) (Lee, 2000) y su funcionamiento se relaciona íntimamente con su vasculatura, por lo que éste binomio se considera una sola entidad (neurovascular) (Hallenbeck, 2006); para que se lleve a cabo su funcionamiento se requiere de neurotransmisores (por sus propiedades vasoactivas) como la adenosina, **Oxido nítrico** (NO), dopamina y serotonina, así como de los iones K<sup>+</sup> liberados al espacio extracelular por las neuronas y astrocitos; estos últimos son

células eléctricamente inexcitables y son considerados tradicionalmente como células de sostén (producción de neurotrofinas y citocinas) (Chan,2002), su función principal es responder a la actividad neuronal a través de sustancias vasoactivas como las prostaglandinas **PGE<sub>2</sub>** y las enzimas **Ciclooxigenasas** (COX) 1 y 2; la consecuencia funcional en la producción de éstas sustancias es el aumento del **FSC** en las regiones más activas metabólicamente, evento que permite aumentar el suministro de nutrientes en las zonas con mayor actividad neuronal (Tamayo, 2007).

### ∞ **Circulación sanguínea cerebral**

El encéfalo y parte de la médula espinal están irrigados por dos sistemas arteriales: a) el carotideo y b) el vertebro-basilar, que se comunican a nivel del polígono de Willis situado en la base del cerebro. El sistema carotideo está constituido por las arterias carótidas internas, que son una de las ramas de bifurcación de las carótidas comunes.

**La Arteria Carótida Interna** (ACI) está en relación (en su origen) con el seno carotideo y asciende hasta la base del cráneo para penetrar al conducto carotideo del temporal, del cual emerge cerca del vértice del peñasco; a continuación recorre el seno cavernoso y a nivel de la apófisis clinoides anterior lo abandona para después dar origen a las ramas arteriales oftálmicas (Kandel, 2001; López, 2003) y posteriormente dividirse en la **Arteria Cerebral Anterior** (ACA) (que irriga la porción paramediana anterior del hemisferio cerebral) y **Arteria Cerebral Media** (ACM) (que irriga los dos tercios anteriores del hemisferio cerebral, los ganglios basales y la capsula interna) (Zarranz, 2003; Netter,1987). La disposición de la **ACI** en el seno cavernoso constituye

el único caso en que una arteria se encuentra dentro de un conducto venoso; por otro lado, la **Arteria Coroidea Anterior** (ACA), cursa hacia atrás sobre el uncus del hipocampo y debajo de la cintilla óptica, alcanza la base del pedúnculo cerebral para llegar a nivel del cuerpo geniculado lateral, después atraviesa la cisura coroidea y penetra a la prolongación temporal del ventrículo lateral donde forma parte del plexo coroideo. La lesión u obstrucción ocasiona hemiplejía y hemianopsia o cuadrantopsia contralaterales, la primera por afectarse la cápsula interna y los trastornos visuales por isquemia de la radiación óptica, en especial de la onda de Mayer (Kandel, 2001); por otro lado, la **ACM** origina ramas perforantes lenticuloestriadas que salen del tronco horizontal principal y se trifurca en las proximidades de la cisura lateral (de Silvio) en dos troncos principales, superior e inferior, y una arteria temporal de menor calibre; las ramas corticales de la **ACM** es la arteria órbitofrontal destinada a la parte lateral de la superficie orbitaria del lóbulo frontal y a la circunvolución frontal inferior; la precentral o prerrolándica que se distribuye por la circunvolución homónima, la rolándica o central que irriga las zonas de las circunvoluciones pre y post-central adyacentes a la cisura central, las temporales anterior y posterior que se distribuyen en la punta del lóbulo temporal y en la parte anterior de la primera y segunda circunvoluciones temporales; la oclusión o ruptura provoca lesiones extensas por el amplio territorio de su irrigación, se presenta hemiplejía y hemianestesia por isquemia de las áreas sensoriomotoras centrales y de la cápsula interna, y hemianopsia contralateral por afección del haz geniculocalcarino (Kandel, 2001).

**Sistema vertebro–basilar.** La arteria vertebral es una rama de la subclavia, se origina en la parte posterosuperior en su primera porción o segmento intraescalénico, después asciende por la parte profunda del cuello, entre los músculos escalenos anterior y largo del cuello y por delante de ella se encuentra la carótida común contenida en el paquete neurovascular; pasa por delante de la apófisis transversa de la séptima vértebra cervical y de las ramas ventrales de los nervios C<sub>8</sub> y T<sub>1</sub>; cruza por la arteria tiroidea inferior que se dirige medialmente para alcanzar el polo inferior del lóbulo tiroideo correspondiente, a continuación asciende verticalmente a través de los agujeros transversos de las vértebras cervicales pasando entre los músculos intertransversos acompañada de ramas procedentes del ganglio cervical inferior del simpático y de un plexo venoso que en la parte inferior del cuello va a formar la vena vertebral; al salir del agujero transverso del axis cursa lateralmente para atravesar el del atlas, cuando emerge de éste se encuentra entre el recto lateral que está hacia fuera y la rama ventral de C<sub>1</sub> situada hacia dentro, dirigiéndose medialmente por detrás de la masa lateral del atlas; en su porción raquídea perfora la dura y el aracnoides y sube por el espacio subaracnoideo pasando por delante de la primera digitación del ligamento dentado, para penetrar al cráneo por el agujero magno (López, 2003); posteriormente cruzan por delante las raíces del XII par craneal y se dirige a la parte anterior del bulbo hasta el surco pontobulbar donde se une con la del lado opuesto para formar la arteria basilar, cuyas ramas irrigan el tronco cerebral y cerebelo (Kandel, 2001), para después dividirse en las dos arterias cerebrales posteriores que irrigan el tercio posterior de los hemisferios cerebrales incluyendo la parte posterior del tálamo. El sistema carotideo bilateral se encuentra interconectado a través de la arteria comunicante anterior, se

anastomosa con el territorio vertebrobasilar a través de las arterias comunicantes posteriores, de ésta manera se constituye el polígono de Willis que provee una vía colateral para asegurar la irrigación del **SNC** (Zarranz, 2003).

**Arteria cerebelosa pósteroinferior.** Es la rama más importante de la vertebral, se dirige dorsalmente contorneando la parte lateral del bulbo por detrás de la oliva inferior y de las raíces del IX y X par craneal cerca del surco pontobulbar, cambia su trayecto y cursa por el borde caudolateral del cuarto ventrículo; a partir de ahí se dirige ventrolateralmente para distribuirse por la superficie inferior del vermis y los hemisferios cerebelosos a través de una rama lateral y otra medial; su territorio comprende la región dorsolateral del bulbo incluyendo el núcleo y haz espinal del V par craneal; en el cerebelo irriga la parte inferior del vermis, las amígdalas y la región inferior del hemisferio.

**Arteria basilar.** Se forma por la unión de las arterias vertebrales a nivel del surco pontobulbar, asciende entre la superficie ventral del puente donde está en relación con el surco medio de esta estructura y el clivus, del que está separada por los nervios abducens; llega al surco pontopeduncular donde da sus ramas terminales.

**Polígono de Willis.** A su nivel se establece comunicación entre las arterias del encéfalo y los sistemas carotídeo y vértebro-basilar de cada lado; está formado hacia delante por las arterias cerebrales anteriores unidas por la comunicante anterior, lateralmente por las comunicantes posteriores que relacionan las carótidas internas con

las cerebrales posteriores y hacia atrás por las ramas terminales de la basilar. En el área del polígono se encuentra la lámina terminal, el infundíbulo, el túbulo cinéreo, la hipófisis, los cuerpos mamilares y el quiasma; aunque en el polígono se comunican los principales vasos que irrigan al cerebro, en condiciones normales no parece haber mezcla importante en la sangre de los diferentes segmentos que lo forman (López, 2003; Zarranz, 2003).

# Etiología de los Accidentes Cerebrovasculares

---

Los **ACV's** representan un grupo de trastornos heterogéneos que incluyen: el infarto cerebral isquémico (80 %) y las hemorragias cerebrales o subaracnoideas; patologías como la aterosclerosis provocan del 60 al 70% de los padecimientos isquémicos (Lindsberg, 2003; DeGraba, 2004) y su desarrollo se asocia a la actividad de células inflamatorias como: monocitos, macrófagos y **LT CD<sup>4+</sup>** (Gorelick, 2002; O'Rourke, 2004; Stoll, 2006; Anna-Karin, 2006) que favorecen la ruptura de la placa y al estado protrombótico (Stoll, 2006) a nivel aórtico, cervical o intracraneal. (Origen de la **ACM** y arteria basilar) (González, 2002). Otra de las causas que provoca oclusión total o parcial de la vasculatura, es el desequilibrio hemorreológico y de los factores de coagulación; se ha demostrado que el incremento en la viscosidad sanguínea, plasmática y del fibrinógeno, favorece al estado protrombótico por la activación plaquetaria y de  $\beta$ -tromboglobulina (Fisher, 1991).

## ∞ Epidemiología

Destaca a nivel mundial por ser la principal causa de invalidez laboral, y en países industrializados, ocupa el segundo lugar en la incidencia de mortalidad de la población adulta (1 de 3 fallece) (tabla 1) (Murray, 1997). El sexo femenino tiene mayor predisposición que el masculino para desarrollar un **ACV**, la causa está asociada principalmente con antecedentes genéticos maternos (Touze, 2008).

Los datos registrados en la encuesta mexicana de salud del 2004, indican que los **ACV's** representan la cuarta causa de muerte en adultos; teniendo mayor predisposición el sexo masculino; sin embargo, en adultos > de 65 años afecta principalmente al femenino (Velázquez, 2007). Aunque se registra una gran heterogeneidad racial (Stansbury, 2005), estudios epidemiológicos asocian su desarrollo a cierta susceptibilidad genética (se han identificado 32 genes aproximadamente) (Casas, 2004; Flobmann, 2004; DeGraba, 2004; Meschia, 2004; Wang, 2005; Alexandrova, 2005) y a la interacción de factores de riesgo como: hipertensión, aterosclerosis, leucocitosis (neutrofilia principalmente), dislipidemia, síndrome metabólico, diabetes mellitus, tabaquismo, alcoholismo, consumo de ciertas drogas recreativas, enfermedades cardíacas, infecciones crónicas y agudas, sedentarismo, edad avanzada etc. (figura 1) (Chamorro, 2006; Vargas 2006; Jood, 2005; Alexandrova, 2005; Grau, 2004; Lindsberg, 2003; Reynolds, 2003; Prass, 2003; Gorelick, 2002; Elkind, 2002); por otro lado, el diagnóstico y tratamiento (por más de 1 año) demanda altos costos sociales, tecnológicos y financieros (Dyker, 1999; Bath, 2000; Velázquez, 2007; Arango, 2004), además de tener grandes probabilidades que la patología reincida (Kolominsky-Rabas, 2001; Wong, 2002; Appelros, 2003); en éste contexto, destaca el estudio multicéntrico **RENAMEVASC** (Registro Nacional Mexicano de Enfermedad Vascul ar Cerebral) realizado por **Arauz y cols** (2006) en pacientes atendidos en las dos primeras semanas de la sintomatología; de acuerdo a los resultados, los adultos > de 65 años (74%) o personas con hipertensión arterial (64%), diabetes mellitus (45%), dislipidemia (36%) y obesidad (31%) presentaron mayor frecuencia en la recurrencia del evento isquémico durante los primeros 30 días (16 %).

**Tabla 1. Incidencia de mortalidad por ACV's a nivel Internacional (por cada 100000 habitantes)**

<b>F.de Rusia</b>	<b>2002</b>	<b>453</b>
Bulgaria	2004	227
<b>Romania</b>	<b>2004</b>	<b>251</b>
Hungría/ Polonia	2003	181
<b>República Checa</b>	<b>2004</b>	<b>118</b>
China Rural	1999	194
<b>Argentina</b>	<b>2001</b>	<b>243</b>
China Urbana	1999	103
<b>Escocia</b>	<b>2002</b>	<b>217</b>
Irlanda	2002	61
<b>Finlandia</b>	<b>2004</b>	<b>41</b>
Colombia	1999	54
<b>Norte de Irlanda</b>	<b>2002</b>	<b>95</b>
Grecia	2003	53
<b>Inglaterra/Gales</b>	<b>2002</b>	<b>68</b>
Bélgica	1997	49
<b>Estados Unidos</b>	<b>2004</b>	<b>50</b>
Dinamarca	2001	35
<b>Nueva Zelanda</b>	<b>2000</b>	<b>52</b>
Alemania	2004	40
<b>Portugal</b>	<b>2003</b>	<b>39</b>
Suecia	2002	96
<b>Korea</b>	<b>2002</b>	<b>44</b>
<b>México</b>	<b>2001</b>	<b>143</b>
<b>Austria</b>	<b>2004</b>	<b>58</b>
Países Bajos	2004	34
<b>Italia</b>	<b>2002</b>	<b>37</b>
Noruega	2003	41
<b>Canadá</b>	<b>2002</b>	<b>38</b>
España	2003	28
<b>Australia</b>	<b>2002</b>	<b>43</b>
Francia	2002	30
<b>Sulza</b>	<b>2002</b>	<b>35</b>
Israel	2003	23
<b>Japón</b>	<b>2003</b>	<b>38</b>

Adaptada del reporte estadístico de la American Heart and Stroke Association (Rosamond, 2008).

**Figura 1. Factores que predisponen al ACV**



**Figura 1. Los ACV's son patologías heterogéneas en la que interactúan factores genéticos, sistémicos y locales para su desarrollo. La detección y tratamiento oportuno disminuyen la incidencia de la enfermedad.**

## ∞ Clasificación

De acuerdo al criterio del estudio **TOAST** (Trial of ORG 10172 in Acute Stroke Treatment) las causas y los subtipos del **ACV** se clasifican de la siguiente manera (Adams, 1993):

1. **Ateroesclerosis** de grandes arterias (incluye trombosis en arterias largas y embolismo arteria-arteria).
  - a) **Isquémico**. Representan el 80% de los **ACV's** (Arango, 2004; Durukan, 2007), lo conforman el infarto aterotrombótico, la arteriosclerosis de grandes vasos y el infarto cerebral de tipo lacunar; los sustratos más frecuentes son la microateromatosis y lipohialinosis, pero pueden existir otras causas potenciales.
  - b) **Transitorio**. Provoca disfunción cerebral focal a causa de una insuficiencia vascular por trombosis o embolismo arterial; la duración de los síntomas es menor a 24 h
2. **Cardioembolismo**. El infarto puede ser de tamaño medio (1,5-3 cm) o grande (> 3 cm), habitualmente de topografía cortical; se caracteriza por el antecedente de cardiopatías embolígenicas y la ausencia de oclusión o estenosis arterial significativa.
3. **Oclusión de pequeñas arterias**.
4. **ACV's** de otra causa.
  - a) **Hemorrágico**. Se desarrolla por ruptura vascular, ya sea en el parénquima (“hemorragia intracraneal”) o superficie cerebral (“hemorragia subaracnoidea”).
5. **ACV's** de causa indeterminada.

Esta clasificación se basa en los factores de riesgo y pruebas diagnósticas como: **TC**, **RM**, **PET**, imagenología vascular (doppler transcraneal, dúplex carotideo), electroencefalograma, ecocardiografía (transesofágica o transtoracica), valoración de síndromes protromboticos y exámenes post-mortem.

## ☞ **Sintomatología**

Los pacientes pueden presentar severos trastornos orgánicos, neurológicos, locomotores y cognitivos (Tabla 2); la gravedad de las consecuencias se correlaciona con la intensidad y el tiempo de isquemia (Arango, 2004).

**Alteraciones locomotoras.** Los movimientos alterados (asociados o en espejo del hemicuerpo sin afección) provocan una clara discapacidad en las actividades diarias del paciente (Díaz, 2005); las hipótesis aceptadas establecen que dichas disfunciones se observan con mayor frecuencia en el brazo, antebrazo, mano y dedos ipsilaterales al hemisferio lesionado y se pueden producir por los siguientes factores:

- 1) El grado de lesión en los tractos cortico-espinales que no se decusa en las pirámides bulbares (North, 1993; Seitz, 1998; Ward, 2004 Díaz, 2005).
- 2) La neuroplastía cerebral después de la lesión, que facilita la reorganización funcional (Díaz, 2005; Aguilar, 2003; Galea, 2003; Colino, 2002;).

**Afección orgánica.** Se ha demostrado en estudios clínicos y modelos animales que la **IC** favorece a la inmunodepresión en la fase sub-aguda de la lesión; éste factor predispone a procesos infecciosos (principalmente por *Escherichia coli*), sepsis y falla múltiple orgánica (Chamorro, 2006; Vargas 2006; Ivan, 2004; Meisel, 2004; Prass, 2003).

**Trastornos neurológicos.** En la fase aguda y sub-aguda de la lesión, el paciente puede presentar neuropatías como: afasia (Engelter, 2006), parálisis facial, ptosis (Adams, 2007; Bahr, 2004), dificultad para articular palabras, dolor neuropático, etc; en este contexto, el estudio realizado por **Barragán y cols** (2007) demostró que los adultos mayores que habían sufrido un **ACV** presentaban molestias por dolor neuropático crónico, que influía significativamente en el desarrollo de sus actividades cotidianas.

**Déficit cognitivo.** Los pacientes presentan frecuentemente demencia y depresión en la fase de recuperación (Ivan, 2004; Hackett 2005); resultados de un estudio sobre deterioro cognitivo en adultos mayores de México, demuestran un alto grado de comorbilidad y dependencia funcional en aquellos que han sufrido un **ACV** (Mejia, 2007)

**Tabla 2. Sintomatología de acuerdo a la región vascular infartada**

Adaptada de Bañer, 2004

<b>Anterior</b>		
<b>ACM</b>	(60%)	Hemiparesis del brazo, disfagia, hemianopia
<b>ACA</b>	(4%)	Hemiparesis de la pierna, incontinencia urinaria, apraxia
<b>AC</b>	(8%)	Hemiparesis, hemianopia
<b>Posterior</b>		
<b>AV</b>	(10%)	Vértigo, diplopía, hipoestesia y paresis bilateral, amaurosis, migraña
<b>Cerebelo</b>	(7%)	Migraña, ataxia, vértigo, parálisis facial
<b>ACP</b>	(9%)	Hemianopia, dislexia, agnosia visual

## Fisiopatología de la Isquemia Cerebral Focal

---

El metabolismo energético del **SNC** difiere notablemente del resto de los tejidos (Ramírez, 1998) debido a que las neuronas no funcionan de manera autónoma, sino dentro de complejos neuronales que se integran con otras partes del Sistema Nervioso. Después de la **IC**, se generan reacciones moleculares (a corto y largo plazo) denominadas "**cascada isquémica**"; inicia con la falla energética relacionada con la interrupción de los procesos de fosforilación oxidativa y el déficit en la producción de **Adenosin Trifosfato** (ATP) y concluye en dos modalidades de muerte: la primera, relacionada directamente con el déficit energético (necrosis) y la segunda, por ausencia de un suministro energético adecuado (muerte celular programada o apoptosis) (Arango, 2004; Durukan, 2007). Se han confirmado los siguientes factores que favorecen la muerte neuronal durante la **IC** (Ramírez, 1998; Durukan, 2007; Alexandrova, 2005):

1. Falla del metabolismo energético.
2. Aumento del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular.
3. Producción y liberación de **Radicales Libres** (RL).
4. Ruptura de la **Barrera hematoencefálica** (BBB).
5. Edema Cerebral.
6. Inflamación.
7. Apoptosis.

## ∞ **Excitotoxicidad**

Durante la **IC** los depósitos de  $O_2$  y glucosa se consumen rápidamente alterando la respiración mitocondrial y el metabolismo de la glucosa residual; se utiliza el **ATP** de reserva pero al no producirse, se acumula **Adenosin Monofosfato** (AMP) que no cuenta con enlaces de alta energía; el ácido láctico se incrementa aproximadamente en tres minutos y alcanza un nivel máximo horas después de haber iniciado la isquemia provocando: acidosis, desnaturalización protéica, alteración del funcionamiento enzimático (cuyas actividades son pH-dependientes), recaptura de neurotransmisores y formación de **RL**. La acidosis severa agrava la lesión a través de diferentes vías: edema intracelular, inhibición de la fosforilación oxidativa y daño a las células endoteliales (Durukan, 2007). La activación de los receptores de glutamato **N-metil-D-aspartato** (NMDA) y **ácido  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico** (AMPA) incrementan los niveles intracelulares de  $Ca^{2+}$  (Durukan, 2007) liberando masivamente neurotransmisores y neuromoduladores que activan diferentes receptores; así mismo, las aminas biogenas como la noradrenalina y serotonina causan vasoconstricción facilitando la micro-oclusión y el "no reflujo" (Butcher, 1990).

## ∞ Aumento del $\text{Ca}^{2+}$ intracelular

La concentración homeostática intra y extracelular del  $\text{Ca}^{2+}$  es de aproximadamente 0.1 y 1000  $\mu\text{mol/L}$  respectivamente. El 99% del  $\text{Ca}^{2+}$  celular se encuentra en proteínas, fosfolípidos, o secuestrado en el retículo endoplasmático (Kristian, 1998); durante la **IC**, el tejido neural es incapaz de mantener la polarización de la membrana, por esta razón condiciona la apertura de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes de voltaje y el desbloqueo de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes de los receptores (Castillo, 2000); la falta de **ATP** altera el funcionamiento de la bomba  $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{ATP}$ -asa, incrementándose de manera progresiva la conductancia y salida masiva del  $\text{K}^+$ , cuando los niveles extracelulares alcanzan los 15 mmol/gr, despolariza a los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes de voltaje y el 95% del  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular penetra en el interior de la neurona; como consecuencia, el  $\text{Ca}^{2+}$  libre intracelular provoca una cascada metabólica que activa enzimas proteolíticas y lipolíticas que pueden abolir de forma irreversible la regulación del metabolismo neuronal; por otro lado, la activación enzimática induce degradación protéica, despolimerización de microtúbulos, liberación de neurotransmisores y  $\text{Ca}^{2+}$  en los depósitos intracelulares, daño de membrana y de los propios canales de  $\text{Ca}^{2+}$ , provocando un círculo vicioso que exacerbara el daño y contribuirá a la muerte neuronal (DeGraba, 1993; Kristian, 1998; Durukan, 2007).

