



DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

“CORRELACIÓN ENTRE LOS CAMBIOS MICROAMBIENTALES Y CELULARES EN LOS PLEXOS COROIDEOS CON LA NEUROGÉNESIS INDUCIDA POR COP-1 EN UN MODELO DE ISQUEMIA CEREBRAL FOCAL CON REPERFUSIÓN.”

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

DOCTORA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

PRESENTA:

M. EN BIOL. EXP. MARÍA YOLANDA CRUZ MARTÍNEZ

DIRECTORES DE TESIS:

DR. JOSÉ JUAN ANTONIO IBARRA ARIAS

DRA. HERLINDA BONILLA JAIME

ASESOR

DR. JULIO CÉSAR ROJAS CASTAÑEDA

CDMX, diciembre del 2019

El Doctorado en Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al Padrón de Posgrados de Excelencia del CONACyT y cuenta con apoyo del mismo Consejo, con el convenio PFP-20-93.

LUGAR DE REALIZACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN:

Este trabajo se desarrolló en los laboratorios de investigación de la Universidad Anáhuac México, en el laboratorio de Inmunología del Hospital de Pediatría de Centro Médico Nacional Siglo XXI y en las instalaciones de los Laboratorios de Biología de la Reproducción y de Inmunodeficiencias del Instituto Nacional de Pediatría.

Durante la realización del proyecto recibí apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), con número de becario 224657.

MIEMBROS DEL JURADO

Los miembros del jurado fueron designados por el Posgrado en Ciencias Biológicas y de la Salud, los abajo firmantes aprobaron la tesis **“Correlación entre los cambios microambientales y celulares en los plexos coroideos con la neurogénesis inducida por Cop-1 en un modelo de isquemia cerebral focal con reperusión.”** Presentada por la alumna **María Yolanda Cruz Martínez** con fecha de presentación para obtener el grado de Doctora el día 12 de diciembre del 2019, en las instalaciones de la Universidad Nacional Autónoma Metropolitana.

Dra. Herlinda Bonilla Jaime
Presidente

Dr. Julio César Rojas Castañeda
Secretario

Dr. José Juan Antonio Ibarra Arias
Vocal

Dra. Fausto Sánchez Muñoz
Vocal

Dra. Roxana Haydee Rodríguez Barrera
Vocal

AGRADECIMIENTOS

A mi familia, porque siempre ha estado apoyándome en todo momento. Especialmente a Fernanda por su tolerancia y amor, a mi madre y a Lalo por su gran paciencia y apoyo. A Maguito, que sin ella las microfotografías no hubieran quedado tan bonitas; a Rosita por contagiarme su fortaleza.

Al Dr. Ibarra por permitirme continuar trabajando en su laboratorio, por tenerme confianza y por darme palabras de aliento y serenidad en el momento indicado. A la Dra. Herlinda y al Dr. Julio por darme su apoyo y confianza.

Al Dr. Raúl Silva por facilitarme trabajar en Centro Médico; a todos mis compañeros y amigos de laboratorio que siempre han estado presentes y que sin ellos este trabajo no hubiera sido posible: Elisa, Roxana, Adrián, Vane, Stella, Melanie e Isa.

A las personas que trabajan en la Universidad Anáhuac por apoyarme siempre que necesité algo, especialmente a: Mauricio, Oscar, Miriam y Martín, por su gran ayuda y valiosos consejos

A mi amiga Gina, que siempre ha estado presente en todo momento.

Mil gracias.