## ∞ Radicales Libres (RL)

El desacoplamiento entre los saltos energéticos y la formación de **ATP** dentro de la cadena respiratoria mitocondrial facilita la hiperproducción de **RL** provocando disminución de los mecanismos antioxidantes, ruptura del **Ácido desoxirribonucleico** (ADN), desnaturalización de proteínas, edema, lesión endotelial, aumento de la permeabilidad vascular, peroxidación de los lípidos de membrana y alteraciones en la función mitocondrial (Dyker, 1998; Kontos, 2001; Chen, 2001; Durukan, 2007); así mismo, la interacción de los **RL** con componentes tisulares produce otras variedades de especies reactivas; por ejemplo el radical hidróxilo se genera por el peróxido de hidrogeno en la presencia del ion Hierro y otros metales en la reacción de Haber-Weiss (Kontos, 2001), el superóxido con óxido nítrico genera ácido peroxinitroso y su descomposición produce un radical hidróxilo.

## ∞ Ruptura de la Barrera Hematoencefálica

El control del flujo iónico, aminoácidos, células inmunológicas y péptidos entre la periferia y el **SNC** se mantiene por la **BBB** (Brown, 2002); ésta barrera que protege al cerebro, condiciona también la utilización de substratos para su metabolismo energético (Ramírez, 1998; Secher, 2005; Durukan, 2007). Se integra por células endoteliales y microvasculatura cerebral; el daño mecánico, la hipoxia del endotelio, la destrucción de la lámina basal por metaloproteinasas, el edema vasogénico, la liberación de sustancias tóxicas, las complicaciones hemorrágicas, la presencia de

moléculas inflamatorias, los niveles inadecuados de  $\text{Ca}^{2+}$ , la hiperglicemia y la liberación masiva de **RL** son causas potenciales del daño después del **ACV** (Kamada, 2007; Brown, 2002; Asano, 1985).

### ∞ **Edema cerebral**

Se caracteriza por el incremento absoluto de líquido provocado por la reducción abrupta de los componentes de  $\text{P}^+$ ; a éstos cambios energéticos se añade la disminución intracelular de  $\text{K}^+$  y el incremento de  $\text{H}_2\text{O}$  y  $\text{Na}^+$ , que además de perpetuar las alteraciones reológicas exacerba las del infarto. En modelos de **IC** se ha demostrado que los efectos biológicos de las prostaglandinas y la cascada del ácido araquidónico, están involucrados en la génesis del edema cerebral, ya que al activarse la fosfolipasa  $\text{A}_2$ , se libera ácido araquidónico, tromboxanos ( $\text{Tx}'\text{s}$ ) y leucotrienos, provocando vasoconstricción que favorece a la agregación plaquetaria (copartícipes del fenómeno de "no reflujo")(Asano, 1985).

### ∞ **Respuesta inflamatoria**

Durante la **IC** se llevan a cabo cambios a nivel genético, celular, molecular y orgánico (Offner, 2006), prevaleciendo un fenotipo inflamatorio en la microvasculatura, que induce disfunción en la **BBB**, sobreproducción de **RL** y acumulo de leucocitos y plaquetas. Las células endoteliales, perivasculares, neuronas, astrocitos y microglía, son activadas localmente para iniciar la respuesta humoral (Hallenbeck, 2006)

mediante la liberación de dos importantes citocinas pro-inflamatorias, la Interleucina1 beta (IL1 $\beta$ ) y el Factor de Necrosis Tumoral-alfa (TNF- $\alpha$ ) (Vila, 1999); se ha confirmado que los pacientes con **ACV** isquémicos presentan a nivel sistémico un incremento significativo de IL-1 $\beta$ , IL-8 y IL-17 (Kostulas, 1999) que podría inducir de forma directa muerte celular o contribuir al daño de la pared vascular, trombosis, adhesión leucocitaria, hemorragia, edema y necrosis tisular (Hallenbeck, 2002-2006); así mismo, la presencia de ciertos metabolitos inflamatorios (prostaglandinas, **RL**, COX-1, etc.) moléculas de adhesión (Frijns, 2002) y proteínas (integrinas, selectinas, quimiocinas y G-heterotrimerica) son factores determinantes para favorecer la migración transendotelial de leucocitos hacia el cerebro (Kochanek, 1992; Okada, 1994; Clark, 1995; Frijns, 2002; Adamson, 2002; Alexandrova, 2005; Wang, 2007) desde las primeras 3 h de haber iniciado la isquemia, incrementándose en las siguientes 6 h y alcanzando un pico máximo a las 12-24 h (Akopov, 1996); el microambiente inflamatorio se ve aún más reforzado por el decremento (durante las primeras 6 h post-isquemia) de **IL-10** (importante citocina anti-inflamatoria) (Zhai, 1997). El primer sub-tipo leucocitario que se infiltra en la región del infarto son los neutrófilos, seguido de los **LT** y monocitos; el incremento de **LT** se lleva a cabo de las 24 a 96 h teniendo un pico máximo a los 3-7 días, disminuyendo en forma importante 14 días post-ictus (Schroeter, 1994; Stevens, 2002); estas células exacerbaban el daño al tejido neural a través de la obstrucción en la microvasculatura, producción de **RL**, liberación de enzimas citotóxicas, reactividad vasomotora, incremento en la permeabilidad vascular, liberación de citocinas pro-inflamatorias, factores quimiotácticos o incluso quimiocinas como **SDF-1**, **MIP-1 $\beta$**  o RANTES (Price, 2004; Stumm, 2002; DeGraba, 1998; Schwab,

2001; Bona, 1999; Grau, 1992). **Yilmaz y cols** (2006) en un modelo de **ICF** con reperusión en ratones linfopénicos, asociaron la exacerbación del proceso inflamatorio, trombogénico y déficit neurológico con la presencia de **IFN- $\gamma$**  y **LT CD<sup>4+</sup>, CD<sup>8+</sup>**.

Por otro lado, las células de la microglía despliegan un fenotipo neurotóxico 72 h después del **ACV** (Campanella, 2002) prevaleciendo hasta por 48 h (Pan, 2007; Wang, 2007; Schultzberg, 2007) la producción y liberación de glutamato, **IL-1 $\beta$** , **IL-6**, **TNF- $\alpha$** , **ON**, **RL**, ácido quinolinico y araquidónico (con sus respectivos metabolitos), etc. afectando al endotelio vascular y tejido neural de la región central y periférica del infarto (Yenari, 2006; Hallenbeck, 2006); incluso el efecto neurotóxico puede manifestarse en el hemisferio ipsilesional y perdurar hasta 30 días (Price, 2006).

La evaluación de terapias que neutralizan de alguna forma la liberación de citocinas (Matsumoto, 1997; DeGraba, 1998; Wang, 2002; Tracey, 2007), moléculas de adhesión (Clark, 1991, Chen, 1994, Zhang, 1994, Soriano, 1996), enzimas (Ladecola, 2001; Strauss, 2007) o que impiden de alguna manera la migración (Dutka, 1989; Schurer, 1990) y activación de las células inflamatorias en el sitio de lesión (Becker, 1997, Becker, 2003) han logrado reducir la lesión cerebral en modelos experimentales (Pantoni, 1998).

## ∞ **Histopatología**

Las lesiones histopatológicas sólo pueden observarse días o semanas después de la lesión; en los modelos de **ICF** se localizan regiones infartadas a nivel de la corteza y putamen caudado, zonas de necrosis sub-cortical y áreas de isquemia parcheadas en

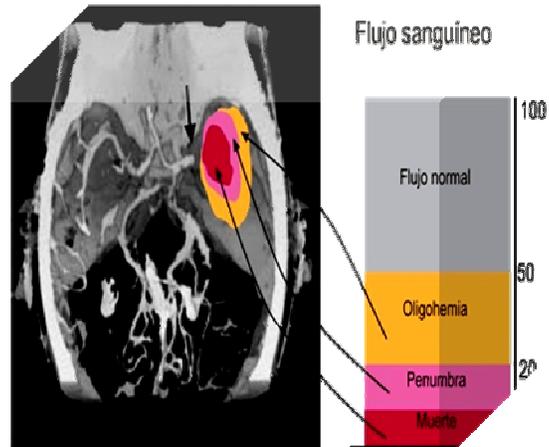
la corteza del hemisferio contralateral a la lesión (Roda, 1998); produciendo alteraciones sensitivo-motoras y hemiplejia (Wahl, 1992) a diferencia de las que se observan en modelos de Isquemia global, donde la hipoxia generalizada afecta regiones vulnerables como el hipocampo (Gupta, 2002).

### ☞ **Penumbra isquémica**

La viabilidad celular está íntimamente relacionada con su indemnidad homeostática; las bombas iónicas, el transporte activo y la producción de moléculas funcionales y constitucionales, son dependientes de energía; cualquier alteración en la cadena respiratoria provoca pérdida de la homeostasis y de no recuperarse la muerte celular. Durante las primeras 2-3 h de la isquemia, se identifica en la región infartada: edema, vacuolas y dendritas; 12 h después, se observan "neuronas rojas" (también conocidas como eosinofílicas), "células fantasmas" (células astrocíticas) y daño axonal; éstas características indican un daño histológico irreversible (Back, 2004); éste tipo de muerte se caracteriza por panecrosis y afecta a las neuronas, células de la glía y a la pared vascular. Los mecanismos deletéreos durante y después de la **IC** impiden la actividad metabólica y funcional incluso en el hemisferio ipsilateral a la lesión (temporalmente) (Dancause, 2006). La evolución temporal hacia el infarto isquémico generalmente es de minutos a horas, y el daño focal casi siempre se asocia con edema cerebral (Sánchez, 1999); sin embargo, la restitución del flujo sanguíneo (**hiperemia post-isquémica**) en la región periférica del infarto (**área de penumbra isquémica**) podría favorecer la recuperación de la función perdida (González, 2006; Arango, 2004;

Sánchez ,1999) o inducir la formación de **RL** y peroxidación lipídica, provocando alteraciones en la expresión y regulación de nuevos genes como el factor nuclear  $\kappa B$ , mitógeno activado de la proteína kinasa y activador de la proteína-1 (Durukan, 2007; Wang, 2007). El avance tecnológico en imagenología como la **PET** y **RM** han permitido la creación de mapas anatómicos digitales y así mismo la identificación regional de la lesión (Figura 2) (Phan, 2005; Heiss, 2003). Habitualmente, se plantea un período de 4-8 h en el que las células "**en riesgo**" pueden permanecer viables mediante la reperusión o la administración de fármacos que eviten la extensión del área de penumbra dentro del infarto (Sánchez, 1999; Alexandrova, 2005); de no ser así, la cascada isquémica se torna imparable y es incluso perpetuada por la reperusión/incompleta (falta de reflujo) (Arango, 2004). Ello explica los fenómenos "**maduración del infarto**" y "**daño cerebral tardío**" que pueden ser minimizados con citoprotectores en un tiempo de 8-12 h (ventana para la citoprotección).

El término "**autorregulación**" se refiere a los mecanismos miógenos, neurogénicos y metabólicos de los que dispone la circulación cerebral para mantener constante el **FSC** a pesar de las variaciones de la presión arterial sistémica (PAS); estos mecanismos actúan en un rango de 60 a 160 mm/Hg, en caso de daño cerebral, como sucede en los **ACV's**, se activan reflejos centrales que provocan el aumento de la **PAS** en un intento por mejorar la perfusión de la zona lesionada; en este estado, las variaciones a la baja de la **PAS** (sobre todo si son bruscas), tiene el riesgo de aumentar el área de infarto.



**Figura 2.** La obstrucción de la ACM (flecha corta) origina un gradiente de presiones. En la zona central, con FSC <10 mL/100-g/min, se produce una rápida muerte celular. Rodeando a este núcleo intensamente isquémico existe una zona de "penumbra" FSC <22 mL/100-g/min. Más periféricamente en la zona de oligohemia, con FSC >22 mL/100g/min el riesgo de convertirse en infarto solo sucede en circunstancias adversas. Adaptado de Castillo J y cols. (2003)

No hay aspecto del metabolismo neuronal que esté libre del efecto de la isquemia, si bien los factores neuroquímicos determinantes del daño neuronal no se conocen totalmente; el fallo en la producción energética, la acidosis láctica, el aumento de  $Ca^{2+}$  citosólico, el exceso de RL y el acumulo extracelular de neurotransmisores, con la consecuente activación de receptores y estimulación neuronal en circunstancias que provocan deficiencias en el aporte de  $O_2$  y glucosa, parecen ser pasos importantes en los procesos que conducen a la muerte neuronal (Tabla 3) (Schultzberg, 2007).

Tabla 3. Características de la penumbra isquémica

- Desacoplamiento entre el metabolismo y el **FSC** (debido a su incapacidad autorreguladora).
  - La región de la penumbra isquémica temprana supone el 50% o más de la lesión isquémica final.
  - Pese a la reducción del **FSC**, el consumo de glucosa se mantiene e incluso se incrementa ligeramente (fundamentalmente por vía anaerobia) para tratar de mantener los niveles energéticos de la célula.
  - La penumbra presenta despolarizaciones isquémicas recurrentes, con elevaciones transitorias de la concentración de  $K^+$  extracelular que son deletéreas para el tejido debido al desacoplamiento entre la perfusión y el metabolismo.
  - La vida media de la penumbra (y por lo tanto la ventana terapéutica) es corta, evolucionando rápidamente hacia la lesión isquémica irreversible (**Castillo, 2003**).
-

# Participación del Sistema Inmunológico en la lesión y restauración del Sistema Nervioso Central

---

En éste capítulo describiremos algunos procesos inmunológicos que tienen relación con las lesiones del **SNC** y la terapia de inmunomodulación que llevamos a cabo en la presente tesis.

## ∞ Características de la inmunidad

El **SI** protege al organismo de sustancias potencialmente nocivas al reconocer y responder a los así llamados antígenos, los cuales son moléculas (generalmente proteínas) que se encuentran en la superficie de las células, virus, hongos o bacterias. Algunas toxinas, químicos, fármacos y partículas extrañas se pueden considerar antígenos.

**Inmunidad adquirida.** Se desarrolla cuando el organismo está expuesto a un antígeno y despliega una defensa específica para éste. Los Linfocitos B (**LB**) producen anticuerpos que se adhieren a moléculas antigénicas específicas facilitando su destrucción a través de los fagocitos; por otro lado, los **LT** atacan directamente a los antígenos y controlan la respuesta inmunológica; estas células se desarrollan específicamente para un tipo de antígeno y cuando hay exposición a uno nuevo, se forman células T y B diferentes.

A medida que los linfocitos se desarrollan, reconocen los tejidos propios y los distinguen de otros que no se encuentran en él; una vez que se forman las células T y B, algunas se multiplican y brindan "**memoria inmunológica**", permitiéndoles responder rápida y eficientemente cuando se exponen al mismo antígeno en otra ocasión.

**Inmunidad innata.** La defensa innata ante las infecciones tiene como principio el reconocimiento de lo ajeno o extraño, pero de forma inespecífica; es decir, actúa de la misma forma ante cualquier agente agresor y no cambia la intensidad de su respuesta aunque la agresión se repita en más de una ocasión.

**Inmunidad adaptativa.** Las células que la conforman incluyen **LT** (colaboradores **CD<sup>4+</sup>**, citotóxicos **CD<sup>8+</sup>**), células asesinas y **LB**. Después de la activación antigénica, los **LT CD<sup>4+</sup>** pueden diferenciarse en 3 subtipos; Th1 (involucra la inmunidad celular y secreta citocinas inflamatorias como Interferon- $\gamma$ , IL-2 y linfoquinas), Th2 (promueve la inmunidad humoral y secreta citocinas antiinflamatorias como IL-4 y IL-10) y **LT reguladores (reg.) CD<sup>4+</sup>, CD<sup>25+</sup>** (secretan factores de crecimiento- $\beta$  [TGF- $\beta$ ] y IL-10) (Mosmann, 1986; Parronchi, 1991; Glimcher, 2000; Rodríguez, 2003; Baird, 2006); se diferencia de la inmunidad innata por:

**1. Especificidad.** Se lleva a cabo porque los linfocitos contienen receptores de membranas capaz de identificar y distinguir sutiles diferencias entre diversos antígenos, la porción reconocida se denomina determinante antigénico o epítipo; se plantea que

todos los individuos tenemos numerosas clonas (conjunto de células derivadas de un precursor simple), cuya progenie cuenta con los receptores de superficie de la célula que les dio origen y pueden responder a determinantes antigénicos específicos para ellas; así, el desarrollo de clonas específicas a determinados antígenos ocurre independientemente de su exposición, el cual selecciona una clona específica pre-existente y la activa hasta provocar su proliferación y diferenciación.

**2. Heterogeneidad o diversidad.** La respuesta inmune adaptativa se desarrolla mediante dos mecanismos fundamentales: respuesta inmune humoral, donde los **LB** juegan un papel preponderante; y respuesta inmune celular, donde los **LT** son las células protagonistas; ambas inician con la activación de los linfocitos en los órganos periféricos, causada por la célula presentadora de antígeno (**CPA**), que alcanza a estos órganos a través de la circulación linfática y desencadena los siguientes mecanismos:

**Reconocimiento.** Consiste en la unión del antígeno extraño a los receptores específicos existentes en la membrana de los linfocitos maduros (Vigouroux, 2004); los **LB** expresan moléculas de anticuerpos sobre su superficie, las cuales se unen a proteínas extrañas, polisacáridos o lípidos en su forma soluble; así mismo, los **LT** expresan los llamados receptores de la célula **T** (TCR), que reconocen pequeñas secuencias de péptidos antigénicos, polisacáridos, esteroides y pequeñas moléculas orgánicas (Tsomides, 1991), pero solamente si éstos se encuentran unidos a moléculas del **MHC** sobre la **CPA** (Unanue, 1989).

**3. Fase de activación.** Son eventos que se producen en los linfocitos como resultado del reconocimiento antigénico específico; estas células experimentan fundamentalmente los siguientes cambios:

a) Proliferación. Se caracteriza por la expansión de las clonas antigénicas específicas y amplificación de la respuesta protectora. El **LT CD<sup>4</sup>** asume una función preponderante en la activación de los **LT CD<sup>8</sup>** y **LB** (Unanue, 1989)

b) Diferenciación. En esta etapa se forman células efectoras y de memoria; las primeras producen sustancias que pueden interactuar con el antígeno (anticuerpos y linfocinas), mientras que las células de memoria son los **LT** parcialmente diferenciados (no llegan a convertirse en células efectoras).

c) Fase efectora. En ésta etapa los **LT** diferenciados a células efectoras migran hacia el sitio de la lesión donde desarrollan su función de eliminación patogénica (Unanue, 1989), a diferencia de los **LB** que las ejecutan en los órganos periféricos; en este periodo participan células no linfoides y mecanismos de inmunidad innata.

**4. Memoria inmunológica** Uno de los aspectos más importantes de la respuesta adaptativa, consiste en la habilidad de los **LT** para responder eficazmente a microorganismos que previamente han infectado al hospedero (memoria inmunológica), este evento comprueba la existencia de una población celular con antigenicidad específica (Jenkins, 1992).

**5. Mecanismos de tolerancia.** Los antígenos potencialmente inmunogénicos están presentes en las células y tejido conectivo de cada individuo; la respuesta ausente frente a los auto-antígenos se denomina "**auto-tolerancia**" y se mantiene a través de mecanismos que evitan de forma activa la maduración o estimulación de los **LT** potencialmente autorreactivos ( $_{react.}$ ) (Goodnow, 1996).

a).- La tolerancia es un proceso adquirido que evita que los **LT**  $_{react}$  adquieran la capacidad de responder frente a los auto-antígenos al momento del encuentro; los **LT** inmaduros pueden expresar receptores capaces de reconocer antígenos extraños y propios.

b).- Los estadios de maduración linfocitaria está limitada a los órganos linfoides: TIMO (LT) y medula ósea (LB). Durante la maduración de los **LT**  $_{react.}$  se presentan diferentes estadios en donde el encuentro con auto-antígenos provoca tolerancia en lugar de activación. Los antígenos que se encuentran en concentraciones incrementadas en los órganos mencionados son auto-antígenos; por lo tanto, los linfocitos inmaduros se encuentran solo con auto-antígenos a concentraciones altas y las clonas de linfocitos cuyos receptores pueden ser específicos para estos antígenos, son eliminados (Jonuleit, 2003). Se pensaba que la tolerancia central era el principal determinante para una adecuada discriminación de lo propio y lo no propio, pero aún no se han elucidado los mecanismos que despliega el **SI** para distinguir entre antígenos extraños y propios que se encuentran exclusivamente en los tejidos periféricos.

c).- Los linfocitos maduros autorreactivos se pueden volver tolerantes en los tejidos periféricos si se encuentran con auto-antígenos bajo condiciones que favorezcan la tolerancia en lugar de la activación (Goodnow, 1996).

d).- Los principales mecanismos de tolerancia en la clona de linfocitos específicos para auto-antígenos son la eliminación o deleción mediante un proceso de muerte celular que se induce por la activación y anergia clonal sin muerte celular; así mismo, la inducción de **LT<sub>reg</sub>** suprime las funciones efectoras y de activación de los **LT<sub>react</sub>** (Marleau, 2005).

e).- Ignorancia clonal. Algunos de los **LT<sub>react</sub>** que se encuentran con auto-antígenos no se activan si se vuelven tolerantes; no se conoce la razón por la que algunos coexisten con los auto-antígenos sin reaccionar de ninguna forma detectable.

f).- La ausencia de respuesta hacia las propias proteínas se puede deber a la tolerancia de los **LT** o **LB** (Marleau, 2005; Goodnow, 1996).