ABREVIATURAS

ABREVIATURA	TÉRMINO
ACA	Arteria cerebral anterior
ACE	Arteria carótida externa
ACF	Adjuvante completo de Freund
ACM	Arteria cerebral media
ACV	Accidente cerebrovascular
ASIC	Canales iónicos sensibles a ácido
ATP	Adenosin trifosfato
BDNF	Factor neurotrófico derivado del cerebro
BHE	Barrera hematoencefálica
BHE-LCR	Barrera hematoliquoral
BLBP	Proteína de unión a los lípidos del cerebro
BO	Bulbo olfatorio
BrdU	5-bromo-2'-deoxiuridina
CCL5	Quimiocina RANTES
CD	Células dendríticas
Cop-1	Copolimero 1
COX	Ciclooxygenasa
CPA's	Células presentadoras de antígeno
CXCL4	Factor plaquetario 4
DAMPS	Patrones moleculares asociados al daño
DCX	Proteína Doublecortina
EAE	Encefalomiелitis autoinmune experimental
ECV	Enfermedad vascular cerebral
EGFR	Receptor del factor de crecimiento epidérmico
eNOS	Óxido nítrico sintasa endotelial
FDA	Food and Drug Administration
FGF-2	Factor de crecimiento de fibroblastos 2
GD	Giro dentado
GFAP	Proteína ácida glial-fibrilar
GLAST	Transportador de aspartato de glutamato
ICAM-1	Moléculas de adhesión intercelular 1
ICD-11	Clasificación Internacional de enfermedades 11
IGF-1	Factor de crecimiento parecido a la insulina tipo 1
IGF-2	Factor de crecimiento parecido a la insulina tipo 2
IL	Interleucina
INF-γ	Interferón gamma
iNOS	Óxido nítrico sintasa
LCR	Líquido cefalorraquídeo
LDL	Lipoproteína de baja densidad

MHCII	Complejo principal de histocompatibilidad tipo II
MMP	Metaloproteinasas de matriz
MOG	Proteína de oligodendrocito de mielina
NeuN	Núcleo neuronal
nNOS	Óxido nítrico sintasa neuronal
NOS	Óxido nítrico sintasa inducible
NSC	Células madre/progenitoras neurales
NT-3	Neurotrofina 3
OACM	Obstrucción de la arteria cerebral media
OMS	Organización mundial de la salud
ON	Óxido nítrico
PBM	Proteína básica de la mielina
PC	Plexo coroideo
PRR	Receptores de patrones de reconocimiento
PSA-NCAM	Molécula de adhesión de células neurales polisializada
PSGL-1	ligando P-selectina glucoproteína-1
RNS	Especies reactivas de nitrógenos
ROS	Especies reactivas de oxígeno
SC	Interescapular
SD	Desviación estándar
Shh	Sonic hedgehog
SN	Sistema nervioso
SNC	Sistema nervioso central
SOD	Superóxido dismutasa
Sox2	Factor de transcripción que permite la autorrenovación de células madre
SS	Solución salina
TGF-β	Factor de crecimiento transformante tipo beta
TNF-α	Factor de necrosis tumoral- α
TNK	Linfocitos T natural killers
VCAM-1	Moléculas de adhesión de células vasculares 1
VEGF	Factor de crecimiento vascular endotelial
ZSG	Zona subganular
ZSV	Zona subventricular

RESUMEN

El proceso inflamatorio que se desata después de un evento isquémico se ha asociado al incremento del daño en el tejido neural; sin embargo, en los últimos años se ha observado que también participa en mecanismos de protección y restauración del tejido lesionado a través de su estimulación con péptidos neurales modificados como el copolimero-1 también llamado Cop-1.

Cop-1, es un péptido que ha evidenciado ejercer neuroprotección e inducir la neurogénesis en el modelo de isquemia cerebral, pero poco se sabe acerca de su mecanismo y el efecto que ejerce sobre los plexos coroideos, los cuales son una interfaz que media la comunicación entre el sistema inmune y el sistema nervioso central en la cual se regulan procesos fisiológicos como la neurogénesis. Es por ello que se investigó cuál es el efecto que tiene la inmunización con Cop-1 sobre los linfocitos y el microambiente en los plexos coroideos y si éste interviene sobre la neurogénesis después de un evento isquémico.