Las siguientes características del auto-antígeno son factores determinantes para inducir tolerancia central o periférica (Lakkis, 2003):

a) La concentración en los órganos linfoides generadores.

b) El reconocimiento sin inflamación o co-estimuladores.

c) La persistencia.

d) La naturaleza e intensidad de las señales que desencadenan en los linfocitos específicos.

**Autorreactividad.** A pesar de que existen mecanismos por el que las células autorreactivas son eliminadas o inactivadas, estos son insuficientes y por ello prácticamente en todos los individuos sanos podemos encontrar dichas células (Roitt, 1996). La autorreactividad puede ser parte de una respuesta inmune normal, se

considera no patogénica y es compatible con la homeostasis; sin embargo, cuando no se controla eficientemente, es excesiva y ocasiona un estado patológico, el resultado es una Enfermedad Autoinmune (**EA**) (Kipnis, 2001; Schwartz, 2004) tal es el caso del Lupus Eritematoso Sistémico, Artritis Reumatoide, Enfermedad de Graves, Miastenia gravis, Esclerosis Múltiple (**EM**) entre otras (Born, 1991; Marleau, 2005).

### ∞ Regulación celular y humoral de la Respuesta Inmunológica

Las citocinas son polipéptidos o glicoproteínas que actúan como mensajeros intercelulares para la regulación de la respuesta del **SI**; las pueden producir macrófagos, monocitos, **LT**, células endoteliales, fibroblastos, plaquetas, neuronas, células de la microglía, entre otras (Pantoni, 1998); por otro lado, las células dendríticas (**CD**) derivan de la médula ósea y órganos linfoides (timo, bazo y linfonodos), tienen una fuerte capacidad para la presentación antigénica a células de memoria, vírgenes y **LT** efectores, pudiendo desencadenar una **EA** o crear tolerancia a la misma; las **CD** que presentan antígenos del **SNC** pueden movilizarse a diferentes órganos linfoides secundarios como los linfonodos cervicales y bazo, interactuando directamente con los **LT** (Hallenbeck, 2006), sus propiedades adyuvantes para estimular específicamente la respuesta de los **LT CD<sup>4</sup>** y **CD<sup>8</sup>** se aprovecha para el desarrollo de estrategias de vacunación preventiva y tratamiento de infecciones, reacciones alérgicas, enfermedades autoinmunes y cáncer (Lipscomb, 2002); así mismo, los macrófagos se caracterizan como células especializadas en reconocer, internalizar y exponer los

determinantes antigénicos de los microorganismos en su superficie, unidas a antígenos del **MHC** (Unanue, 1989).

### ∞ **Autorreactividad protectora**

La elucidación y entendimiento de las respuestas humorales y celulares durante los **ACV** y otras lesiones del **SNC** (medula espinal, **TCC**, nervio óptico, etc.) han revolucionado vertiginosamente (Schwartz, 1999; Moalem, 1999; Cohen, 1999; Hallenbeck, 2006; Offner, 2006; Schultzberg, 2007; Hendrix, 2007); sin embargo, durante décadas se mantuvo vigente el concepto de que el **SNC** era un sitio inmunológicamente privilegiado, basándose en las siguientes propiedades (Reese, 1967; Barker, 1977; Matsumoto, 1986; Wucherpfennig, 1994; Cserr, 1992; Wilbanks, 1992):

1. Características físicas de la **BBB**.
2. Ausencia de un drenaje linfático típico.
3. Expresión reducida de antígenos del **MHC** tipo I y II.
4. Presentación inconvencional antígeno /celular.
5. Concentración reducida de componentes del complemento.
6. Inmunosupresión debido al microambiente del **SNC**.

Nuevas evidencias científicas ponen de manifiesto un replanteamiento conceptual; se ha observado que los **LT CD<sup>4+</sup>** tienen la capacidad para ingresar al líquido cefalorraquídeo a través de las venas del plexo coroideo y ejercer una respuesta inmune local o regresar al órgano linfoide correspondiente; así mismo, la revelación que los leucocitos participan en la restauración del tejido neural, demuestra que la función celular del **SI** no está relacionada exclusivamente con la exacerbación del daño (Pantoni, 1998; Schwartz, 1999; Barouch, 2002); por otro lado cabe mencionar que existen ciertas diferencias en la respuesta de los **LT** después de una lesión aguda al **SNC** o Sistema Nervioso Periférico (SNP); ya que en éste último, el acumulo de células **T** es significativamente mayor en relación al **SNC**, disminuyendo de manera análoga 7 días después del daño (Moalem, 1999).

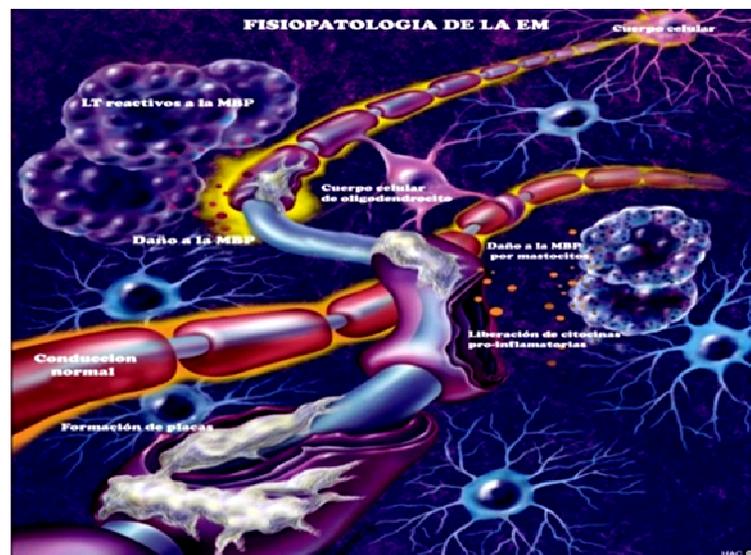
En modelos animales y estudios clínicos de **IC**, involucran la respuesta del **SI** (innata y/o adaptativa) con la activación endotelial (De Vries, 1997; Fukunaga, 2007), daño celular (Grau, 1992; Adamson, 2002; Stolyarov, 2002; Becker, 2003; Price, 2003; Giunti, 2003; Offner, 2006; Wang, 2007), inmunodepresión (Chamorro, 2006; Vargas 2006; Offner, 2006; Ivan, 2004; Meisel, 2004; Prass, 2003), tolerancia isquémica y neurogénesis (Hallenbeck, 2006; Yaniv, 2007). A nivel local la permeabilidad de la **BBB** se irrumpe por más de 72 h favoreciendo a la expresión de células endoteliales y sustancias quimiotácticas perivasculares (De Vries, 1997) que estimulan la diapédesis leucocitaria al parénquima cerebral (Grau, 1992; Adamson, 2002; Becker, 2003; Price, 2003; Giunti, 2003; Offner, 2006; Wang, 2007); ésta eventualidad favorece a la liberación y presentación de antígenos derivados del **SNC** (Strand, 1984; Ohta, 2000;

Jauch, 2006) a **LT<sub>react</sub>** (Yilmaz, 2006; Ziv, 2007; Giunti, 2003; Nadareishvili, 2004; Tarkowski, 1995).

Durante las lesiones agudas del **SNC** se llevan a cabo eventos de autorreactividad similares a los de algunas **EA**; la activación policlonal de **LT<sub>react</sub>** se ha relacionado tradicionalmente con el desarrollo de **EM** (Warnock, 1997; Tsuchida, 1994; Giuliani, 2003); en éste padecimiento, la autorreactividad hacia epitopos como la **MBP** provoca desmielinización y consecuentemente disfunción neuronal; en las lesiones o placas se encuentran proteínas del **MHC** tipo I-II y **LT CD<sup>4+</sup> CD<sup>8+</sup>** (Giuliani, 2003); éstas células migran al **SNC** y desencadenan el proceso patológico en contra del tejido neural (Figura 3) (Wekerle, 1987).

En la mayoría de modelos experimentales para el estudio de **EA**, la etiología central se basa en la activación de los **LT CD<sup>4+</sup>** (Th1) que favorecen la secreción de citocinas pro-inflamatorias como **IL-1 $\beta$** , **TNF- $\beta$** , Interferon  $\gamma$ , **IL-2** y **IL-12** (Anderton, 2001); en ciertas variedades de ratas, la inyección de adyuvante completo de Freund con moléculas antigénicas encefalitogénicas del cerebro o médula espinal como la **MBP**, proteína proteolípida (**PLP**), glicoproteína oligodendrítica de la mielina (MOG por sus siglas en ingles "myelin oligodendrocyte glycoprotein") entre otras, inducen un síndrome conocido como Encefalomiелitis Alérgica Experimental (EAE) (por sus siglas en inglés experimental autoimmune encephalomyelitis). En éste modelo (utilizado para el estudio de la **EM**), la respuesta inmunologica inicia cuando el **TCR** del **LT** reconoce fragmentos peptídicos derivados de proteínas del **MHC** propio; estos se originan por la degradación proteolítica intracelular de proteínas antigénicas que se insertan en las moléculas del **MHC** clase II para unirse a la superficie de las **CPA** y facilitar el

reconocimiento de los **LT CD<sup>4+</sup>**. A causa de la enfermedad, los animales desarrollan paresis de los miembros, pérdida de peso y muerte (Zamvil, 1985); sí a éstos les seccionan parcialmente el nervio óptico o contusiona la médula espinal, y semanas después se transfieren sus **LT** a otros con la misma lesión durante las primeras horas, desarrollan una recuperación más eficiente a la lesión. Es posible que éstas células favorezcan la sobrevivencia neuronal y eviten la destrucción de la mielina (Hendrix, 2007) desarrollando un fenotipo protector Th2 que estimularía la respuesta humoral a través de la expresión de citocinas con actividad anti-inflamatoria como IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 y IL-13. (Moalem, 1999).



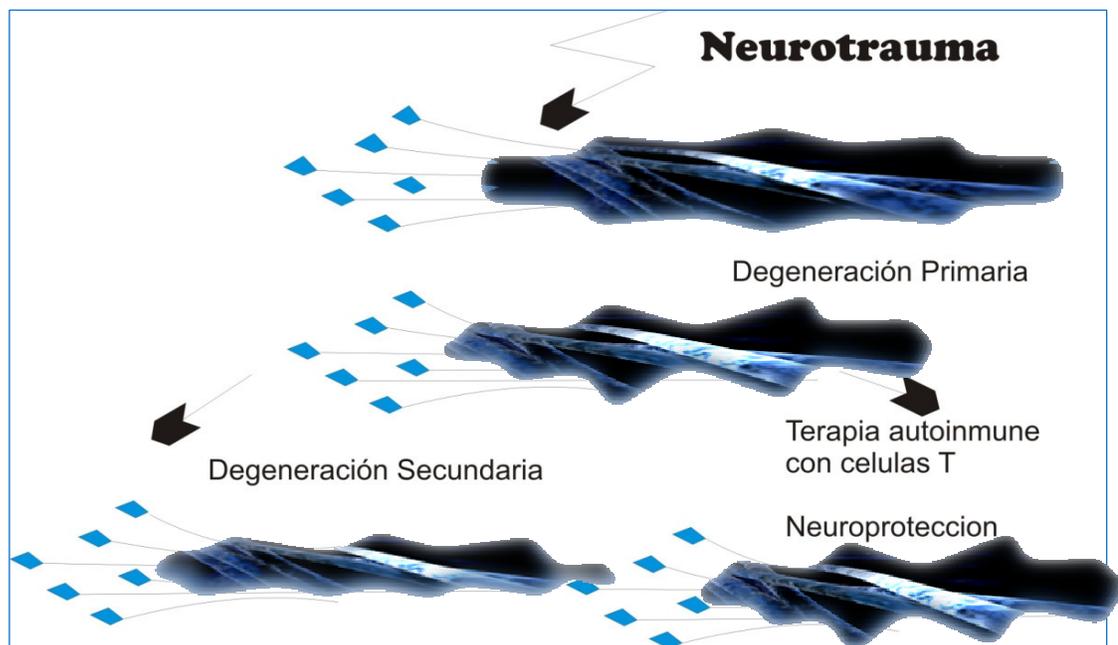
**Figura 3.** El daño que producen los **LT<sub>react</sub>** a diferentes constituyentes de la mielina se caracteriza por la liberación de componentes inflamatorios que a largo plazo favorece la formación de placas alterando la conducción eléctrica de la neurona.

---

Basados en la respuesta fisiológica que despliega el **SI** después de la afección al **SNC** (Yoles, 2001, Schwartz, 2001; Schwartz, 2003) **Michael Schwartz** y su equipo de colaboradores han sustentado el concepto "**Autorreactividad protectora**"; éste mecanismo se lleva a cabo a través de la estimulación de los **LT<sub>react</sub>** con moléculas cripticas como la **MBP** o péptidos derivados de la misma, que han sido modificados en alguno de sus componentes; el efecto neuroprotector se caracteriza por la secreción de citocinas antiinflamatorias, factores neurotróficos (NGF, BDNF y NT-3) (Barouch, 2002), factores de crecimiento y el equilibrio de neurotransmisores potencialmente tóxicos como el glutamato.

De acuerdo a diferentes investigaciones, la capacidad individual para generarla, está inversamente relacionada con la susceptibilidad para desarrollar una **EA** (Schwartz, 2001); así mismo podría determinar el pronóstico y tratamiento después de una lesión al **SNC** (Kipnis, 2001). **Yoles y cols** (2001) en diferentes modelos de neurotrauma observaron que la recuperación al déficit neurológico es menos eficiente en animales timectomizados (desde el nacimiento) comparada con los que no lo están; y que los esplenocitos de ratas con lesión de médula espinal transferidos a otras con el mismo daño, confieren neuroprotección a través de los **LT CD<sup>4+</sup>** y **CD<sup>25+</sup>** (Figura 4); éste experimento demuestra que la "**Autorreactividad protectora**" es un evento fisiológico mediado por los **LT<sub>reg</sub>**. **Kipnis y cols** (2002) en un modelo de lesión al nervio óptico, demostraron que la inducción de una **EA** no es una condición que interfiera en la neuroprotección; el estudio consistió en administrar **MBP** emulsificada con adyuvante incompleto de Freund en ratas susceptibles a la **EAE**, paradójicamente observó que la expresión del fenotipo pro-inflamatorio Th1 era necesario para que en estos animales

se llevara a cabo la "**Autorreactividad protectora**". **Barouch y Schwartz (2002)** después de la lesión al nervio óptico en ratas, administraron **LT<sub>react-MBP</sub>**; encontrando un incremento significativo de macrófagos/microglia en el sitio afectado; comprobando que los **LT<sub>react-MBP</sub>** pueden estimular la activación de macrófagos a través de la interacción con el MHC tipo II y así favorecer la producción de factores neurotróficos (**BDNF**).



**Figura 4.** Representación esquemática de la degeneración axonal por neurotrauma y neuroprotección después de la inmunomodulación de los LT.

Adaptada de Cohen y Schwartz, 1999

En estudios epidemiológicos se ha reportado que los individuos con concentraciones plasmáticas disminuidas de **IL-10** tienen mayor predisposición a sufrir un **ACV** de tipo subcortical o lacunar (Vila, 2003 a, b; Exel, 2002). **Frenkel y cols** (2004) en un modelo de **ICF** descubrieron que la administración nasal de **MOG** péptido 35-55 induce una desviación en la respuesta hacia la mielina de los **LT** de Th1 a Th2, que contribuye significativamente a la disminución de la lesión y a la mejoría de las alteraciones neurológicas; además encontraron un incremento significativo de **IL-10** y disminución de Interferon- $\gamma$  en la periferia del infarto. Éste estudio fue el primero en demostrar que los **LT CD<sup>4+</sup>** expresan un fenotipo regulatorio (IL-10) con efectos benéficos para la **IC** (Frenkel, 2004); así mismo, **Becker y cols** (1997, 2003) demostraron en un modelo de **IC** que la tolerarización con **MBP** brinda efectos neuroprotectores al disminuir el tamaño del infarto; éste hallazgo fue corroborado cuando los esplenocitos de estos animales fueron transferidos a otros inmunológicamente vírgenes con la misma lesión; las pruebas inmunocitoquímicas revelaron un incremento significativo de las citocinas TGF- $\beta$ 1 y LT  $\gamma$ - $\delta$  en la periferia del infarto.

En modelos de **IC**, se ha correlacionado el proceso inflamatorio y las lesiones histológicas con el incremento de **CD** (Kostulas, 2002); no obstante, la inmunomodulación de la respuesta inflamatoria con copolímeros ha demostrado efectos neuroprotectores. **Hauben y cols** (2003) en un modelo de contusión espinal administraron sistémicamente o en el sitio de la lesión **CD** derivadas de la médula ósea con **MBP**; las **CD** fueron estimuladas a través de un péptido modificado de la **MBP** (aminoácido 87-99) conocido como **A-91**, el efecto benéfico del tratamiento fue evidente al observarse en las ratas una mejoría significativa en la función locomotora y

la mayor preservación del tejido neural comparada con la que presento el grupo control; cabe resaltar la respuesta inmunológica que generan los **LPA** análogos (Anderton,2001) como **A-91** al favorecer la inducción del fenotipo Th2 y permitir la interacción antigénica con el **TCR** sin el riesgo de generar una enfermedad autoinmune (Schwartz, 2001; Hauben, 2003).

## Modelos animales para el estudio de la Isquemia Cerebral

---

En las últimas décadas se han llevado a cabo numerosos estudios con el fin de elucidar los mecanismos fisiopatológicos de los **ACV's** y así mismo evaluar estrategias terapéuticas que minimicen sus repercusiones. Un elemento crucial ha sido la utilización de modelos animales estandarizados (Ginsberg, 1989); sin embargo, las diferencias anatómicas (Liebeskind, 2003) y metabólicas con los humanos, predispone a que la similitud con los **ACV's** (representan < del 25%) (Small, 2000) influya en la validez de los resultados cuando se extrapolan a estudios clínicos (Brozici, 2003). Los animales que frecuentemente se utilizan son roedores y primates (Ginsberg, 1989; Brozici, 2003; Durukan, 2007); no obstante los modelos murinos justifican más ventajas por su costo económico (Ginsberg, 1989), aceptación ética, facilidad de manejo y monitoreo fisiológico, elevado grado de homología genética (Jacob 2002), similitudes anatómicas (polígono de Willis), fisiológicas y de reactividad vascular etc.

Los métodos para llevar a cabo la **IC** de forma transitoria o permanente (Roda, 1998) es por medio de trombosis química (Toshima, 2000), embolismo (coágulos o macroesferas) (Gerriets, 2003), ligadura vascular y oclusión intraluminal (Zea Longa, 1989; Roda, 1998); se ha observado que se requiere de 90-120 min de isquemia para que las lesiones histológicas y neurológicas sean reproducibles (Ginsberg, 2003; Durukan, 2007); así mismo, es fundamental establecer en el diseño metodológico el monitoreo de las variables fisiológicas (temperatura cerebral y corporal, niveles plasmáticos de glucosa, presión arterial, saturación de O<sub>2</sub> y gasometría sanguínea) (Ginsberg ,1989), ya que de no controlarse pueden influir significativamente en la

mortalidad experimental o afectar la consistencia del daño isquémico; éstas adversidades se pueden prevenir a través de la utilización de ventiladores mecánicos y el procedimiento quirúrgico llevarlo a cabo con anestésicos halogenados (el suministro deberá realizarse con vaporizadores calibrados para el modelo animal). Aunque no existen reportes sobre la evaluación y el manejo del dolor neuropático en los modelos de **IC**, es razonable implementar estrategias que contribuyan a minimizar las molestias del animal.

### ∞ **Oclusión de la ACM**

El modelo que se utiliza con más frecuencia para el estudio de la **ICF** es el que desarrollo **Zea Longa** y cols (1989) por las ventajas que representa:

- 1) Es menos invasivo (ya que no requiere craneotomía).
- 2) Se puede ocluir selectivamente la **ACM** en conjunto con las ramas de la **ACI** y la **ACC**.
- 3) Permite reproducir el territorio infartado de la **ACM** (corteza frontoparietal y putamen caudo lateral).
- 4) De acuerdo a las propiedades del fármaco evaluado, se puede realizar la **IC** de manera temporal o permanente.

**Trombosis.** En estos modelos se simula la naturaleza de los infartos lacunares, en donde las arterias perforantes son ocluidas selectivamente por microtrombos; la isquemia se puede realizar a través de la inyección de laurato de sodio en la **ACI**, teniendo las siguientes ventajas:

- a) Daño endotelial y de manera subsecuente oclusión trombotica inducida selectivamente en las arterias perforantes.
- b) La trombosis contiene fibrina.
- c) La oclusión microtrombótica está asociada con los pequeños infartos cerebrales y con los déficits neurológicos que se observan en los ictus lacunares.
- d) El tamaño de los infartos es constante y el déficit neurológico se observa en la mayoría de las ratas (Toshima, 2000)

**Embolismo.** Se lleva a cabo por la inyección de trombos autólogos en arterias extracraneales (Durukan, 2007).

**Fototrombosis.** Provoca infarto cortical por la administración sistémica de agentes fotoactivos (Rosa de Bengala).

**Endotelina-1.** Actúa como un potente vasoconstrictor y se puede administrar directa o adyacentemente a la **ACM**.; la aplicación estereotáxica disminuye significativamente el **FSC** de la **ACM** (70-93%).

**Modelos que requieren craneotomía.** El modelo se ha realizado en varias especies incluyendo: primates, cerdos, gatos, perros conejos y roedores (Durukan, 2007); para llevar a cabo la oclusión de la **ACM**, se requieren métodos invasivos (craneotomía) que afectan la presión intracraneal y la función de la **BBB** (Tamura, 1981).

## Estrategias terapéuticas en Accidentes Cerebrovasculares Isquémicos

---

Los **ACV's** son condiciones que requieren valoración y diagnóstico de urgencia (Bath, 2000); el adelanto tecnológico en neuroimagenología (**TC**, **RM** y **PET**) ha permitido la visualización anatómica y fisiológica relevante (González, 2006) para la instauración de las siguientes estrategias recomendadas por el panel de expertos de la Asociación de Cardiología y **ACV's** en el 2007 (del inglés American Heart Association Stroke (Adams, 2007):

1. Historia clínica (datos de relevancia con los familiares, enfermedades diagnosticadas, tiempo en el que inicio la signología, medicación, etc.).
2. Acceso intravenoso (terapia agresiva de líquidos).
3. Manejo ABC (administración de cristaloides isotónicos).
4. Monitoreo cardíaco y tratamiento
5. Monitoreo ventilatorio (saturación de O<sub>2</sub>).
6. Monitoreo glicémico (historia clínica de Diabetes Mellitus o utilización de insulina)
7. Protección de las vías aéreas en pacientes comatosos (intubación endotraqueal).
8. Evaluación neurológica (si el estado físico y mental del paciente lo permite).
9. Pruebas de gabinete.
10. Estudios convencionales de imagenología y neuroimagenología.
11. Mejorar o restaurar el flujo sanguíneo regional y preservar la mayor cantidad de tejido bajo penumbra isquémica

12. Evitar la muerte neuronal por isquemia, pero también el daño inducido por la reperfusión a través de fármacos neuroprotectores (Durukan, 2007).

## ∞ Trombolisis

El factor activador del plasminógeno tisular recombinante (**rt-PA**) fue aprobado desde 1996 por la **FDA** (por sus siglas en inglés US Food and Drug Administration) para el tratamiento de los **ACV** isquémicos; actúa sobre el plasminógeno unido a la fibrina en el sitio donde se origina el trombo, sin generar un estado fibrinolítico sistémico. Entre sus complicaciones y desventajas están la transformación hemorrágica, el daño por reperfusión y su ventana terapéutica corta (probablemente menor de 3 horas) (Parathath, 2006); antes de recomendar su uso, es necesario nuevos ensayos clínicos que precisen el tipo de pacientes que se beneficiarán con mayor seguridad y eficacia (Tabla 4); otros trombolíticos incluyen: reteplasa, urokinasa, estafilokinas y anistreplasa; sin embargo, no han sido evaluados extensivamente (Adams, 2007).

---

Tabla 4. Criterios para el tratamiento con rt-PA.

(Adaptada de Adams, 2007).

- Diagnóstico de ACV isquémico con déficit neurológico moderado (administrar con precaución en pacientes con signología neurológica severa).
- El paciente no debe presentar síntomas que sugieran hemorragia subaracnoidea.
- La sintomatología debió haber iniciado 3 h antes del tratamiento.
- No haber sufrido Traumatismo Craneoencefálico o infarto al miocardio 3 meses antes del ACV.
- No haber presentado hemorragia gastrointestinal o del tracto urinario 21 días antes del ACV.
- No haber tenido procedimientos quirúrgicos (14 días previos) o punción arterial (7 días previos) al ACV.
- No tener historia previa de hemorragia intracraneal.
- No presentar hipertensión arterial (sistólica <185 mm/Hg y diastólica <110 mm/Hg).
- Sin evidencia de traumatismo agudo (hemorragia interna o fracturas).
- No haber consumido anticoagulantes orales.
- No haber recibido heparina 48 h antes del ACV.
- Resultados del conteo plaquetario  $\geq 100000 \text{ mm}^3$ .
- Concentración de glucosa sanguínea  $\geq 50 \text{ mg/dL}$  (2.7 mmol/L).
- No haber sufrido convulsiones.
- La TC no debe presentar infarto multilobar (hipodensidad del hemisferio  $>1/3$ ).
- El paciente o los familiares deben entender los riesgos y beneficios potenciales.

## ∞ Antitrombóticos

Después de >50 años, aún no se establece una indicación concreta de la anticoagulación en el tratamiento específico de los **ACV** agudos (Adams, 2007); se sabe que previene la trombosis venosa profunda y el embolismo pulmonar, pero los datos con respecto a la evolución del infarto, transformación hemorrágica y recuperación son confusos. En teoría la heparina no fraccionada administrada con antitrombina III acelera la neutralización de la trombina e inactiva los factores de coagulación; la warfarina y los antagonistas de la vitamina K previenen la activación de los factores de coagulación II, VII, IX y X. (O'Rourke, 2004). El uso de heparina intravenosa en fase aguda se ha recomendado sobre bases empíricas en los casos de infarto progresivo y trombosis basilar; la heparina impediría la propagación del trombo y evitaría una nueva formación; por otro lado, los antiagregantes son usados en la fase aguda como prevención secundaria del infarto cerebral y para disminuir las complicaciones trombóticas sistémicas; sin embargo, hasta ahora no se ha reportado evidencia que avale su eficacia sobre la evolución del infarto (Adams, 2007).

De acuerdo a los datos del estudio **IST** (por sus siglas en inglés International Stroke Trial), las recurrencias del **ACV** disminuirían en las primeras dos semanas con el uso de aspirina y heparina subcutánea; la evolución a los 6 meses mostró mayor supervivencia en el grupo tratado con aspirina, se recomienda la administración precoz (48 h después de haber sufrido el **ACV**) de 300-325 mg/día de aspirina en los pacientes no anticoagulados por su beneficio en la prevención secundaria; cabe resaltar que no

se debe considerar como un sustituto de otras intervenciones agudas en el tratamiento de los **ACV** (incluyendo la administración IV de rt-PA).

### ∞ **Medidas hemorreológicas**

Se sabe que los pacientes con **ACV's** presentan alteraciones en la viscosidad sanguínea (incluyendo la actividad leucocitaria, en los niveles de fibrinógeno, en la estructura de los glóbulos rojos, etc.); el objetivo de las medidas hemorreológicas es mejorar el flujo regional (especialmente a nivel de la microcirculación) disminuyendo la viscosidad de la sangre; sin embargo, en diversos ensayos clínicos no se ha demostrado un efecto benéfico de la hemodilución normovolémica, ya que en estos pacientes, los mecanismos autoregulatorios se encuentran alterados y la hemodilución podría incrementar el **FSC** en los dos hemisferios. La hidratación adecuada es más eficaz para el tratamiento de las secuelas neurológicas que la instauración de otras técnicas de hemodilución más complejas y peligrosas; en pacientes con hematocrito elevado (>50%) se aconseja realizar flebotomía y la reposición llevarla a cabo con expansores plasmáticos (Adams, 2007).

### ∞ **Vasodilatadores**

Los derivados de las metilxantinas son conocidos por sus efectos vasodilatadores e inhibidores de la agregación plaquetaria, **RL** y **Tx's A<sub>2</sub>**; con base a éstas características la pentoxifilina, propentofilina y pentifilina han sido evaluados como

adyuvantes en el tratamiento de los **ACV's** agudos; en un estudio se administro pentoxifilina/aspirina **versus** aspirina encontrándose una disminución significativa en los fallecimientos a corto plazo, teóricamente el efecto antiplaquetario de la aspirina puede potencializar el de la pentoxifilina; sin embargo, el panel de expertos del American Heart Association Stroke no recomienda la administración de pentoxifilina de primera instancia (Adams, 2007).

### ∞ **Citoprotección**

Más de 700 fármacos neuroprotectores han mostrado efectividad en modelos de **ICF**; sin embargo, al ser evaluados en estudios clínicos fase III los resultados no han sido alentadores (Durukan, 2007); de manera ideal, un fármaco deberá mantener concentraciones adecuadas en el tejido cerebral sin causar efectos tóxicos en el organismo (Dyker, 1998); para este fin se han utilizado agentes que actúan en puntos concretos de la cascada isquémica (al menos teóricamente), como anticuerpos anti-leucocitarios, naloxona, barbitúricos, hipotermia (Krieger, 2004; Worp, 2007; Adams, 2007), dimetilsulfóxido, antagonistas de la serotonina, quelantes de  $\text{Ca}^{2+}$  y hierro, entre otros. La terapéutica neuroprotectora se puede administrar por horas, días o incluso semanas después del **ACV**; por lo que se debe considerar la tolerabilidad y aceptación del paciente (Dyker, 1998).

**Antagonistas de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$ .** La razón de su uso estriba en su potencial para frenar una de las vías de entrada del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular tras la cascada catabólica

mediada por la isquemia; la administración de azelnidipina y amlodipina en ratas con **ACM** inhibió la apoptosis y redujo el estrés oxidativo (Lukic-Panin, 2007); sin embargo, de acuerdo a los resultados obtenidos por **Horn y Limburg** (2001) recomiendan no utilizar Antagonistas del  $\text{Ca}^{2+}$  en pacientes con Ictus isquémico agudo.

**Antagonistas AMPA y NMDA.** De la creciente lista de neuroprotectores se ha prestado atención especial a aquellos fármacos capaces de bloquear los receptores **NMDA** para el glutamato; curiosamente la mayoría de las neuronas más susceptibles a la isquemia, están invadidas por fibras glutamatérgicas; ésta evidencia sugirió que debía haber una relación entre la neurotransmisión mediada por el glutamato y el daño neuronal post-isquémico. La isquemia prolongada tiene como resultado una elevación del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular y un aumento de la actividad del  $\text{Ca}^{2+}$  en la terminal presináptica, generando la liberación de varios neurotransmisores; por ejemplo, durante los primeros diez minutos de isquemia, la liberación de neurotransmisores excitatorios como glutamato o aspartato se multiplica ocho veces, en comparación con la concentración pre-isquémica; así mismo, la excitotoxicidad (resultante de una liberación excesiva presináptica y un impedimento de la recaptura de glutamato) ha sido demostrada como mediadora de daño neuronal en la **IC**; la hiperactivación de los receptores glutamatérgicos ionotrópicos induce el paso de  $\text{Ca}^{2+}$  al interior de la célula, y el aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico activa diferentes vías catabólicas.

En modelos de isquemia cerebral global o focal, los antagonistas de los receptores NMDA y AMPA han demostrado una significativa neuroprotección; sin embargo, el bloqueo antagonista NMDA influye no solo en el proceso patológico sino

también en el fisiológico pudiendo provocar severos efectos psicoticomiméticos (Dyker, 1998; Alexandrova, 2005).

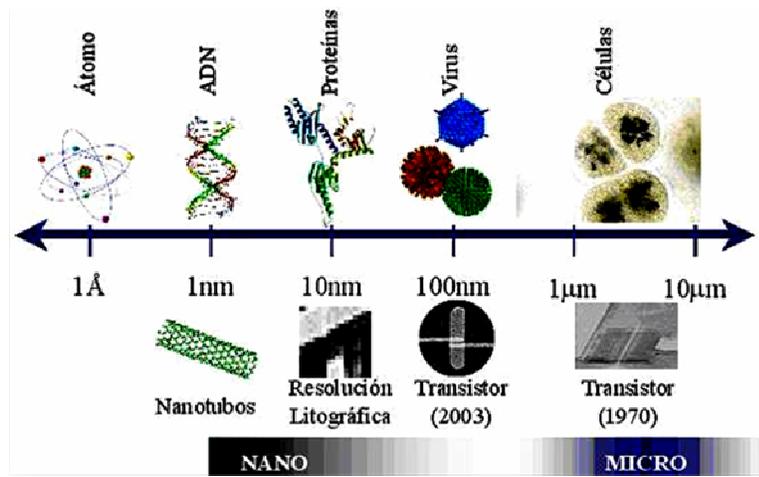
**Antioxidantes.** La actividad antioxidante es una respuesta a la alteración del balance redox que afecta a los tejidos, líquidos y órganos en diferentes estados patológicos; las medidas terapéuticas se basan en la neutralización de los **RL** producidos en exceso; para ello se están evaluando en modelos animales las concentraciones antioxidantes de  $\alpha$ -tocoferoles, ácido ascórbico, superóxido dismutasa y lazaroides que disminuyan el tamaño del infarto y contribuyan a la recuperación funcional (Adams, 2007; Alexandrova, 2005; Bañer, 2004; Leinonen, 2000;).

### ∞ **Utilidad de la nanobiotecnología en padecimientos del SNC**

En la última década del siglo XX (denominada del cerebro por los grandes avances en neurología) se ha registrado un crecimiento exponencial en las áreas de investigación y desarrollo nanobiotecnológico (Jain, 2006; Baker, 2006); esta ciencia se caracteriza por la manipulación de átomos y moléculas (a nivel nanométrico 0.000000001 m) (Figura 5) que facilitan el diseño de novedosos materiales y sistemas útiles para la prevención, diagnóstico y tratamiento de diversos padecimientos del **SNC** (Duncan, 2004, 2005; Muldoon, 2006).

A nivel pre-clínico (modelos de **IC**, **EAE**, **Traumatismo craneoencefálico** [TCC], lesión del nervio óptico etc.) se ha demostrado la utilidad terapéutica de ciertos "**conjugados poliméricos**" a través de la respuesta que generan en los **LT** (Yaniv,

2007; Kipnis, 2003); estos sistemas se obtienen de complejas reacciones de polimerización entre 2 o más nanómeros (Duncan, 2004); para su solubilización, estabilización y liberación sistémica requieren de moléculas conocidas como micelas poliméricas (Vila, 2006).



**Figura 5:** Escala de dimensiones, comparación de las estructuras naturales y manufacturadas.

**Tabla 5. Características farmacológicas de los copolímeros**

- 1) No son absorbidos sistémicamente, demostrando seguridad cuando se utilizan por periodos prolongados.
- 2) Especificidad de acción y capacidad de interactuar en diferentes enfermedades (polivalencia) (Dhal, 2006; Hudecz, 2001).
- 3) No son captados por el sistema reticuloendotelial ya que la parte polar impide la interacción del núcleo hidrofóbico con componentes plasmáticos, pudiéndose modificar el tiempo de circulación del agente terapéutico.
- 4) Su peso molecular promedio es de  $10^6$  lo que impide su eliminación renal (Vila, 2006).
- 5) No son encefalitogénicos.

## ∞ Estructuración molecular de Copaxone®

Es el primero y actualmente el único copolímero inmunomodulador aprobado por la **FDA** para el tratamiento de la **EM**; a principio de los años 60's Ruth Arnon, Michael Sela y Dvora Teitelbaum del Instituto Weizmann, trabajaban en el desarrollo de una molécula inmunogénica; para éste fin, utilizaron pequeñas cadenas peptídicas de tirosina, triptófano o fenilalanina a gelatina; encontrando que estos derivados tenían grandes propiedades inmunogénicas que residían en la molaridad del péptido, ya que los residuos moleculares menores de 4000 daltons son antígenos potentes. Utilizando el modelo inmunogénico de la **EAE**; descubrieron que el polipéptido que habían obtenido presentaba una gran similitud con la **MBP** (incluso en la carga eléctrica +); llevándolos a sintetizar aminoácidos (debidamente protegidos) de manera randomizada, con el objetivo de obtener diferentes copolímeros. Sorprendentemente encontraron que uno presentaba actividad encefalitogénica, pero no desencadenaba la **EAE** (Scheindlin, 2004), a éste compuesto lo denominaron "**Copolimero-1**"(el "1" indica que se obtuvo de la primera reacción de copolimerización); al transcurso del tiempo, diferentes investigadores lo nombraron "**Cop-1**" ("Cope"). Estudios a nivel experimental y pre-clínico demostraron resultados contundentes relacionados con la eficacia de **Cop-1** para suprimir los signos causados por la **EM** y **EAE** (murinos, conejos y dos especies de primates [Rhesus y baboons]) (Teitelbaum, 1988). Finalmente laboratorios TEVA registra su nombre comercial y aplicación clínica; a los sufijos "**Cop**" y "**one**" agregaron la palabra "**axone**" (en referencia a su blanco

terapéutico); y "**Glatiramer**" por las letras iniciales de sus constituyentes (el sufijo "**mer**" es el designado para los polímeros) (Scheindlin, 2004)

### ∞ **Propiedades inmunomoduladoras de Copaxone®**

Deriva de la combinación randomizada con 4 polipéptidos sintéticos: L-alanina, L-lisina, L-ácido glutámico y L-tirosina; con un residuo molar de 0.14:0.34:0.43:0.09 y una conformación media de 45-100 aminoácidos (Neuhaus, 2007); su peso molecular es de 4.7-11kDa (Kipnis, 2002).

Es un importante inductor de **LT<sub>reg</sub>**. Th2. (Prat, 2005; Duda, 2000) mismos que liberan cantidades significativas de IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 y TGF  $\beta$  *in Situ* (Aharoni, 2000-2003; Vieira, 2003); estos linfocitos ingresan al **SNC** y al ser estimulados por la **MBP** (reacción cruzada) regulan la liberación de citocinas pro-inflamatorias producidas por los **LT Th1** (Aharoni, 2000); de esta forma tiene un efecto terapéutico en el progreso neurodegenerativo de la **EM** y la **EAE** (Teitelbaum, 1999).

La activación de los **LT CD<sup>4+</sup>** depende en gran parte del conjunto de señales de transducción originadas por moléculas estimuladoras que se encuentran en la membrana celular como: **CD<sup>28</sup>**, **CD<sup>4</sup>**, **CD<sup>3</sup>** y el mismo **TCR**; que pueden o no culminar en la activación del **LT**; la presencia de aminoácidos diferentes en la región reconocida por el **TCR** o secuencias repetidas formando copolímeros, sin que modifiquen la capacidad de unión al **MHC**; provoca cambios en el fenotipo, anergia o ausencia del reconocimiento. **Copaxone®** presenta mimetismo y una intensa reacción cruzada con el

epitopo 82-100 de la **MBP** que le permite competir de manera promiscua por la unión con el **MHC** clase II, sin necesidad de ser procesado (Fridkis-Hareli 1999).

## ∞ Estudios pre-clínicos

A pesar de las intensas investigaciones por más de 40 años sobre los mecanismos neuroprotectores de **Copaxone**<sup>®</sup> estos no han sido elucidados completamente; cuando se administra (vía oral o parenteral) en murinos inhibe la **EAE** (Teitelbaum, 1999), en modelos de lesión aguda al **SNC**, la inmunización activa reduce el proceso neurodegenerativo y promueve la recuperación funcional. **Kipnis y cols** (2000) en un modelo de lesión al nervio óptico, inmunizaron a ratas Lewis con 100 µg de **Copaxone**<sup>®</sup> emulsificados en volúmenes iguales de adyuvante completo de Freund cada 24 h durante 5 días consecutivos; el análisis histológico demostró que la inmunomodulación post-traumática previene significativamente la degeneración de las fibras nerviosas, asociado a la liberación de factores neurotróficos **BDNF** por los **LT** *react* a **Copaxone**<sup>®</sup>; así mismo se ha demostrado en estudios *in vitro* que diferencia y regula selectivamente la migración al cerebro de **LT** colaboradores (Prat, 2005) y en las **CD** provoca cambios estructurales que favorecen su movilidad en la **BBB** (Vieira, 2003).

En un modelo para el estudio de la enfermedad de Alzheimer, la inmunización con **Copaxone**<sup>®</sup> disminuyó la formación de placas β-Amiloideas y estimuló la neurogénesis en el hipocampo; los animales tuvieron un mejor desempeño cognitivo en la ejecución del laberinto acuático de Morris, aparentemente la vacunación favoreció un fenotipo neuroprotector en las **CD** y microglía al producir factores neurotróficos IGF1 y

de crecimiento insulínico (Butovsky, 2006). **Gorantla y cols** (2008); por otro lado, en un modelo de encefalitis secundaria al virus de inmunodeficiencia humana (a través de células mononucleares sanguíneas de personas infectadas con el virus tipo I y II) administraron 75µg/ratón/día vía **Sc** durante 7 días; la neuroprotección fue a través de la reducción en la expresión de la óxido nitrosintasa y el incremento en la producción de **IL-10** y **BDNF** (Gorantla, 2008). De acuerdo a los estudios que hemos citado podemos concluir que la acción básica de **Copaxone**<sup>®</sup> es modular la liberación de citocinas pro-inflamatorias y la respuesta de los **LT<sub>react</sub>** a diferentes proteínas de la mielina.

**Toxicología.** Estudios en murinos, conejos y perros han demostrado que la utilización sub-crónica de **Copaxone**<sup>®</sup> no causa efectos tóxicos ni acumulación orgánica.