Para analizarlo, primero se evaluó la neurogénesis en la zona subventricular y zona subgranular del hipocampo en ratas a 14 días post isquemia; para ello, se cuantificaron las células BrdU+/DCX+ utilizando la técnica de inmunofluorescencia; después se evaluó la expresión génica de citocinas (IL-4, IL-10, IL-1 β , TNF- α , INF- γ e IL-17) y factores de crecimiento (BDNF, IGF-1 y NT-3) en los plexos coroideos a través de la técnica PCR-tiempo real; posteriormente, se cuantificaron los linfocitos presentes en el líquido cefalorraquídeo (LCR) a través de citometría de flujo para finalmente analizar la correlación con la neurogénesis.

Los resultados obtenidos en este trabajo muestran un incremento significativo de la neurogénesis en las ratas inmunizadas con Cop-1 en los dos sitios evaluados, una mayor expresión génica significativa de los factores de crecimiento e IL-10; además, un aumento significativo de los linfocitos T CD8+ en el LCR; mostrando una correlación importante con la expresión de factores de crecimiento y éstos con la neurogénesis.

ABSTRACT

The inflammatory process that is unleashed after an ischemic event has been associated with increased damage to the neural tissue; however, in recent years it has been observed that it also participates in mechanisms of protection and restoration of injured tissue through its stimulation with modified neural peptides such as copolymer-1 also called Cop-1.

Cop-1 is a peptide that has been shown to exert neuroprotection and induce neurogenesis in the cerebral ischemia model, but little is known about its mechanism and the effect it has on the choroid plexuses, which are an interface that mediates communication between the immune system and the central nervous system in which physiological processes such as neurogenesis are regulated. That is the reason we investigate the effect of immunization with Cop-1 on lymphocytes and the microenvironment in the choroid plexuses and its intervention on neurogenesis after an ischemic event.

To analyze it, neurogenesis was first evaluated in the subventricular and subgranular areas of the hippocampus in rats at 14 days post-ischemia; for this, the BrdU + / DCX + cells were quantified using the immunofluorescence technique; then the cytokine gene expression (IL-4, IL-10, IL-1 β , TNF- α , INF- γ and IL-17) and growth factors (BDNF, IGF-1 and NT-3) were evaluated in the choroid plexuses through the real-time PCR technique; subsequently, lymphocytes present in cerebrospinal fluid (CSF) were quantified through flow cytometry to finally analyze the correlation with neurogenesis.

The results obtained in this work show a significant increase in neurogenesis in rats immunized with Cop-1 at the two sites evaluated, a greater significant gene expression of growth factors and IL-10, and also a significant increase in lymphocytes T CD8 + in the CSF; which showed an important correlation with the expression of growth factors and these with neurogenesis.

ÍNDICE

LUGAR DE REALIZACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN:	II
MIEMBROS DEL JURADO	III
AGRADECIMIENTOS	IV
ABREVIATURAS.....	V
RESUMEN	VII
ABSTRACT	VIII
ÍNDICE	IX
1. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES.....	1
1.1 ENFERMEDAD VASCULAR CEREBRAL	1
1.1.2 <i>Epidemiología</i>	2
1.1.3 <i>Etiología y factores de riesgo del Accidente Cerebro Vascular</i>	5
1.1.4 <i>Fisiopatología de la Isquemia Cerebral</i>	7
1.1.4.1 <i>Cascada Isquémica</i>	8
1.1.4.2 <i>Inflamación post isquemia</i>	13
1.1.5 <i>Plexos coroideos</i>	20
1.1.5.1 <i>Plexos coroideos en la isquemia cerebral</i>	25
1.2 NEUROGÉNESIS EN LA ETAPA ADULTA.....	26
1.2.1 <i>Neurogénesis en la ZSV</i>	27
1.2.2 <i>Neurogénesis en la ZSG</i>	31
1.2.3 <i>Regulación de la neurogénesis</i>	33
1.2.4. <i>Neurogénesis y Plexos coroideos</i>	35
1.3 AUTORREACTIVIDAD PROTECTORA	37
1.3.1 <i>Copolímero-1</i>	39
1.3.2 <i>Cop-1 y la neurogénesis en isquemia cerebral</i>	41
2. JUSTIFICACIÓN	42
3. PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN	43