### ↪ **Uso clínico**

En pacientes con **EM** inmunomodula la respuesta de los monocitos generando niveles significativos de IL-10 y disminución en la producción de IL-12 (Kim, 2004); la dosis que se utiliza es de 20 mg/día; después de su administración es rápidamente degradada a pequeños oligopéptidos y aminoácidos permaneciendo únicamente el 10% en el sitio de la inyección (1 h después). No se han detectado concentraciones plasmáticas sistémicas en orina o heces (Neuhaus,. 2007). La administración a largo plazo provoca principalmente dolor y eritema en el sitio de inyección (Tabla 6)

**Tabla 6. Eventos adversos en pacientes con EM progresiva tratados con Copaxone®**

---

	%
<b>Eritema en el sitio de inyección</b>	<b>57.1</b>
<b>Dolor en el sitio de inyección</b>	<b>48.8</b>
<b>Daño accidental</b>	<b>36.4</b>
<b>Masas en el sitio de inyección</b>	<b>35.6</b>
Infección	33.3
Astenia	30.5
Dolor	26.8
Hemorragia en el sitio de inyección	20.7
Prurito en el sitio de inyección	20.1
Dolor de espalda baja	19.8
Migraña	18.2
Edema en el sitio de inyección	14.2
Dolor pulmonar	12.4
Inflamación en el sitio de inyección	8.6
Dolor abdominal	7.2
Fiebre	4.8
Incapacidad ambulatoria	4.6

El eritema y dolor local son de los efectos colaterales más frecuentes en pacientes con EM que fueron tratados con **Copaxone®** (Estudio multicéntrico a 3 años) adaptada de **Wolinsky y cols. 2007**)

---

# Justificación

---

Los **Accidentes Cerebrovasculares** son la principal causa de incapacidad laboral a nivel mundial y la segunda de mortalidad en adultos de países desarrollados; el objetivo terapéutico es preservar la mayor cantidad de tejido que se encuentra bajo penumbra isquémica a través de la restauración del **Flujo Sanguíneo Cerebral**; sin embargo, la reperusión y/o el fenómeno de no reflujo, podría exacerbar el proceso fisiopatológico comprometiendo la integridad neuronal. La inflamación durante y después de la **Isquemia Cerebral**, se ha asociado tradicionalmente con el daño anatomofuncional; se ha comprobado que inmunomodular ciertos aspectos del proceso inflamatorio después de una lesión al **SNC**, evita la propagación del daño y estimula en el sitio de afección mecanismos neuroprotectores a través de los **LT**. A ésta respuesta del **SI** se le ha denominado "**Autorreactividad protectora**" y puede ser estimulada de manera fisiológica por medio de **Ligandos de Peptidos Alterados** (Anderton, 2001) como **Copaxone®**; éste copolímero ha demostrado efectos benéficos en modelos de lesiones agudas al **SNC** y enfermedades neurodegenerativas (Kipnis, 2000; Kipnis, 2003); sin embargo, no existen estudios de su utilidad en **IC**, por ésta razón se decidió evaluar si la inmunización activa nos brindaría la oportunidad de estimular los mecanismos de autoprotección y restauración influyendo en la recuperación funcional después de la lesión.

## Planteamiento del problema

---

1. ¿La inmunización activa con **Copaxone**<sup>®</sup> en ratas promoverá una mejor recuperación funcional expresada en pruebas de evaluación motora y disminuirá el área del infarto después de la **Isquemia Cerebral Focal** aguda con reperfusión?

# Hipótesis

---

1. ¿La inmunización activa con **Copaxone**<sup>®</sup> en ratas promoverá una mejor recuperación funcional expresada en pruebas de evaluación motora y una menor destrucción del tejido cerebral que aquella observada en ratas no inmunizadas después de la **Isquemia Cerebral Focal** aguda con reperusión?

# Objetivos

---

## General

Evaluar el efecto neuroprotector de la inmunización con **Copaxone®** sobre el déficit neurológico y la preservación del tejido neural en ratas con **Isquemia Cerebral Focal** aguda con reperfusión.

## Particulares

1. Cuantificar la recuperación funcional y la preservación del tejido cerebral en ratas sometidas a **Isquemia Cerebral Focal** aguda con reperfusión inmunizados con **Copaxone® + Solución Salina Fisiológica (SSF)**.
2. Cuantificar la recuperación funcional y la preservación del tejido cerebral en ratas sometidas a **Isquemia Cerebral Focal** aguda con reperfusión sin ningún tratamiento.

## Material y métodos

---

La presente tesis fue aprobada por el Comité de ética de la FMVZ-UNAM, todos los procedimientos fueron de acuerdo a la norma oficial de México sobre el manejo y cuidado de animales de laboratorio. La población experimental fue proporcionada por el Centro de Investigación para curar la parálisis Proyecto Camina.

**Animales.** Se utilizó para el estudio la cepa Sprague Dawley (**SD**), ya que en ésta se desarrolla de manera más eficiente la "**Autorreactividad protectora**" (Kipnis, 2001). Se realizó en machos con un peso promedio de 300-350 gr; desde su nacimiento hasta el final del experimento se mantuvieron en condiciones ambientales controladas con un ciclo de 12 h luz y 12 h de oscuridad; con una temperatura ambiente de  $20^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ , su alimentación fue a base de pellets y agua *ad libitum*. Todos los animales estaban sanos y no recibieron ningún tratamiento previo.

## ∞ Tamaño de la muestra

Se determinó mediante la fórmula (Young ,1983):

$$Z\alpha / 2 \sqrt{2P(1-P)} + Z\beta (\sqrt{P1(1-P1)} + \sqrt{P0(1-P0)})$$

---

P1-P0

Tomándose en cuenta los siguientes valores:

Alfa= 0.05 ( $Z\alpha = 1.96$ )

Beta = 0.1 ( $Z\beta = 1.28$ ) y una diferencia entre los grupos con inmunización activa y sin tratamiento (testigo) del 30%.

## ∞ Diseño experimental

En el experimento se evaluaron 2 grupos:

1) **Copaxone<sup>®</sup>** (n=6)

2) **SSF** (n=6)

**Grupo 1 (Inmunización activa):** Ratas con **Isquemia Cerebral Focal** aguda con reperusión + inmunización con **Copaxone<sup>®</sup>** (200 µg/ml **SSF** vía **SC**) en la región interescapular.

**Grupo 2 (SSF):** Ratas con **Isquemia Cerebral Focal** aguda con reperusión en las que se administró en la región interescapular 1 ml. de **SSF**.vía **SC**

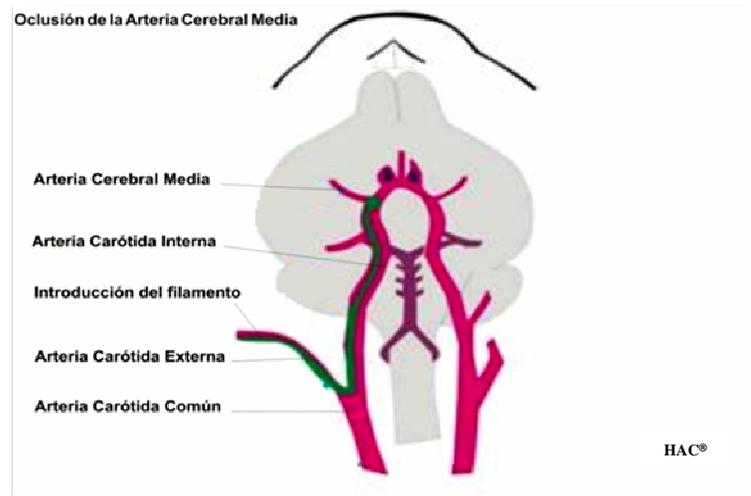
## ∞ Procedimiento anestésico y monitoreo

La anestesia fue a través de Ketamina (40 mg/Kg vía **IM**), combinada con Clorhidrato de Xilacina 2% (10 mg/Kg vía **IM**; **Rompun**<sup>®</sup>) y sulfato de atropina (0.5 mg/kg vía **Sc**). El manejo polimodal del dolor perioperatorio fue a través de lidocaína al 2% (0.1 ml infiltrados vía **Sc** en el sitio a incidir; **Pisacaina**<sup>®</sup>) y Tartrate de Butorfanol (0.2 mg/kg diluidos en 0.2 ml de **SSF** vía **SC Torbugesic**<sup>®</sup>); una vez que el animal perdió el reflejo palpebral y mandibular, se instiló en los ojos lagrima artificial (**Vizcotear**<sup>®</sup>) con la finalidad de prevenir úlceras corneales y fue posicionado en decúbito dorsal sobre un colchón térmico para el mantenimiento a 37.5 °C durante el procedimiento quirúrgico y la isquemia, monitoreándolo por medio de un sensor térmico rígido colocado en el recto. La frecuencia cardíaca y saturación de O<sub>2</sub> se monitoreo con un oxímetro de pulso veterinario durante la cirugía y la **IC** a través de un sensor infrarrojo colocado en la base de la cola. El suplemento de O<sub>2</sub> fue regulado a través de un flujometro pediátrico y una mascarilla neonatal modificada, fijada a la base del cuello.

## ∞ Modelo de ICF aguda con reperfusión

Se realizó de acuerdo al modelo propuesto por **Zea Longa y cols** (1989) con ciertas modificaciones que serán citadas oportunamente. El procedimiento quirúrgico se llevo a cabo con la ayuda de un microscopio para microcirugía; se realizo una incisión en la región cervical ventral de aproximadamente 1.5-2 cm de largo, separando por disección roma los músculos omohioideo y esternohioideo derechos, para el abordaje de la **ACC**, **ACI** y **ACE**; una vez localizadas, se procedió a disecarlas del nervio vago y tejido involucrado para ser expuestas y separadas con con vicryl 3-0 (Johnson&Johnson de México) (proceso modificado del modelo original); posteriormente se identificó la porción media de la **ACI** y se punciono su cara externa con una aguja calibre 27, para la introducción de un monofilamento 3-0 (Johnson&Johnson de México) desplazándolo ligeramente y ejerciendo una ligera presión en sentido ventral para generar el espacio necesario que permitiera la introducción de otro monofilamento del mismo calibre previamente flameado (1 segundo), desplazando el émbolo hacia la **ACI** aproximadamente 17mm hasta sentir una ligera resistencia en el avance (al mismo tiempo fue retirado el monofilamento que sirvo de guía). Este evento es indicativo que el embolo se encuentra en el origen de la **ACM** (Figura 6); para evitar el movimiento del embolo a causa de la ventilación, se fijó con un punto sencillo (vicryl 3-0) a la porción distal de la **ACE**. Una vez concluidas las 2 h de **ICF** retiramos el embolo y aplicamos por 15 minutos gelatina hemostática (**Gelfoan**<sup>®</sup>) en el sitio de la punción (manejo no descrito en el modelo original). Finalmente se verificó la restauración del flujo sanguíneo y se procedió a suturar la incisión con puntos separados. Cabe mencionar

que el tiempo promedio que se requirió para la **ACM** fue de 45 min; por lo que fue necesario re-dosificar con Ketamina (50% de la dosis inicial) a todos los pacientes para el mantenimiento del plano anestésico durante la isquemia.



**Figura 6.** Anatomía vascular de la región ventral del cuello y encefálica de la ratona; mostrando la secuencia en forma ascendente para la oclusión de la Arteria Cerebral Media.

---

## **Manejo del copolímero**

- Se mantuvo en refrigeración de acuerdo a la temperatura recomendada por el fabricante (Sigma, St. Louis, MO).
- Semanas previas al procedimiento quirúrgico, fueron pesados 200µg. de **Copaxone**<sup>®</sup> a través de una balanza granalítica y separados en alícuotas para su preparación.
- Después de concluir la **ICF** fue retirada del refrigerador la alícuota y se mantuvo a temperatura ambiente para su dilución en 1 ml de **SSF**.

## **Características de la inmunización**

Finalizando el procedimiento quirúrgico se seleccionaron a los animales de forma aleatoria para la designación del grupo experimental. El estudio fue ciego, de tal manera que el tesista desconocía el tratamiento del grupo experimental.

## ∞ Cuidados post-operatorios

- Se administraron 5 ml NaCl vía Sc en la región lumbar para la reposición de líquidos perdidos durante el procedimiento quirúrgico.
- Se colocaron a los animales en cajas adaptadas para el suministro de O<sub>2</sub> durante 30 minutos y posteriormente fueron trasladados a una jaula sellada herméticamente con temperatura controlada durante 72 h
- El acceso al agua y alimento fue **ad libitum** verificando diariamente su consumo.
- Se instauró un esquema simple de antibioticoterapia con base a la efectividad que han demostrado las quinolonas en el control de procesos infecciosos en **IC** (Meisel, 2004) a través de enrofloxacin vía IM BID durante 5 días;.
- El tratamiento del dolor post-operatorio consistió en Tartrate de Butorfanol (0.2 mg/kg vía Sc BID) durante dos días (La medicación se administró después de haber concluido la primera evaluación locomotora; con el fin de evitar alteraciones en el desempeño de las pruebas). Cabe resaltar que no se utilizaron otras opciones terapéuticas para el manejo del dolor post-operatorio y neuropático, ya que se podría presentar un efecto sinérgico (Dippel, 2001) con el tratamiento e influir en los resultados.
- El estado de salud de los animales se evaluó durante todo el proceso experimental.

## ∞ **Desempeño locomotor**

Las evaluaciones neurológicas se realizaron 1 y 7 días después de la lesión utilizando la escala propuesta por Zea Longa y cols. (1989) (Tabla 7). Para evitar alguna influencia o predisposición por parte del tesista (con relación al efecto terapéutico del tratamiento), se requirió de personal capacitado con desconocimiento del grupo experimental. Los resultados de la escala neurológica se obtuvieron a través de la suma en las respuestas posturales y la capacidad de marcha; donde cero representa ningún grado de afección neurológica y cuatro el máximo grado de lesión.

**Criterio de exclusión.** Debido a la elevada variabilidad anatómica que presenta la cepa **SD** en la **ACM** (Fox., 1993), en algunas ocasiones no se lleva a cabo adecuadamente la **ACM**o, por lo que se consideró como criterio de exclusión aquellos animales que en la primera evaluación tuvieran un aprovechamiento locomotor menor a 2 puntos.

---

Tabla 7. Evaluación Locomotora

---

0	= Sin déficit neurológico (flexión de miembros normal, movimiento completo y apoyo).
1	=Dificultad para extender completamente el miembro torácico izquierdo.
2	=Desplazamiento en círculos hacia la izquierda (déficit neurológico moderado).
3	=Dificultad para extender completamente el miembro torácico derecho (déficit focal severo).
4	=No camina de manera espontanea y presenta alteración en el estado de conciencia

## ∞ **Procesamiento histológico**

Al final del seguimiento correspondiente, separamos a los animales y procedimos a sedarlos con Xilacina al 2% (10 mg/Kg vía **IM**; **Rompun**<sup>®</sup>) y anestésarlos con Pentobarbital sódico (40 mg/Kg vía intraperitoneal; **Anestesal**<sup>®</sup>). Una vez que verificamos el estado anestésico profundo, administramos 1000 UI de Heparina vía **Ip** para evitar la activación de los factores de coagulación que pudieran interferir con el proceso de perfusión tisular; se realizó un bloqueo analgésico en la región intercostal derecha con Lidocaína al 1% (0.2 ml. **Pisa**<sup>®</sup>); después de 20 minutos de haber administrado el anticoagulante, realizamos una toracotomía y cateterizamos la aorta descendente para perfundir el tejido cerebral; con la ayuda de una bomba peristáltica infundimos 100 ml de **SSF** a una velocidad de 30 ml/min seguido de 350 ml de solución fijadora (formaldehído). Extrajimos el cerebro y lo colocamos en la misma solución por 24 h (a temperatura ambiente); posteriormente lo cambiamos a un medio citoprotector (a temperatura de 4 ° C) con sucrosa al 30% por 3 días. Al completar este periodo realizamos cortes coronales de 2 mm (a través de una matriz cerebral) y los colocamos en parafina para su conservación. Una vez fijado el tejido, se utilizó un criostato para obtener 3 muestras coronales de 25-µm. espaciadas cada 200-µm. Las muestras histológicas fueron colocadas en laminillas previamente gelatinizadas y teñidas con Eosina & Hematoxilina para su análisis con un **software** de imágenes (Image-Pro 3D Discovery<sup>®</sup>)

## ∞ Técnica de tinción Eosina & Hematoxilina

- Hidratación con alcohol 100º y alcohol 96º, 2 minutos cada baño.
- \* en agua destilada.
- \* en Hematoxilina durante 5 minutos.
- \* en agua destilada y la lavamos con H<sub>2</sub>O corriente hasta quedar claro.
- \* en alcohol ácido (HCL al 1% más alcohol de 70º)
- \* en agua destilada 2 o 3 inmersiones (para frenar la acción del diferenciador).
- \* en Eosina durante un minuto.
- \* en agua destilada (limpieza del excedente).
- Deshidratamos el tejido con dos baños de alcohol (96º y 100º respectivamente) durante 10 minutos.
- Aclaración del tejido con dos baños de Xilol por 10 minutos cada uno.

*\*Sumergimos las laminillas.*

## ∞ Descripción operativa de las variables

### Variables independientes

- **ICF aguda con reperfusión.** Episodio en el que se provocó la **ICF** durante 2 h con un monofilamento (3-0) colocado en el lumen de la **ACM**, para después retirarlo y se lleve a cabo el fenómeno de reperfusión.
- **Inmunización activa. Copaxone<sup>®</sup>** (200µg/1ml. **SSF** vía Sc.) en la región interescapular 1 h después de haber concluido las 2 h de **ICF**

### Variables dependientes

- **Neuroprotección.** Preservación del tejido cerebral secundario a la **ICF** aguda con reperfusión.

## ∞ Determinación del infarto

Se consideró área infartada aquella que presentara destrucción y desorganización (atípico a la que se observaría en un cerebro normal con la tinción de Eosina/Hematoxilina). El cálculo del área del infarto se realizó con la siguiente fórmula:

$$\text{Medida del área del infarto} \times \left( \frac{\text{Área total del hemisferio contralateral}}{\text{Área total del hemisferio ipsilateral}} \right)$$

# Resultados

---

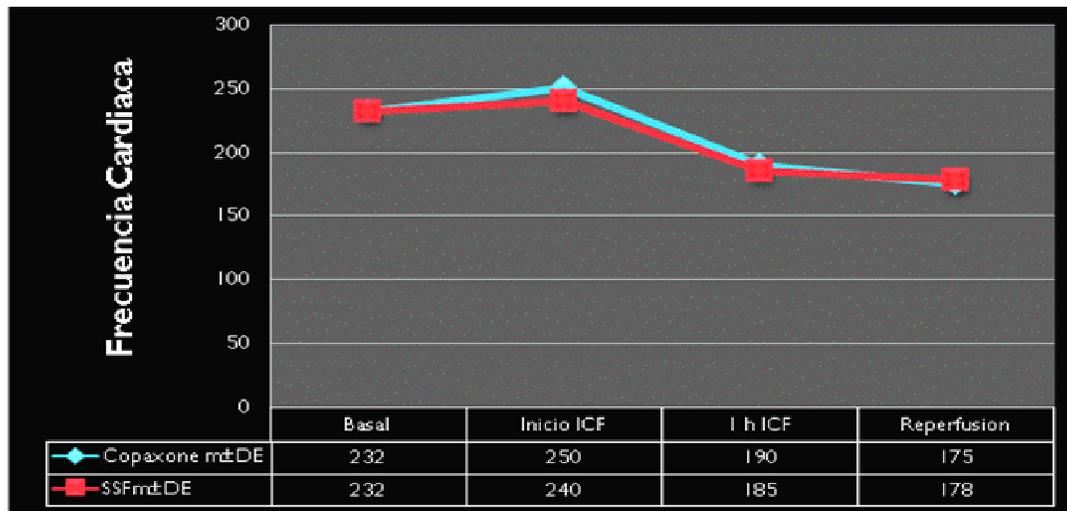
## ∞ Análisis estadístico

Una vez obtenidos los resultados del monitoreo anestésico, evaluaciones locomotoras y del análisis histológico, se comprobó que los datos siguieran una distribución normal a través del Análisis de Varianza (ANOVA) de una vía; los resultados descriptivos fueron la media, la Desviación Estándar y el Error típico de la media ( $m \pm DE$ ); para los parámetros medidos se considero el 99% del intervalo de confianza entre el límite superior e inferior. La diferencia entre la media de cada grupo se verificó con la prueba de prueba de Mann-Whitney considerando significativa la diferencia estadística cuando  $p \leq 0.05$

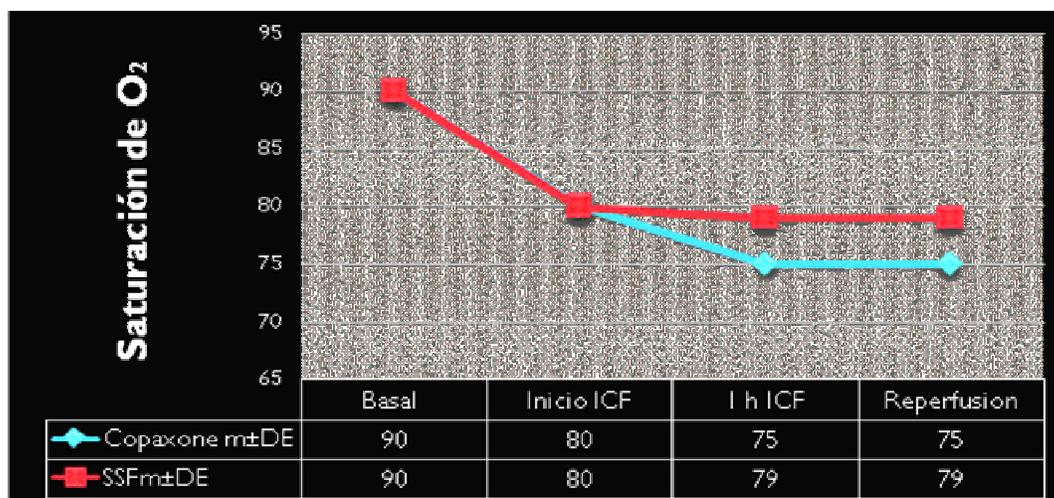
## ∞ Monitoreo Anestésico

En los dos grupos experimentales se presentaron alteraciones en la frecuencia cardiaca ( $187.5 \pm 3.5$ ;  $176.52.1 m \pm DE$  respectivamente) (Grafica 1) y la saturación de  $O_2$  (Grafica 2) durante la primera hora de la isquemia **IC** y la reperusión ( $80 \pm 0$ ;  $76.9 \pm 79 m \pm DE$  respectivamente).