4. HIPÓTESIS	43
5. OBJETIVO GENERAL	44
5.1 Objetivos particulares.....	44
6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	45
6.1 DISEÑO EXPERIMENTAL	45
6.1.2 Dosis y tratamiento	46
6.1.3 Modelo quirúrgico de isquemia cerebral	46
6.1.3.1 Evaluación neurológica.	46
6.1.4 Cuantificación celular del LCR por citometría de flujo.	47
6.1.5 Caracterización del microambiente.	48
6.1.6 Evaluación de la neurogénesis	51
6.1.7 Método estadístico.....	52
7. RESULTADOS	53
7.1 COP-1 PROMUEVE LA RECUPERACIÓN NEUROLÓGICA DESPUÉS DE LA ISQUEMIA	53
7.2 LA INMUNIZACIÓN CON COP-1 INCREMENTA LA NEUROGÉNESIS EN LA ZSV Y ZSG.....	54
7.3 LA INMUNIZACIÓN CON COP-1 INCREMENTA LA EXPRESIÓN RELATIVA DE IL-10 EN LOS PLEXOS COROIDEOS DESPUÉS DE LA ISQUEMIA.	57
7.4 LA EXPRESIÓN DE BDNF, NT-3, E IGF-1 ES INCREMENTADA POR LA INMUNIZACIÓN DE COP-1 DESPUÉS DE LA ISQUEMIA.	60
7.5 CORRELACIÓN DE LA NEUROGÉNESIS CON LA IL-10 Y LOS FACTORES DE CRECIMIENTO.	61
7.6 EFECTO DE COP-1 SOBRE LOS LEUCOCITOS EN EL LÍQUIDO CEFALORRAQUÍDEO.....	63
7.7 EFECTO DE COP-1 SOBRE LAS SUBPOBLACIONES DE LINFOCITOS T CD4+ EN LÍQUIDO CEFALORRAQUÍDEO.	65
7.8 CORRELACIÓN ENTRE LA IL-10 Y LOS FACTORES DE CRECIMIENTO CON LOS LINFOCITOS DEL LÍQUIDO CEFALORRAQUÍDEO.	67
8. DISCUSIÓN.....	69
9. CONCLUSIÓN.....	78
10. PERSPECTIVAS.....	78
11. REFERENCIAS.....	79

1. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

1.1 Enfermedad Vascular Cerebral

La enfermedad vascular cerebral (EVC) se refiere a todos los trastornos que pueden afectar la irrigación total o de alguna parte del cerebro ya sea de manera transitoria o permanente (1). Muchas de estas enfermedades pueden ser asintomáticas o subclínicas o aparecer de manera súbita en forma de accidente cerebro vascular (ACV) también llamado ictus (stroke en inglés). Propiamente dicho, el ACV hace referencia a cuando el suministro de sangre se interrumpe repentinamente o cuando un vaso sanguíneo en el cerebro se rompe (2)

La EVC está considerada por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como un grave problema de salud pública, ya que está valorada como una de las tres principales causas de muerte que impactan principalmente a países de bajos ingresos y como unas de las principales causas de discapacidad que puede ser prevenible (3)

Las manifestaciones clínicas de la EVC son muy diversas ya que dependen de la zona y severidad de la lesión, sin embargo, un porcentaje alto de pacientes presentan deficiencias cognitivas (pérdida de atención y/o memoria) y motoras (4) que en la mayoría de los casos provocan algún nivel de discapacidad lo cual se asocia una disminución de la calidad de vida del paciente y un alto costo para su familia y para el Estado (5).

1.1.2 Epidemiología

El incremento en la mortalidad por EVC a nivel mundial en los últimos años ha sido notorio, en 1990 se registraron 4.31 millones de decesos y en el 2016 5.53 millones (Fig.1), de entre ellos el 61% se presentó en personas mayores de 70 años y el 31.4% en personas de 50 a 60 años (6).

En el 2016, la OMS clasificó al EVC como la segunda causa de muerte luego de registrar una tasa bruta de 77 personas por cada 100,000 habitantes(7). Actualmente el 80% de las muertes de origen vascular (cardio y cerebro vascular) se presentan en países de ingresos medios y bajos. (3); y son responsables del 66.5 % de las discapacidades que se presentan a nivel mundial (8).

En las últimas décadas la OMS ha impulsado programas que estimulan el compromiso mundial de reducir la incidencia y prevalencia de enfermedades no transmisibles dentro de las que se encuentra la EVC; su plan de acción comprende los años del 2013-2020 en el que se busca controlar y reducir factores de riesgo como la hipertensión, diabetes mellitus, tabaquismo, obesidad, etc. (9).

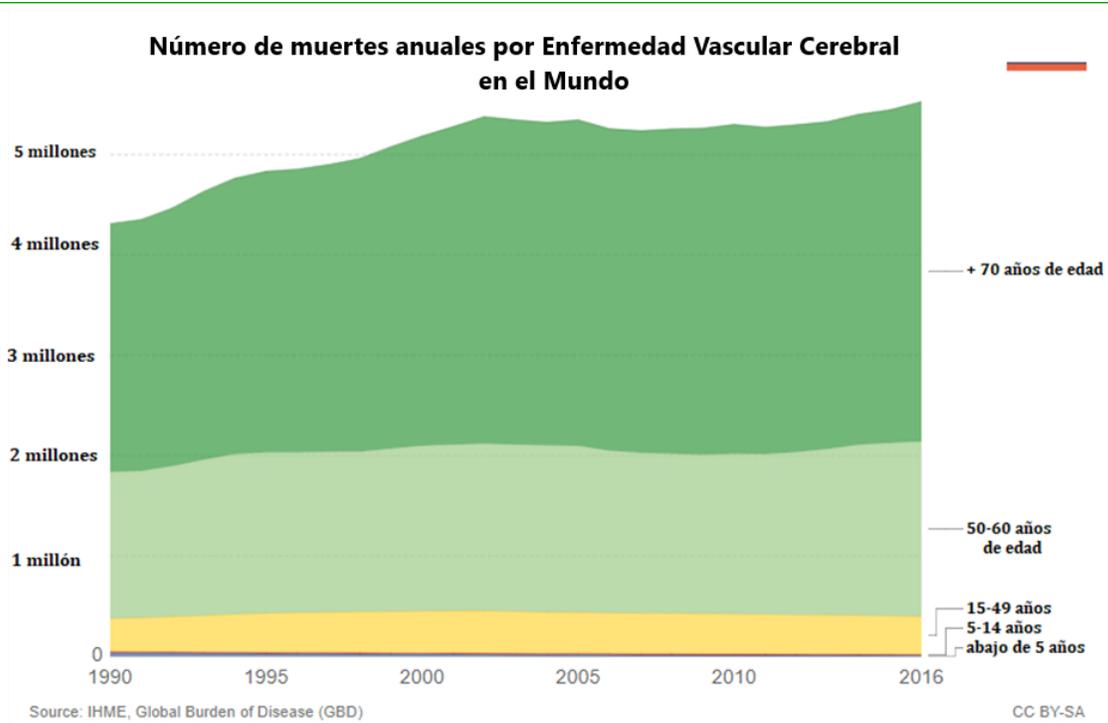


Fig.1. Número de muertes causadas por Enfermedad Vascular Cerebral clasificadas por edad. Imagen obtenida y modificada de <https://ourworldindata.org/causes-of-death#stroke>

En México, en el periodo que comprende del año 1990 al 2016 la cantidad de muertes ocasionadas por EVC se ha incrementado hasta en un 34.28% en personas mayores de 70 años y en un 35.19% en personas de 50 a 69 años; en el rango de personas de entre 15 a 49 años las cifras también se han incrementado en un 19.15% (6) (Fig.2) a pesar de los esfuerzos realizados a través de los programas de salud del gobierno federal.