## Registro de la frecuencia cardiaca y saturación de O<sub>2</sub> en ratas SD durante la ICF

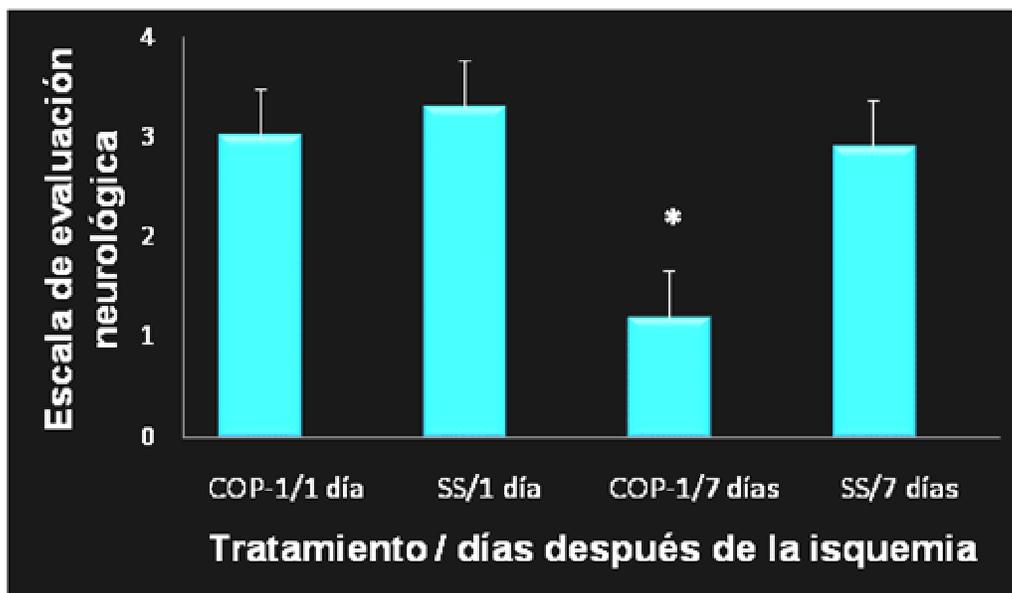


**Graficas 1 y 2.** Registro de la frecuencia cardiaca y saturación de O<sub>2</sub> en ratas **SD** durante la **ICF** y 15 minutos después de la reperfusion; el grupo inmunizado con **Copaxone**<sup>®</sup> está representado por diamantes; por otro lado el grupo tratado con **SSF** se encuentra representado por cuadros; en ambos se presentaron alteraciones en la primera hora de la ICF y veinte minutos después de la reperfusion (frecuencia cardiaca 187.5±3.5; 176.52.1 m ± DE respectivamente) saturación de O<sub>2</sub>(80± 0; 76.9 ±79 m ± DE respectivamente).; estos cambios se presentan frecuentemente cuando se utilizan anestésicos sistémicos para procedimientos quirúrgicos prolongados; así mismo, el aporte de O<sub>2</sub> a través de mascarillas es inadecuado y favorece a la desaturación de O<sub>2</sub>



## ∞ Evaluaciones neurológicas

Un día después de la **ICF** el grupo inmunizado con **Copaxone**<sup>®</sup> ( $3.0 \pm 0.7$  m  $\pm$  DE) así como el tratado con **SSF** ( $3.2 \pm 0.4$  m  $\pm$  D.E) presentaron déficits locomotores severos (Gráfica3); sin embargo, siete días después de la lesión, el grupo de **Copaxone**<sup>®</sup> presentó una recuperación neurológica significativamente superior ( $1.2 \pm 0.4$  m  $\pm$  DE) a la del grupo tratado con **SSF** ( $2.8 \pm 0.5$  m  $\pm$  D.E;  $p=0.008$ ) (Grafica 3).



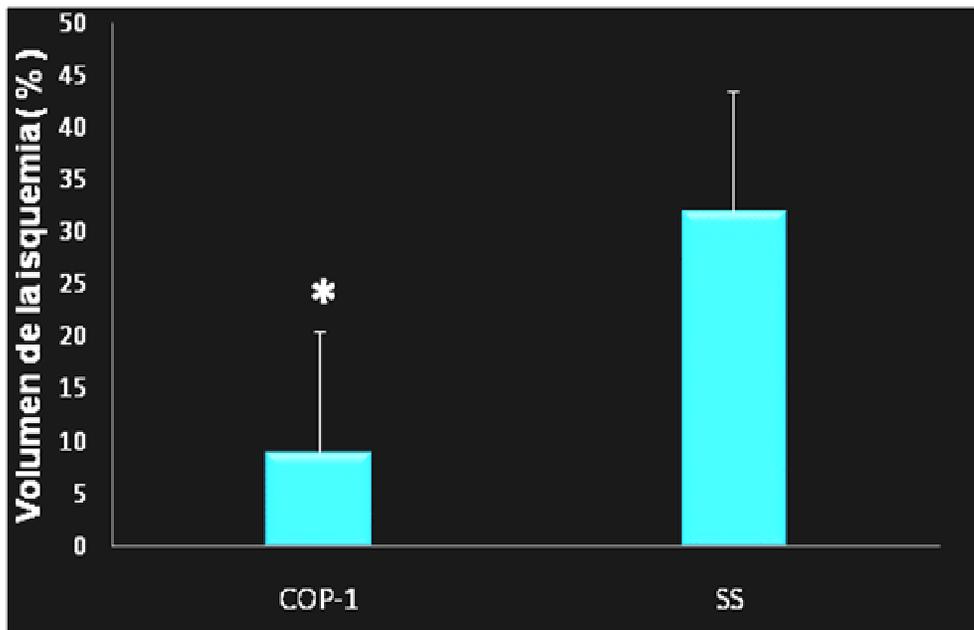
**Grafica 3.** Déficit neurológico en ratas SD 1 y 7 días después de la ICF. Los animales del grupo **Copaxone**<sup>®</sup> fueron inmunizados con 200  $\mu$ g 1h después de la reperfusión; al mismo tiempo, se administró únicamente SSF al grupo control \* $p=0.008$  vs 7 días SSF (prueba de Mann-Whitney). Las barras representan la media  $\pm$  DE de 6 ratas. El rango del valor mínimo y máximo por grupo **Copaxone**<sup>®</sup> (1 día) min 2, máx. 4; SSF (1 día) min 3, máx.

4; Copaxone® (7 días) min 1, máx. 2; SSF (7 días) min 2, máx. 3; Estos resultados representan 2 evaluaciones independientes.

---

## ∞ Análisis Histológico

El análisis histológico del grupo inmunizado con **Copaxone®** (Figura 7) presentó menor porcentaje de infarto ( $4.8 \pm 1.5$ ;  $m \pm DE$ ) en comparación al grupo tratado con **SSF** ( $32.2 \pm 8.6$ ;  $m \pm DE$ ;  $p=0.004$ ) (Grafica 4). Así mismo, estos resultados tuvieron una correlación significativa con el desempeño neurológico de la segunda evaluación ( $r=0.78$ ;  $p=0.001$ , correlación de Spearman).

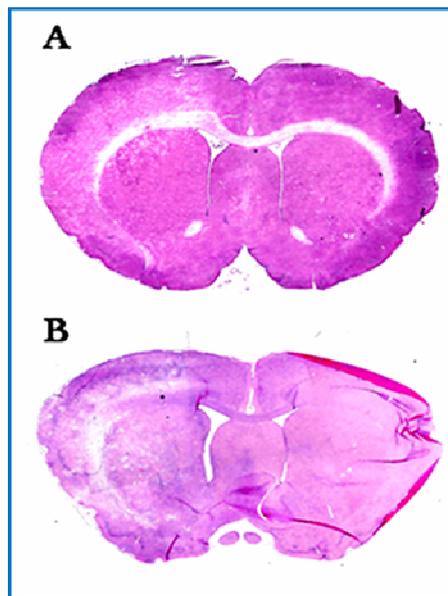


**Grafica 4** Porcentaje del volumen de infarto en ratas inmunizadas con **Copaxone®** (COP-1) o tratadas con **SSF** siete días después de la **ACM'o**. Los animales inmunizados con **Copaxone®** presentaron mayor preservación

del tejido neural comparada con la del grupo tratado con SSF \*p=0.004 vs SSF (prueba de Mann-Withney). Las barras representan la media  $\pm$  DE de 6 ratas. Estos resultados representan dos experimentos independientes

---

## Cortes coronales de ratas SD siete días después de la ICF



**Figura 7.** Fotografía representativa de cerebros teñidos con Eosina-Hematoxilina. Corte coronal de rata inmunizada con **Copaxone®** (A) o tratada con **SSF**. El grupo de **Copaxone®** presentó menor infarto comparado con la del grupo **SSF**.

---

## Discusión

---

En la restauración del déficit neurológico causado por la **Isquemia Cerebral**, intervienen mecanismos anatómicos, fisiológicos y terapéuticos (Ward, 2004; Aguilar, 2003; Colino, 2002; Seitz 1998); sin embargo, la recuperación funcional, no está correlacionada necesariamente con la disminución morfológica de la lesión (Pantano, 1996). En el presente estudio nuestra hipótesis experimental fue aceptada por la mayor preservación de tejido cerebral y desempeño locomotor que presentó el grupo de **Copaxone**<sup>®</sup>; la correlación entre los resultados, confirman la evidencia acumulada de investigaciones relacionadas con el efecto neuroprotector de **Copaxone**<sup>®</sup> (Hohlfeld, 2007; Dhal, 2006; Aharoni, 2005, 2000,2003; Vieira, 2003; Bakalash, 2005, Butovsky 2006; Ziemssen, 2002, Kipnis, 2003, 2000; Teitelbaum, 1999)

### ∞ **Autorreactividad protectora en la IC**

La intervención del **Sistema Inmunológico** a través de la respuesta innata y/o adaptativa, se ha relacionado con la activación endotelial (De Vries, 1997; Fukunaga, 2007), daño celular (Grau, 1992; Adamson, 2002; Stolyarov, 2002; Becker, 2003; Price, 2003; Giunti, 2003; Offner, 2006; Wang, 2007), inmunodepresión (Chamorro, 2006; Vargas 2006; Offner, 2006; Ivan, 2004; Meisel, 2004; Prass, 2003) y neurogénesis (Hallenbeck, 2006; Yaniv, 2007). Durante la **Isquemia Cerebral**, el proceso inflamatorio favorece la pérdida funcional de la **Barrera Hematoencefálica** (Yenari, 2006) y así

mismo la migración de **LT<sub>react</sub>** al parénquima cerebral (Strand, 1984; Tarkowski, 1995; Becker, 1997; Ohta, 2000; Giunti, 2003; Becker, 2003; Frenkel, 2004; Nadareishvili, 2004; Jauch, 2006; Yilmaz, 2006; Ziv, 2007; Gee, 2007); la prevalencia del microambiente inflamatorio (IL-1, IL-2, IL-12, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , macrófagos, microglía, neutrofilos, etc.) y la liberación de antígenos del **SNC** a través del **MHC**, podría desencadenar eventos de autorreactividad (Schroeter,1994); paradójicamente la regulación funcional de los **LT<sub>react</sub>** después de una lesión aguda al **SNC**, disminuye el proceso inflamatorio y favorece la preservación del tejido neural (Gee, 2007; Hendrix, 2007; Baird, 2006; Hallenbeck, 2006; Schwartz, 2003; Gusev, 2003; Stein, 2003; Kipnis, 2002<sup>a</sup>; Weiner, 2002; Yoles, 2001) (Figura 8). Tradicionalmente los mecanismos de inmunoneuroprotección después de la lesión al **SNC** se han atribuido a los **LT**. En estudios pre-clínicos de **Isquemia Cerebral**, la inmunomodulación de la respuesta inflamatoria, a través de la tolerarización con antígenos derivados de la mielina (MBP, MOG) disminuye el tamaño del infarto (Becker, 1997, 2003; Frenkel, 2004); así mismo, la inmunización con copolímeros 24 h después de la isquemia, genera un cambio en la respuesta neurotóxica de la microglía (Yenari, 2006; Schwartz,2003) y en el fenotipo de los **LT** Th1 (pro-inflamatorios) a **LT** Th2/Th3 (anti-inflamatorios), que favorece la neuroprotección y neurogénesis en el hipocampo y la corteza cerebral (Yaniv, 2007).

**Copaxone**<sup>®</sup> es el primer polímero terapéutico aprobado por la **FDA** y agencias regulatorias Europeas para el tratamiento de las recaídas de la **Esclerosis Múltiple**; se ha comprobado su efectividad inmunomoduladora al disminuir significativamente el progreso de la enfermedad (Dhal, 2006) y así mismo su funcionalidad como antígeno universal, al inducir la proliferación *in vitro* de **LT** vírgenes en pacientes sanos y con

**EM** (Duda, 2000); estas propiedades han permitido su evaluación en modelos de patologías neurodegenerativas, con resultados prometedores para la aplicación clínica como es el caso de la encefalitis causada por el virus de la inmunodeficiencia humana (Gorantla, 2008) o la toxicidad crónica del glutamato en la enfermedad de Alzheimer (Butovsky, 2006). Así mismo, en modelos de lesiones agudas al **SNC**, la inmunización activa con o bien, la transferencia pasiva de **LT<sub>react</sub>** al copolimero, inhibe la propagación del daño (Kipnis, 2003) a través de la inducción selectiva de **LT<sub>reg</sub>** Th2/Th3, mismos que promueven la liberación de citocinas anti-inflamatorias (IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 y TGF  $\beta$ ) y factores neurotróficos (BDNF, Neurotrofina-3, Factor Inhibidor de Leucemia, Factor Neurotrófico de las células gliales y Neurturina) *in situ* (Aharoni, 2000,2003; Vieira, 2003; Hohlfeld, 2007), favoreciendo la remielinización y supervivencia de los precursores oligodendrocíticos (Hohlfeld, 2007).; también regula de manera selectiva la migración transendotelial de **LT<sub>Th2</sub>** en la **Barrera Hematoencefálica** (aparentemente por quimiotaxis) (Prat, 2005) y en las **células dendríticas** estimula la producción de IL-10 provocando cambios estructurales que favorecen su internalización al cerebro (en su forma activa), sugiriéndose propiedades neuroprotectoras *per se* (Vieira 2003; Liu 2006, 2007). Su efecto neuroprotector después de la lesión en modelos de **EAE** (Aharoni, 2005, 2000,1997; Teitelbaum, 1999), **Traumatismo craneoencefálico** (Kipnis, 2003), nervio óptico (Kipnis, 2000) y Glaucoma (Bakalash, 2005) ha demostrado favorecer la recuperación anatomofuncional.

Es importante mencionar que a nivel pre-clínico no existe un criterio unificado para los esquemas de inmunización; por ésta razón, su efectividad terapéutica se lleva a cabo examinando diferentes vías de administración (SC, IM, oral, tópica, etc.),

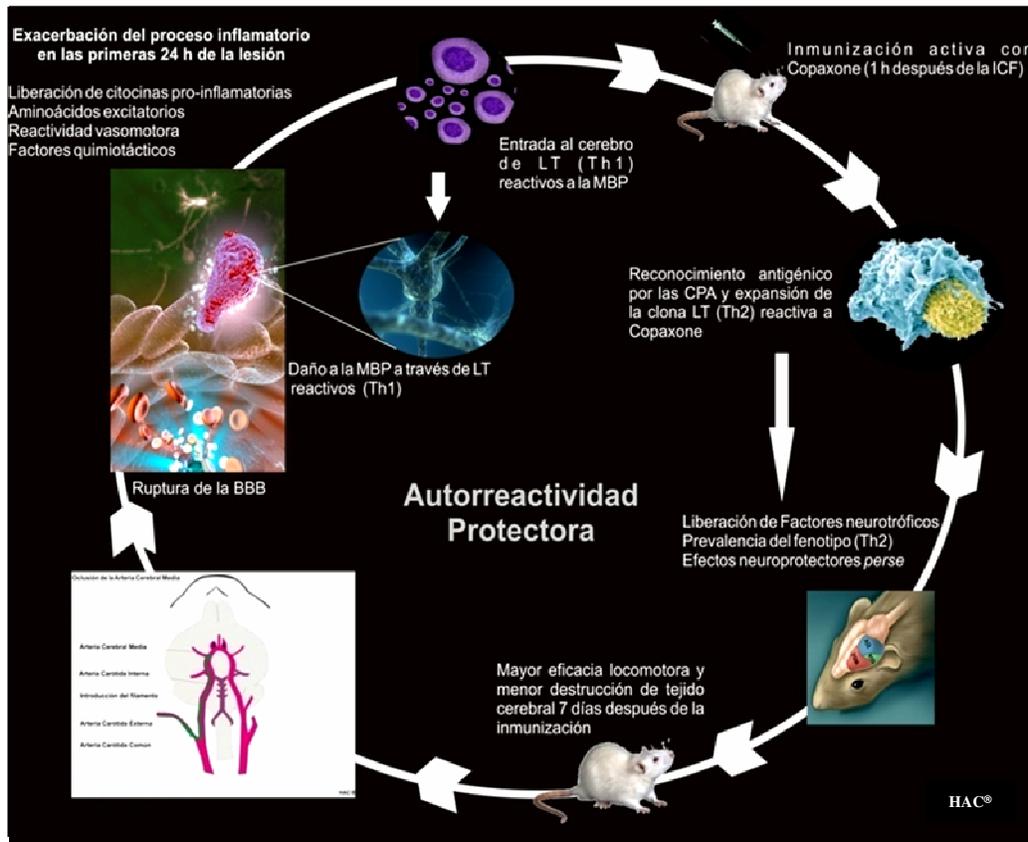
concentraciones terapéuticas (administradas con/sin adyuvante), regiones anatómicas y ventanas terapéuticas (generalmente inmediatamente después de la lesión) (Aharoni, 2000; Kipnis, 2000, 2002; Liu, 2007); en el presente estudio, la concentración nanoterapéutica fue elegida a través de la efectividad que se observó en pruebas de proliferación celular de los linfonodos retromandibulares (datos no presentados); para la inmunización se optó por la región interescapular pensando que la proximidad anatómica del órgano linfoide con el cerebro, favorecería de cierta manera a que el reconocimiento antigénico y la expansión de la clona de **LT<sub>react</sub>** a **Copaxone<sup>®</sup>** o **LT<sub>react</sub>** a la **MPP** fuera más eficiente (Figura 8); por otro lado, la ventana terapéutica fue planeada con base a la analogía clínica de aquellos pacientes que detectan (o manifiestan) de manera oportuna signología del **ACV** (migraña, afasia, parálisis facial, náusea, vómito, pérdida de la conciencia, etc.) y son trasladados a un centro de atención especializada. Tomando en cuenta que gran parte de los **ACV's** (85%) se origina por la oclusión aguda (trombos o émbolos) de las principales arterias cerebrales; el tratamiento que se instaura es la trombolisis con **rt-PA** o angioplastia intracraneal (Nogueira, 2007); la restauración del **FSC** evidentemente favorecerá la preservación del tejido que se encuentra bajo penumbra isquémica; sin embargo, se debe tener en cuenta el fenómeno de reperfusión. De acuerdo al efecto neuroprotector demostrado en el presente estudio y en patologías neurodegenerativas, la inmunización con **Copaxone<sup>®</sup>** después del **ACV** disminuiría las consecuencias inflamatorias y excitatorias de la reperfusión, y en caso de presentarse un nuevo evento isquémico (Wong, 2002), la respuesta del sistema inmune adaptativo al haber sido expuesto previamente al "**antígeno**"; favorecería a una "**Autorreactividad**

**protectora**" más eficiente; así mismo, es de vital importancia evitar el déficit cognitivo, la depresión, y la demencia que provoca la **IC** (Ivan, 2004; Linden ,2007); en modelos de la enfermedad de Alzheimer (Butovsky, 2006) y pacientes con **EM**, se ha demostrado que ésta deficiencia puede prevenirse con **Copaxone**<sup>®</sup> (Schwid, 2007); por esta razón, es conveniente valorar su efecto en modelos de **IC** sin reperfusión en donde la hipoxia generalizada afecta regiones vulnerables como el hipocampo (Gupta, 2002). En modelos de **EAE** se ha demostrado el efecto sinérgico de **Copaxone**<sup>®</sup> con fármacos que no están relacionados con la respuesta del **SI** (Stüve, 2006; Giulian, 2005); resultados preliminares en modelos de **ICF** han observado que la inmunización con **Copaxone**<sup>®</sup> en la fase sub-aguda (12 h) y el manejo del dolor neuropático con Gabapentina (**Neurontin**<sup>®</sup>) o Pregabalina (**Lyricea**<sup>®</sup>) favorece la recuperación funcional de forma más eficiente comparada con los tratados únicamente con **Copaxone**<sup>®</sup> (Jiménez Y, datos sin publicar), por esta razón, se requiere de estudios que determinen las posibles sinergias con trombolíticos, neuroprotectores y antibióticos (Vargas, 2006) aprobados para el tratamiento de los **ACV's** isquémicos; valorando los siguientes aspectos:

1.- Ventanas terapéuticas en la fase sub-aguda de la lesión, de tal forma que sea lo más apegado a la eventualidad clínica.

2.-Evaluación terapéutica en diferentes cepas (tomando en cuenta la gran diversidad genética de la patología) a mediano y largo plazo implementando esquemas básicos y complementarios de vacunación.

## **Mecanismo de acción propuesto para Copaxone<sup>®</sup> en la ICF**



**Figura 8.** La inflamación en la IC provoca ruptura de la **BBB** favoreciendo el ingreso de leucocitos al parénquima cerebral; la liberación de citocinas inflamatorias y antígenos locales podría ocasionar la activación de  $LT_{react}$  a los componentes de la mielina. La inmunización con **Copaxone**<sup>®</sup> en la región interescapular facilita el reconocimiento antigénico y la presencia de  $LT_{reg}$  Th2/Th3; promoviendo la liberación de citocinas anti-inflamatorias y factores neurotróficos *in situ*; así mismo, la presencia de **Copaxone**<sup>®</sup> en el sitio de la lesión incrementa el efecto de la neuroprotección *perse* y contribuye a la restructuración de la **BBB** (Vieira 2003; Liu 2006, 2007).

Finalmente la relevancia de este estudio es la neuroprotección anatomofuncional que se observó en la fase sub-aguda de la lesión con una sola inmunización (sin el uso de adyuvantes)

## Conclusiones

---

- 1) La inmunización con **Copaxone**<sup>®</sup> en ratas **SD** disminuye el área de lesión cerebral y favorece la recuperación funcional 7 días después de la **Isquemia Cerebral Focal**.
- 2) No se requirieron de adyuvantes para aumentar el efecto inmunogénico de **Copaxone**<sup>®</sup>

## Referencias

---

1. **Adams H and cols.** Classification of subtype of acute ischemic stroke: definitions for use in a multicenter clinical trial. **Stroke.** (1993) 24:35–41.
2. **Adams H and cols.** Guidelines for the early management of adults with ischemic stroke. **Stroke.** (2007)38:1655-1711
3. **Adamson P and cols.** Lymphocyte trafficking through the blood–brain barrier is dependent on endothelial cell heterotrimeric G-protein signaling. **The FASEB Journal.** (2002) Vol. 16.
4. **Aguilar R.** Plasticidad cerebral. **Rev Med IMSS** (2003) 41 (2): 133-142
5. **Aguilar F.** ¿Es posible la restauración cerebral? Mecanismos biológicos de la plasticidad neuronal. **Plasticidad y Restauración Neurológica** (2003)2; 2 pág. 143-152
6. **Aharoni R.** Copolymer 1 induces T cells of the T helper type 2 that crossreact with myelin basic protein and suppress experimental autoimmune encephalomyelitis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA Immunology* (1997)94;10821–10826.
7. **Aharoni R and cols.** Copolymer 1 acts against the immunodominant epitope 82-100 of myelin basic protein by T cell receptor antagonism in addition to major histocompatibility complex blocking. **Proc Natl Acad Sci U S A.** (1999)19; 96:634-9.

8. **Aharoni R and cols.** Specific Th2 cells accumulate in the central nervous system of mice protected against experimental autoimmune encephalomyelitis by copolymer 1. **PNAS** (2000) Vol 97 N21
9. **Aharoni R and cols.** Glatiramer acetate-specific T cells in the brain express T helper 23 cytokines and brain-derived neurotrophic factor in situ. **PNAS.** (2003) 100; 24 pp14157–14162
10. **Aharoni R and cols.** The immunomodulator glatiramer acetate augments the expression of neurotrophic factors in brains of experimental autoimmune encephalomyelitis mice. **PNAS.** (2005)102;52:19045–19050
11. **Akopov S, Simonian N and Grigorian G.** Dynamics of Polymorphonuclear Leukocyte Accumulation in Acute Cerebral Infarction and Their Correlation With Brain Tissue Damage. **Stroke.** (1996); 27:1739-1743.
12. **Alexandrova M and Bochev P.** Oxidative stress during the chronic phase after stroke. **Free Radical Biology & Medicine** 39 (2005) 297 – 316
13. **Anderston S.** Peptide-based immunotherapy of autoimmunity: a path of puzzles, paradoxes and possibilities. **Immunology.** (2001) 104; 367-376
14. **Anna-Karin R and Goran H.** T Cells in Atherogenesis. **Arterioscler Thromb Vasc Biol.** (2006) 26:2421-2432
15. **Appelros P and cols.** Poor outcome after first-ever stroke. **Stroke.** (2003) 34:122-126.
16. **Arango D y cols.** Fisiopatología de la isquemia cerebral focal: aspectos básicos y proyección a la clínica. **Rev Neurol** (2004); 39 (2): 156-165

17. **Asano T and cols.** Ischemic Brain Edema Following Occlusion of the Middle Cerebral Artery in the Rat. II: Alteration of the Eicosanoid Synthesis Profile of Brain Microvessels. **Stroke** (1985)16;1.
18. **Back T and cols.** Lesion evolution in cerebral ischemia. *J Neurol* (2004) 251: 388–397.
19. **Ba□hr M.** (2004). **Neuroprotection models, mechanisms, and therapies.** Weinheim, Wiley-VCH. Capitulo 1. pag-5.
20. **Baird A.** The Forgotten Lymphocyte Immunity and Stroke. **Circulation** (2006)113;2035-2036
21. **Bakalash S and cols.** T-cell-based vaccination for morphological and functional neuroprotection in a rat model of chronically elevated intraocular pressure. **J Mol Med** (2005) 83: 904–916
22. **Baker J.** Symposia Nanotechnology and Medicine. **Chalmers J. Lyons Memorial Lecture.** October 13/2006.
23. **Barker C and Billingham R.** Immunologically privileged sites. **Adv. Immunol.** (1977) 25, 1–54
24. **Barouch R and Schwartz M.** Autoreactive T cells induce neurotrophin production by immune and neural cells in injured rat optic nerve: Implications for protective autoimmunity. **The FASEB Journal.** (2002)
25. **Barragán A and cols.** Dolor en adultos mayores de 50 años: prevalencia y factores asociados **Salud Publica Mex** (2007)49 suppl 4:S488-S494.
26. **Bath P and Lees K.** ABC of arterial and venous disease Acute stroke. **BMJ.** (2000); 320

27. **Becker K and cols.** Immunologic tolerance to myelin basic protein decreases stroke size after transient focal cerebral ischemia. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** (1997) 94;10873–10878
28. **Becker K and cols.** Adoptive Transfer of Myelin Basic Protein–Tolerized Splenocytes to Naive Animals Reduces Infarct Size. **Stroke.** (2003) 34:1809-1815.
29. **Bona E and cols.** Chemokine and inflammatory cell response to hypoxia-ischemia in immature rats. **PediatrRes**(1999) 45:500-9.
30. **Born W and cols.** Antigen specificity of  $\gamma$   $\delta$  T lymphocytes. **FASEBJ.** (1991)5: 2699-2705
31. **Brown R and Davis T.** Calcium Modulation of Adherens and Tight Junction Function. **Stroke.** (2002)33:1706-1711
32. **Brozici M and cols.** Anatomy and Functionality of Leptomeningeal Anastomoses. **Stroke.** (2003) 34:2750-2762
33. **Butcher SP and cols.** Correlation between amino acid release and neuropathologic outcome in rat brain following middle cerebral artery occlusion. **Stroke** (1990) 21;1727-1733
34. **Butovsky O and cols.** Glatiramer acetate fights against Alzheimer’s disease by inducing dendritic-like microglia expressing insulin-like growth factor 1. **PNAS.** (2006)103; 31 pp.11784–11789
35. **Campanella M and cols.** Flow Cytometric Analysis of Inflammatory Cells in Ischemic Rat Brain. **Stroke** (2002)33;586-592

36. **Casas J.** Meta-analysis of genetic studies in ischemic stroke. **Arch Neurol.** (2004) 61:1652-1662
37. **Castillo J.** Fisiopatología de la isquemia cerebral. **Rev Neurol.** (2000) 30,5: 459-464
38. **Castillo J y cols.** Revisión de consenso. Neuroprotección farmacológica en la isquemia cerebral: ¿es todavía una opción terapéutica? **Neurología** (2003); 18(7):368-384
39. **Chamorro A and Hallenbeck J.** The Harms and Benefits of Inflammatory and Immune Responses in Vascular disease. **Stroke.** (2006)37:291-293.
40. **Chan P.** (2002). **Cerebrovascular disease 22<sup>nd</sup> Princeton Conference** Capítulo IV pag. 113
41. **Chen H and cols.** Anti-CD11b monoclonal antibody reduces ischemic cell damage after transient focal cerebral ischemia in rat. **Ann Neurol** (1994) 35:458-463.
42. **Chen H and cols.** Reduction and Restoration of Mitochondrial DNA Content After Focal Cerebral Ischemia/Reperfusion. **Stroke** (2001)32:2382-2387
43. **Clark WM and cols.** Reduction of central nervous system ischemic injury by monoclonal antibody to intercellular adhesion molecule. **J Neurosurg** (1991)75:623-627.
44. **Clark WM and cols.** Time course of ICAM-1 expression and leukocyte subset infiltration in rat forebrain ischemia. **Mol Chem Neuropathol** (1995); 26:213-230.
45. **Cohen I and Schwartz M.** Autoimmune maintenance and neuroprotection of the central nervous system. **Journal of Neuroimmunology.** (1999)100; 111–114

46. **Colino A y cols.** Plasticidad sináptica a corto plazo. **Rev Neurol** (2002) 34: 593-9
47. **Cserr H and Knopf P.** Cervical lymphatics, the blood-brain barrier and the immunoreactivity of the brain: a new view. **Immunol. Today** (1992)13, 507–512
48. **Dancause N.** Vicarious function of remote cortex following stroke: recent evidence from human and animal studies. **Neuroscientist** (2006) 12;6:489–499,
49. **DeGraba TJ and cols.** Threshold of calcium disturbances after focal cerebral ischemia in rats. **Stroke.** (1993) 24; 1212-1216
50. **DeGraba TJ.** The role of inflammation after acute stroke: utility of pursuing anti-adhesion molecule therapy. **Neurology.** (1998); (Suppl 3): S62-S68.
51. **DeGraba TJ** Immunogenetic Susceptibility of Atherosclerotic Stroke. **Stroke.** (2004) 35[suppl I]:2712-2719.)
52. **De Vries and cols.** The Blood-Brain Barrier in Neuroinflammatory Diseases. **Pharmacological Reviews.** (1997) Vol. 49, No. 2.
53. **Dhal and cols.** Polymers as Drugs. **Adv Polym Sci** (2006) 192: 9–58
54. **Díaz A y cols.** Alteraciones en el movimiento tras accidente cerebrovascular en el hemicuerpo ipsilateral al hemisferio cerebral. **Rev Neurol** (2005) 41; 361-70
55. **Díez T y cols.** Clasificación de las enfermedades cerebrovasculares. **Rev Neurol** 2001; 33 (5): 455-464
56. **Dippel D and cols.** Effect of Paracetamol (Acetaminophen) on Body Temperature in Acute Ischemic Stroke. **Stroke.** (2001)32:1607-1612.

57. **Duda P and cols.** Glatiramer acetate (Copaxone®) induces degenerate, Th 2-polarized immune responses in patients with multiple sclerosis. **J. Clin. Invest.** (2000).105:967–976
58. **Duncan R.** Nanomedicines in action. **The Pharmaceutical Journal** (2004) Vol 273; 485-488
59. **Duncan R.** Nanomedicine gets clinical. **Nanotoday.**(2005)16-17
60. **Durukan A and Tatlisumak T.** Acute ischemic stroke: Overview of major experimental rodent models, pathophysiology, and therapy of focal cerebral ischemia. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior** 87 (2007) 179–197
61. **Dutka AJ and cols.** Influence of granulocytopenia on canine cerebral ischemia induced by air embolism. **Stroke** (1989)20:390-395.
62. **Dyker A and Lees K.** Duration of neuroprotective treatment for ischemic. **Stroke.** (1998) 29:535-542.
63. **Elkind M and cols.** Leukocyte count is associated with aortic arch plaque thickness. **Stroke.** (2002) 33:2587-2592
64. **Engelter S and cols.** Epidemiology of Aphasia Attributable to First Ischemic Stroke. **Stroke.** (2006) 37:1379-1384.
65. **Exel E and cols.** Inflammation and Stroke. **Stroke.** 2002; 33:1135-1138.
66. **Fisher M and Meiselman H.** Hemorheological factors in cerebral ischemia. **Stroke** (1991) 2:1164-1169
67. **Flobmann E and cols.** Systematic Review of Methods and Results of Studies of the Genetic Epidemiology of Ischemic Stroke. **Stroke.** (2004) 35:212-227

68. **Fox G and cols.** Anatomic Variation of the Middle Cerebral Artery in the Sprague-Dawley Rat. **Stroke.** (1993) 24:2087-2093
69. **Frenkel D and cols.** Nasal Vaccination with Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein Reduces Stroke Size by Inducing IL-10-Producing CD4<sup>+</sup> T Cells. **The Journal of Immunology,** (2004)172: 6549–6555.
70. **Fridkis-Hareli M,** Aharoni R, Teitelbaum D, Arnon R, Sela M, Strominger JL. Binding of random copolymers of three amino acids to class II MHC molecules. **Int Immunol.** (1999) 11:635-41
71. **Frijns C and Kappelle J.** Inflammatory Cell Adhesion Molecules in Ischemic Cerebrovascular Disease. **Stroke.** (2002) 33:2115-2122.
72. **Fukunaga T and cols.** Relation Between CD<sup>4</sup> T-Cell Activation and Severity of Chronic Heart Failure Secondary to Ischemic or Idiopathic Dilated Cardiomyopathy. **J Cardiol** (2007)100:483– 488
73. **Galea E and cols.** Intrinsic Regulation of Brain Inflammatory Responses. **Cellular and Molecular Neurobiology**(Vol. 23,4/5)
74. **Gee M and cols.** Lymphocytes. Potential Mediators of Postischemic Injury and Neuroprotection. **Stroke.** (2007);38[part 2]:783-788
75. **Gerriets T and cols.** The macrosphere model Evaluation of a new stroke model for permanent middle cerebral artery occlusion in rats. **Journal of Neuroscience Methods** 122 (2003) 201-211

76. **Gerriets T and cols.** Complications and Pitfalls in Rat Stroke Models for Middle Cerebral Artery Occlusion: A Comparison Between the Suture and the Macrosphere Model Using Magnetic Resonance Angiography. **Stroke.** (2004) 35;2372-2377
77. **Ginsberg MD and Busto R.** Rodent Models of Cerebral Ischemia. **Stroke** (1989) 20:1627-1642
78. **Ginsberg MD.** Adventures in the Pathophysiology of Brain Ischemia: Penumbra, Gene Expression, Neuroprotection. **Stroke.** (2003); 34:214-223.
79. **Giuliani F and cols.** Vulnerability of Human Neurons to T Cell-Mediated Cytotoxicity. **The Journal of Immunology.** (2003) 171: 368–379.
80. **Giulian F and cols.** Additive effect of the combination of glatiramer acetate and minocycline in a model of MS. **Journal of Neuroimmunology** 158 (2005) 213–221
81. **Giunti D and cols.** Phenotypic and functional analysis of T cells homing into the CSF of subjects with inflammatory diseases of the CNS. **Journal of Leukocyte Biology** (2003) 73; 584-590
82. **Glimcher L and Murphy K.** Lineage commitment in the immune system: the T helper lymphocyte grows up. **Genes & Development** (2000)14:1693–1711
83. **González A y cols.** Mecanismos inflamatorios, arteriosclerosis e ictus isquémico: datos de interés clínico y perspectivas. **Rev Neurol** (2002) 35;5: 452-462
84. **Gonzalez R.** Imaging-Guided Acute Ischemic Stroke Therapy: From “Time Is Brain” to “Physiology Is Brain”. **Am J Neuroradiol** (2006)27:728 –35

85. **Gorantla S and cols.** Modulation of Innate Immunity by Copolymer-1 Leads to Neuroprotection in Murine HIV-1 Encephalitis. **GLIA** (2008) 56:223–232
86. **Gorelick P.** Stroke prevention therapy beyond antithrombotics: unifying mechanisms in ischemic stroke pathogenesis and implications for therapy. **Stroke.** (2002)33:862-875.
87. **Grau A and cols.** Granulocyte adhesion, deformability, and superoxide formation in acute stroke. **Stroke** (1992) 23:33-39
88. **Grau A and cols.** Leukocyte count as an independent predictor of recurrent ischemic events. **Stroke** (2004) 35; 1147-1152.
89. **Gupta Y and cols.** Transient focal ischemia induces motor deficit but does not impair the cognitive function in middle cerebral artery occlusion model of stroke in rats. **Journal of the Neurological Sciences** (2002) 203; 204 267–271.
90. **Gusev E. I.,and Skvortsova V. I.** (2003). **Brain ischemia.** New York, Kluwer Academic/Plenum Publishers.Capitulo 9. pag 167
91. **Hackett M and cols.** Frequency of Depression After Stroke **Stroke.** (2005)36:1330-1340.).
92. **Hagens W and cols.** What do we (need to) know about the kinetic properties of nanoparticles in the body?. **Regulatory Toxicology and Pharmacology** (2007) 49; 217–229
93. **Hallenbeck J.** The many faces of tumor necrosis factor in stroke. **Nat.Med.** (2002) 8:1363.
94. **Hallenbeck J and cols.** Immunomodulation strategies for preventing vascular disease of the brain and heart. **Stroke.** (2006) 37:3035-3042

95. **Hauben E and cols.** Vaccination with Dendritic Cells Pulsed with Peptides of Myelin Basic Protein Promotes Functional Recovery from Spinal Cord Injury. **The Journal of Neuroscience.** (2003) 23; 25:8808–8819
96. **Heiss W.** Best Measure of Ischemic Penumbra: Positron Emission Tomography. **Stroke.** (2003) 34:2534–2535.)
97. **Hendrix S and Nitsch R.** The role of T helper cells in neuroprotection and regeneration. **Journal of Neuroimmunology** (2007) 184; 100–112
98. **Herreras O y Largo C.** Las huellas eléctricas en el camino hacia la muerte neuronal isquémica. **Rev Neurol** (2002); 35 (9): 838-845
99. **Horn J and Limburg M.** Calcium Antagonists for Ischemic Stroke. **Stroke.** (2001); 32:570-576.
100. **Hudecz F. (2001)** Design of synthetic branched chain polymeric polypeptides for targeting/delivering bioactive molecules. A. Aggeli et nl. (eds.), **Self-assembling Peptide Systems in Biology, Medicine and Engineering**, 139-160. Kluwer Academic Publishers. Printed in the Netherlands.
101. **Ivan C and cols.** Dementia after stroke. **Stroke.** (2004) 35:1264-1269.
102. **Jacob HJ and Kwitek AE.** Rat genetics: attaching physiology and pharmacology to the genome. **Nat Rev Genet.** (2002); 3:33–42.
103. **Jain K.** Role of nanotechnology in developing new therapies for diseases of the nervous system. **Nanomedicine** (2006) 1;9-12
104. **Jauch E and cols.** Association of Serial Biochemical Markers With Acute Ischemic Stroke. **Stroke** (2006) 37;2508-2513

105. **Jenkins M and Miller R.** Memory and anergy: challenges to traditional models of T lymphocyte differentiation. **FASEB J.** (1992) 6: 2428-2433.
106. **Jonuleit H and Schmitt E.** The Regulatory T Cell Family: Distinct Subsets and their Interrelations. **The Journal of Immunology.** (2003) 0022-1767
107. **Jood K and cols.** Family history in ischemic stroke before 70 years of age. **Stroke.** (2005) 36:1383-1387
108. **Kandel E y Schwartz.** (2001).**Principios de neurociencia.** Mc Graw Hill Volumen 1 Edición 4
109. **Kamada H and cols.** Influence of Hyperglycemia on Oxidative Stress and Matrix Metalloproteinase-9 Activation After Focal Cerebral Ischemia/Reperfusion in Rats. **Stroke.** (2007) 38:1044-1049
110. **Kim H and cols.** Type 2 Monocyte and Microglia Differentiation Mediated by Glatiramer Acetate Therapy in Patients with Multiple Sclerosis. **The Journal of Immunology.** (2004) 172: 7144–7153.
111. **Kipnis J and cols.** T cell immunity to copolymer 1 confers neuroprotection on the damaged optic nerve: Possible therapy for optic neuropathies. **PNAS** (2000) 97;13
112. **Kipnis J and cols.** Neuronal Survival after CNS Insult Is Determined by a Genetically Encoded Autoimmune Response. **The Journal of Neuroscience.** (2001) 21; 13:4564–4571
113. **Kipnis J and cols.** Myelin specific Th1 cells are necessary for post-traumatic protective autoimmunity. **Journal of Neuroimmunology** (2002) 130; 78–85

114. **Kipnis J and Schwartz M.** Dual action of glatiramer acetate (Cop-1) in the treatment of CNS autoimmune and neurodegenerative disorders. **Trends in Molecular Medicine** (2002) 8;7
115. **Kipnis J and cols.** Therapeutic vaccination for closed head injury. **J. Neurotrauma** (2003) 20, 559–569.
116. **Kipnis J and cols.** Loss of autoimmune T cells correlates with brain diseases: possible implications for schizophrenia? **Trends in Molecular Medicine.** (2006). Vol.12 No.3
117. **Kochanek P and Hallenbeck J.** Polymorphonuclear leukocytes and monocytes/macrophages in the pathogenesis of cerebral ischemia and stroke. **Stroke** (1992) 23:1367-1379.
118. **Kolominsky-Rabas P and cols.** Epidemiology of Ischemic Stroke Subtypes According to TOAST Criteria. **Stroke.** (2001) 32:2735-2740
119. **Kontos H.** Oxygen Radicals in Cerebral Ischemia: The 2001 Willis Lecture. **Stroke** (2001) 32;2712-2716
120. **Kostulas N and cols.** Increased IL-1 $\beta$ , IL-8, and IL-17 mRNA Expression in Blood Mononuclear Cells Observed in a Prospective Ischemic Stroke Study. **Stroke.** (1999)30; 2174-2179.
121. **Kostulas N and cols.** Dendritic Cells Are Present in Ischemic Brain After Permanent Middle Cerebral Artery Occlusion in the Rat. **Stroke** (2002)33; 1129-1134.
122. **Krieger D and Yenari M.** Therapeutic Hypothermia for Acute Ischemic Stroke. **Stroke.** (2004);35:1482-1489

123. **Kristian T and Siesjo B.** Calcium in Ischemic Cell Death. **Stroke.** (1998) 29:705-718.
124. **Lakkis F and Sayegh M.** Memory T Cells: A Hurdle to Immunologic Tolerance. **J Am Soc Nephrol** (2003)14: 2402–2410
125. **Lee G and cols.** Drug Transporters in the Central Nervous System: Brain Barriers and Brain Parenchyma Considerations. **Pharmacol Rev** (2001) 53:569–596,
126. **Lee J and cols.** Brain tissue responses to ischemia. **The Journal of Clinical Investigation.** (2000) 106;6
127. **Leinonen J and cols.** Low plasma antioxidant activity is associated with high lesion volume and neurological impairment in stroke. **Stroke.** (2000) 31:33-39.
128. **Leker R and Shohami E** Cerebral ischemia and trauma—different etiologies yet similar mechanisms: neuroprotective opportunities. **Brain Research Reviews** (2002) 39; 55–73.
129. **Levy M and cols.** (2006). **Berne y Levy fisiología.** Madrid, España, Elsevier. Capitulo XXV. pág. 339
130. **Liebeskind D.** Collateral Circulation. **Stroke** (2003) 34;2279-2284.
131. **Lin J and cols.** T cells support brain plasticity and cognition. **Brain, Behavior, and Immunity.** Abstracts. (2006) e34–e45
132. **Linden T and cols.** Depressive Disorders After 20 Months in Elderly Stroke Patients. **Stroke.** (2007)38:1860-1863.
133. **Lindsberg P and Grau A.** Inflammation and Infections as Risk Factors for Ischemic Stroke. **Stroke.** (2003) 34:2518-2532

134. **Lipscomb M and Masten B.** Dendritic Cells: Immune Regulators in Health and Disease. **Physiol Rev** (2002) 82:97-130
135. **Liu J and cols.** T-Cell-Independent Neuroprotective Effects of Glatiramer Acetate. **J.Clim. Abstracts** (2006).04.236
136. **Liu J and cols.** T cell independent mechanism for copolymer-1-induced neuroprotection. **Eur. J. Immunol.**(2007). 37: 3143–3154
137. **López A.** (2003) **Anatomía funcional del Sistema Nervioso. Capítulo 1, 2, 3, 18,26**, UTEHA Noriega Editores. México. 10ª Reimpresión.
138. **López HE y cols.** Cerebral ischemia: some secondary alterations and animal models. **Arch Neurocién (Mex)** (2005) Vol.10, N3; 160-167.
139. **Lukic-Panin V and cols.** Prevention of neuronal damage by calcium channel blockers with antioxidative effects after transient focal ischemia in rats. **Brain Research** (2007) 1176; 143 – 150
140. **Marleau A and Sarvetnick N.** T cell homeostasis in tolerance and immunity. **J. Leukoc. Biol.** (2005.) 78: 575–584
141. **Matsumoto T and cols.** Prevention of cerebral edema and infarct in cerebral reperfusion injury by an antibody to interleukin-8. **Lab Invest** (1997)77:119-125.
142. **Matsumoto Y and cols.** Immunohistochemical analysis of the rat central nervous system during experimental allergic encephalomyelitis, with special reference to Ia-positive cells with dendritic morphology. **J. Immunol.** (1986) 136, 3668–3676.