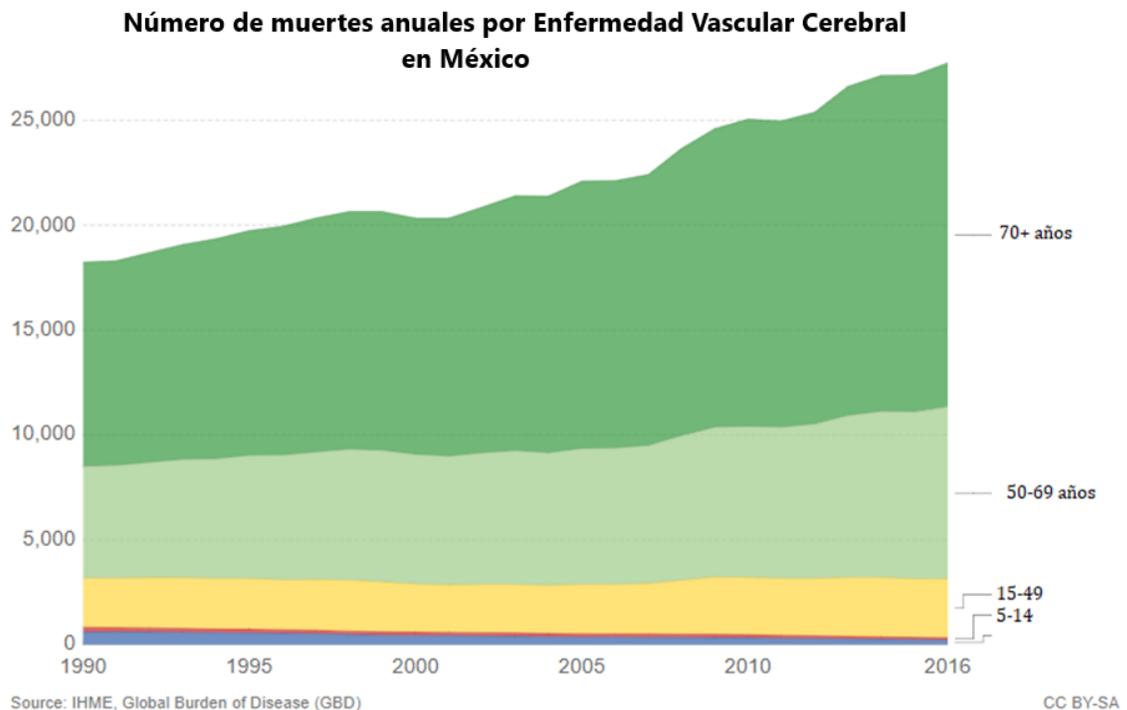


Fig.2 Número de muertes por EVC en México mostrado por grupos de edad. Imagen obtenida y modificada de <https://ourworldindata.org/causes-of-death#stroke>

Actualmente en México, la EVC ocupa el cuarto lugar de causas de muerte en personas de 50 a 70 años, y conforme avanza la edad el número de incidencias aumenta posicionándola en el tercer lugar (Tabla 1) (10).