143. **Meisel C and cols.** Preventive Antibacterial Treatment Improves the General Medical and Neurological Outcome in a Mouse Model of Stroke. *Stroke*. (2004)35:2-6.
144. **Meschia J.** Clinically translated ischemic stroke genomics. *Stroke*. (2004) 35[suppl I]:2735-2739.
145. **Moalem G and cols.** Differential T cell response in central and peripheral nerve injury: connection with immune privilege. *The FASEB Journal*. (1999) Vol. 13.
146. **Moalem, G. and cols.** Autoimmune T cells protect neurons from secondary degeneration after central nervous system axotomy. *Nat. Med.* (1999) 5, 49–55
147. **Mosmann and cols.** Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol*. (1986) 136, 2348–2357.
148. **Muldoon L and cols.** Imaging and Nanomedicine for Diagnosis and Therapy in the Central Nervous System: Report of the Eleventh Annual Blood-Brain Barrier Disruption Consortium Meeting. *Am J Neuroradiol*. (2006) 27:715–21
149. **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)
150. **Nadareishvili Z and cols.** Elevated pro-inflammatory CD4<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> lymphocytes and stroke recurrence and death. *Neurology*. (2004) 63; 1446-1451.
151. **Netter, F. H., Brass, A., & Latorre Murillo, P.** (1987). Colección Netter de ilustraciones medicas. Barcelona, Masson. Seccion III pag 58

152. **Neuhaus O and cols.** Pharmacokinetics and pharmacodynamics of the interferon-betas, glatiramer acetate, and mitoxantrone in multiple sclerosis. **Journal of the Neurological Sciences** (2007) 259; 27–37
153. **Nogueira R and cols.** Low-pressure balloon angioplasty with adjuvant pharmacological therapy in patients with acute ischemic stroke caused by intracranial arterial occlusions. **Neuroradiology** (2007). Trabajo presentado en la American Society of Interventional and Therapeutic Neuroradiology del tercer curso anual en Puerto Rico (2006)
154. **North K and cols.** Hemiplegia Due to Posterior Cerebral Artery Occlusion. **Stroke.** (1993) 24:1757-1760.
155. **Offner H and cols.** Splenic Atrophy in Experimental Stroke Is Accompanied by Increased Regulatory T Cells and Circulating Macrophages. **The Journal of Immunology** (2006) 176: 6523–6531.
156. **Offner H and cols.** Experimental stroke induces massive, rapid activation of the peripheral immune system. **Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism** (2006) 26, 654–665.
157. **Ohta M and cols.** Clinical and Analytical Evaluation of an Enzyme Immunoassay for Myelin Basic Protein in Cerebrospinal Fluid. **Clinical Chemistry** (2000)46:9 1326–1330
158. **Okada Y and cols.** P-selectin and intercellular adhesion molecule-1 expression after focal brain ischemia and reperfusion. **Stroke** (1994)25:202-211.
159. **O'Rourke F and cols.** Current and future concepts in stroke prevention. **CMAJ** (2004) 30;170-7.

160. **Pantano P and cols.** Motor recovery after stroke. **Brain** (1996), 119, 1849-1857
161. **Pantoni L and cols.** Cytokines and cell adhesion molecules in cerebral ischemia. **Arterioscler Thromb Vasc Biol.** (1998) 18:503-513
162. **Pan W and Kastin A.** Tumor necrosis factor and stroke: Role of the blood–brain barrier. **Progress in Neurobiology.** (2007) Article in press
163. **Parathath S and cols.** Nitric oxide mediates neurodegeneration and breakdown of the blood-brain barrier in tPA-dependent excitotoxic injury in mice. **Journal of Cell Science** (2006)119, 339-349.
164. **Parronchi P and cols.** Allergen- and bacterial antigen-specific T-cell clones established from atopic donors show a different profile of cytokine production. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** (1991) 88, 4538–4542.
165. **Phan T and cols.** A Digital Map of Middle Cerebral Artery Infarcts Associated With Middle Cerebral Artery Trunk and Branch Occlusion. **Stroke.** (2005);36:986-991.
166. **Prass K and cols.** Stroke-induced Immunodeficiency Promotes Spontaneous Bacterial Infections and Is Mediated by Sympathetic Activation Reversal by Poststroke T Helper Cell Type 1–like Immunostimulation. **J. Exp. Med.** (2003) 198;5, 725–736.
167. **Prat A and cols.** Th1 and Th2 lymphocyte migration across the human BBB is specifically regulated by interferon  $\beta$  and copolymer-1. **Journal of Autoimmunity** 24 (2005) 119-124
168. **Price C and cols.** Human cellular inflammation in the pathology of acute cerebral ischaemia. **J Neurol Neurosurg Psychiatry.** (2003)74:1476–1484

169. **Price C and cols.** Cerebral Neutrophil Recruitment, Histology, and Outcome in Acute Ischemic Stroke. **Stroke.** (2004) 35:1659-1664
170. **Price C and cols.** Intrinsic Activated Microglia Map to the Peri-infarct Zone in the Subacute Phase of Ischemic Stroke. **Stroke.** (2006) 37:1749-1753.
171. **Ramírez EM y Martínez MJ.** Bases moleculares de los procesos neurodegenerativos en el sistema nervioso central. **Rev Neurol** (1998); 26 (149): 91-100
172. **Reese T and Karnovsky J.** Fine structural localization of a blood-brain barrier to exogenous peroxidase. **J Cell Biol.** (1967)34, 207–217
173. **Reynolds K and cols.** Alcohol consumption and risk of stroke. **JAMA.** (2003) 289;579-588
174. **Roda JM y cols.** Modelos animales experimentales en isquemia cerebral. **Neurologia.** Vol. 13 Numero 9 Noviembre (1998)
175. **Rodríguez Y y Suárez L.** Activación de la célula T en la encefalomiелitis autoinmune experimental y esclerosis múltiple. **Rev Neurol** (2003) 36;7: 649-652
176. **Roitt I and cols.** (1996) T cell Receptors and MHC molecules. En: **Immunology,** 4a edición, ed. Mosby, Barcelona, Spain.
177. **Rosamond W and cols.** Heart Disease and Stroke Statistics (2007). A Report From the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. **Circulation.** (2008)117xx
178. **Sánchez CJ.** El área de penumbra. **Rev Neurol** (1999) 28; 8: 810-816.
179. **Scheindlin S.** Copolymer 1: An Off-Beat Drug Development Story. **Molecular Interventions.** (2004). Volume 4, Issue 1.

180. **Schroeter M and cols.** Local immune responses in the rat cerebral cortex after middle cerebral artery occlusion. **J Neuroimmunol.** (1994); 55(2):195-203.
181. **Schultzberg M and cols.** Inflammation in the nervous system — Physiological and pathophysiological aspects. **Physiology & Behavior**(2007) 92; 121–128
182. **Schurer L and cols.** Effects of neutrophil depletion and superoxide dismutase on postischemic hypoperfusion of rat brain. **Adv Neurol.** (1990) 52:57-62.
183. **Schwab JM and cols.** Human focal cerebral infarctions induce differential lesional interleukin-16 (IL-16) expression confined to infiltrating granulocytes, CD8+ T-lymphocytes and activated microglia/macrophages. **J Neuroimmunol** (2001) 114 :232-41
184. **Schwartz M and cols.** Innate and adaptive immune responses can be beneficial for CNS repair. **Trends Neurosci.** (1999) 22, 295-299
185. **Schwartz M.** Physiological Approaches to Neuroprotection: Boosting of Protective Autoimmunity. **Survey of ophthalmology** (2001) Vol 45 supplement 3 (a)
186. **Schwartz M and Kipnis J.** Protective autoimmunity: regulation and prospects for vaccination after brain and spinal cord injuries. **TRENDS in Molecular Medicine** (2001) 7;6 (b)
187. **Schwartz M and cols.** Protective autoimmunity against the enemy within: fighting glutamate toxicity. **Trends in Neurosciences.** (2003) 26;6
188. **Schwartz M and Kipnis J.** Self and non-self discrimination is needed for the existence rather than deletion of autoimmunity: the role of regulatory T cells in protective autoimmunity. **CMLS Cell. Mol. Life Sci.** (2004) 61; 2285–2289

189. **Schwartz M and Kipnis J.** Protective autoimmunity and neuroprotection in inflammatory and noninflammatory neurodegenerative diseases. **Journal of the Neurological Sciences** (2005) 233; 163 – 166
190. **Schwid S and cols.** Cognitive function in relapsing multiple sclerosis: Minimal changes in a 10-year clinical trial. **Journal of the Neurological Sciences** (2007) 255 57–63.
191. **Secher N and Quistorff B.** Brain glucose and lactate uptake during exhaustive exercise. **J. Physiol.** (2005);568;3
192. **Seitz R and cols.** Role of the premotor cortex in recovery from middle cerebral artery infarction. **Arch Neurol.** (1998) 55;1081-1088.
193. **Shaked I and cols.** Early activation of microglia as antigen-presenting cells correlates with T cell-mediated protection and repair of the injured central nervous system. **Journal of Neuroimmunology** (2004)146; 84–93
194. **Small D and Buchan A.** Animal models. **British Medical Bulletin.** (2000) 56 (No 2) 307-317
195. **Soriano SG and cols.** Intercellular adhesion molecule-1-deficient mice are less susceptible to cerebral ischemia-reperfusion injury. **Ann Neurol** (1996)39:618-624.
196. **Stansbury J and cols.** Ethnic Disparities in Stroke. **Stroke.** (2005) 36:374-387.
197. **Stein C. and Schafer M.** (2003). **Mind over matter regulation of peripheral inflammation by the CNS.** Basel;Boston, Birkhäuser Verlag. Capitulo 1 pág. 9-11

198. **Stevens SL and cols.** The use of flow cytometry to evaluate temporal changes in inflammatory cells following focal cerebral ischemia in mice. *Brain Res.* (2002); 932(1-2):110-9.
199. **Stolyarov I and cols.** The Problem of Neuroimmunotherapy of Nervous Diseases. **HUMAN PHYSIOLOGY.** (2002) Vol. 28 No. 2
200. **Strand T and cols.** Brain and plasma proteins in spinal fluid as markers for brain damage and severity of stroke. **Stroke.** (1984) 15; 138-144
201. **Strauss K.** Antiinflammatory and neuroprotective actions of COX-2 inhibitors in the injured brain. **Brain, Behavior, and Immunity.** (2007). xx-xx
202. **Stoll G and Bendszus M.** Inflammation and atherosclerosis Novel insights into plaque formation and destabilization. **Stroke.** (2006)37:1923-1932.
203. **Stumm RK and cols.** A dual role for the SDF-1/CXCR4 chemokine receptor system in adult brain: isoform-selective regulation of SDF-1 expression modulates CXCR4-dependent neuronal plasticity and cerebral leukocyte recruitment after focal ischemia. **J Neurosci** (2002) 22: 5865-78
204. **Stüve O and cols.** Immunomodulatory synergy by combination of atorvastatin and glatiramer acetate in treatment of CNS autoimmunity. **The Journal of Clinical Investigation.** (2006) 116; 4 pág. 1037-1044
205. **Tamayo L. y Duque J.** Regulación metabólica de la microcirculación cerebral. **Rev Neurol** (2007) 44: 415-25
206. **Tamura A and cols.** Focal cerebral ischemia in the rat: Description of technique and early neuropathological consequences following middle cerebral artery occlusion. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism* (1981) 1;1:53-60

207. **Tarkowski E and cols.** Lateralization of T-Lymphocyte Responses in Patients With Stroke. **Stroke.** (1995)26:57-62
208. **Teitelbaum D and cols.** Specific inhibition of the T-cell response to myelin basic protein by the synthetic copolymer Cop 1. **Proc. Natl. Acad. Sci.** (1988) 85, pp. 9724-9728
209. **Teitelbaum D and cols.** Immunomodulation of experimental autoimmune encephalomyelitis by oral administration of copolymer 1. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** (1999) Vol. 96, pp. 3842–3847
210. **Timiras S y cols.** (1997). Bases fisiológicas del envejecimiento y geriatría. **Parte III. Envejecimiento sistémico y del cerebro.** Barcelona, Masson. pág. 121.
211. **Toshima Y and cols.** A New Model of Cerebral Microthrombosis in Rats and the Neuroprotective Effect of a Rho-Kinase Inhibitor. **Stroke.** (2000); 31:2245-2250
212. **Touze E and cols.** Sex Differences in Heritability of Ischemic Stroke. **Stroke.** (2008); 39:16-23.
213. **Tracey K.** Physiology and immunology of the cholinergic antiinflammatory pathway. **The Journal of Clinical Investigation.** (2007) 117;2
214. **Tsomides T and Eisen H.** Antigenic Structures Recognized by Cytotoxic T Lymphocytes. **The Journal of Biological Chemistry.** (1991) Vol. 266, No. 6, pp. 3357-3360,
215. **Tsuchida T and cols.** Autoreactive CD8<sup>+</sup> T-cell responses to human myelin protein-derived peptides. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** (1994)91; 10859-10863
216. **Unanue E and Cerottini J.** Antigen presentation. **FASEB J.** (1989) 3: 2496-2502

217. **Valverde F.** Estructura de la corteza cerebral.Organización intrínseca y análisis comparativo del neocórtex **Rev Neurol** (2002) 34; 8: 758-780
218. **Vargas M and cols.** Clinical Consequences of Infection in Patients With Acute Stroke. **Stroke.** (2006) 37:461-465
219. **Velázquez MO y cols.** Morbilidad y mortalidad de la enfermedad isquémica del corazón y cerebrovascular en México. (2005). **Archivos de cardiología de México. Vol. 77 Número 1/Enero-Marzo 2007:31-39**
220. **Vieira P and cols.** Glatiramer Acetate (Copolymer-1, Copaxone) Promotes Th2 Cell Development and Increased IL-10 Production Through Modulation of Dendritic Cells. **The Journal of Immunology.** (2003), 170: 4483–4488.
221. **Vigouroux S and cols.** Antigen-induced regulatory T cells. **Blood.** (2004)104:26-33
222. **Vila N and cols.** Cytokine-induced inflammation and long-term stroke functional outcome. **Journal of the Neurological Sciences** (1999)162; 185–188
223. **Vila N and cols.** Levels of Anti-Inflammatory Cytokines and Neurological Worsening in Acute Ischemic Stroke. **Stroke.** (2003) 34:671-675.
224. **Vila N and cols.** Of anti-inflammatory cytokines and neurological worsening in acute ischemic stroke. **Stroke.** (2003) 34:671-675
225. **Wahl F and cols.** Neurological and behavioral outcomes of focal cerebral ischemia in rats. **Stroke** (1992) 23:267-272
226. **Wang D and cols.** A Genome-Wide Scan for Carotid Artery Intima-Media Thickness. **Stroke.** (2005); 36:540-545.

227. **Wang Q and cols.** The inflammatory response in stroke. **Journal of Neuroimmunology** 184 (2007) 53–68
228. **Wang W and cols.** Myelin antigen reactive T cells in cerebrovascular diseases. **Clin. Exp. Immunol.** (1992) 88, 157–162.
229. **Wang X and cols.** CD<sup>44</sup> deficiency in mice protects brain from cerebral ischemia injury. **J Neurochem.** (2002) 83(5):1172-9.
230. **Ward N and Cohen L.** Mechanisms Underlying Recovery of Motor Function After Stroke. **Arch Neurol.** (2004) 61:1844-1848
231. **Warnock M and Goodacre J.** Cryptic T-cell epitopes and their role in the pathogenesis of autoimmune diseases. **British Journal of Rheumatology.** (1997)36:1144-115
232. **Weiner H and Selkoe D.** Inflammation and therapeutic vaccination in CNS diseases. **NATURE.** (2002) Vol.420. págs. 879-884
233. **Wekerle H and cols.** Immune reactivity in the nervous system: modulation of T-Lymphocyte activation by glial cells. **J.Exp.Biol.** (1987)132, 43-57
234. **Wilbanks G. and Streilein J.** Fluids from immune privileged sites endow macrophages with the capacity to induce antigen-specific immune deviation via a mechanism involving transforming growth factor-beta. **Eur. J. Immunol.** (1992) 22, 1031–1036
235. **Wolinsky J and cols.** Glatiramer Acetate in primary progressive multiple sclerosis: results of a multinational, multicenter, double-blind, placebo-controlled trial. **Ann Neurol** (2007) 61:14–24

236. **Wong K and cols.** Progression of Middle Cerebral Artery Occlusive Disease and Its Relationship with Further Vascular Events after Stroke. **Stroke** (2002) 33;532-536
237. **Worp H and cols.** Hypothermia in animal models of acute ischaemic stroke: a systematic review and meta-analysis. **Brain** (2007)
238. **Wucherpfennig K.** Autoimmunity in the central nervous system: mechanisms of antigen presentation and recognition. **Clin. Immunol. Immunopathol.** (1994) 72, 293–306
239. **Yaniv Z and cols.** A Novel Immune-Based Therapy for Stroke Induces Neuroprotection and Supports Neurogenesis. **Stroke.** (2007) 38[part 2]:774-782.
240. **Yenari M and cols.** Microglia Potentiate Damage to Blood–Brain Barrier Constituents. **Stroke.** (2006) 37:1087-1093
241. **Yilmaz G and cols.** Role of T Lymphocytes and Interferon- $\gamma$  in Ischemic Stroke. **Circulation.** (2006); 113:2105-2112.
242. **Yoles E and cols.** Protective Autoimmunity Is a Physiological Response to CNS Trauma. **The Journal of Neuroscience.**(2001), 21(11):3740–3748
243. **Young MJ,** Bresnitz EA, Strom BL. Sample size nomograms for interpreting negative clinical studies. **Ann Int Med** (1983) 99: 248-251.
244. **Yu Q and cols.** A role for T lymphocytes in mediating cardiac diastolic function. **Am J Physiol Heart Circ Physiol** (2005)289
245. **Zamvil S and cols.** Encephalitogenic T cell clones specific for myelin basic protein. **J. Exp. Med.** (1985) 162; 2107-2124.

246. **Zarranz J.** (2003). Neurología. Madrid, Harcourt Brace. Enfermedades Vasculares Cerebrales. pág. 362
247. **Zausinger S and cols.** Anesthetic methods in rats determine outcome after experimental focal cerebral ischemia: mechanical ventilation is required to obtain controlled experimental conditions. **Brain Research Protocols.** (2002) 9112–121
248. **Zea Longa E and cols.** Reversible Middle Cerebral Artery Occlusion Without Craniectomy in Rats. **Stroke** (1989) 20:84-91
249. **Zhai QH and cols.** 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** (1997) 25;152:119-24.
250. **Zhang RL and cols.** Anti-ICAM-1 antibody reduces ischemic cell damage after transient middle cerebral artery occlusion in the rat. **Neurology** (1994) 44:1747-1751
251. **Ziemssen T and cols** Glatiramer acetate-specific Thelper 1- and 2-type cell lines produce BDNF: implications for multiple sclerosis therapy. **Brain** (2002), 125, 2381- 2391
252. **Ziv Y and cols.** A Novel Immune-Based Therapy for Stroke Induces Neuroprotection and Supports Neurogenesis. **Stroke.** (2007); 38[part 2]:774-782.