Decesos causados por Enfermedad Vascolar Cerebral por rango de edad del 2014-2017 en México						
50-54 años	55-59 años	60-64 años	65-69 años	70-74 años	75-79 años	80 + años
1,252	1,671	2,124	2,707	3,553	4,562	1,3838

Tabla 1. Muertes por EVC en México del periodo 2014-2017. Datos obtenidos por la OMS. Unidades de conteo: miles de personas. Datos obtenidos de la pag:<http://www.paho.org/data/index.php/es/mnu-mortalidad/principales-causas-de-muerte.html?showall=&start=1>

Aunado a los datos anteriores, se sabe que la EVC tiene un gran impacto socioeconómico ya que genera gastos hasta de \$630,000 pesos anuales tanto de hospitalización como

gastos en terapia dependiendo del grado de discapacidad provocada por el EVC (11); gastos que afectan a familiares y al Estado.

1.1.3 Etiología y factores de riesgo del Accidente Cerebro Vascular

Con base en la clasificación Internacional de enfermedades (ICD-11) emitida por la OMS (WHO, 2018), la EVC se encuentra dentro de la lista de enfermedades del sistema nervioso (SN) y se clasifica en: EVC de origen hemorrágico, isquémico y de origen desconocido; de todos los casos el de tipo isquémico se presenta del 85-87%, el hemorrágico del 13-15% y sólo del 1-2% son de origen desconocido (12).

Dependiendo de la etiología del ictus isquémico si es de carácter embólico o aterotrombótico se subclasifica en: ACV isquémico por aterosclerosis de arteria grande extracraneal, aterosclerosis de arteria grande intracraneal, ACV por oclusión embólica, ACV por oclusión embólica en arteria pequeña, ACV isquémico debido a otra causa conocida y por causas desconocidas (Fig.3) (13).

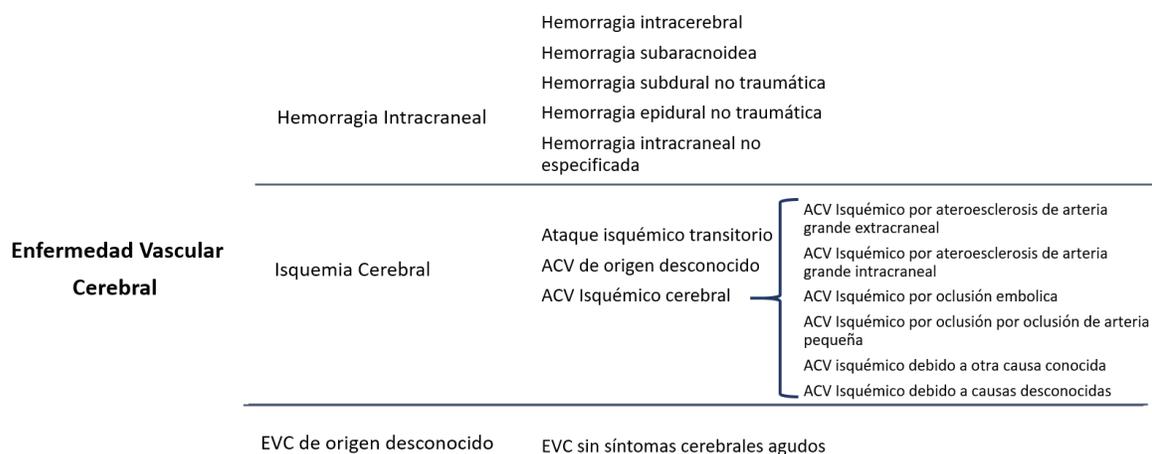


Fig. 3. Clasificación de la Enfermedad Cerebrovascular (EVC) según la OMS.

Se considera que el ACV isquémico más común en el mundo es el causado por aterosclerosis de arteria grande intracraneal y que usualmente va acompañada por alteraciones del mismo tipo en las arterias extracraneales (14). Las arterias cerebrales

medias seguido por las arterias basílicas y las carótidas internas son el sitio más común donde se desarrolla la estenosis y/u oclusión tromboembólica (14),(15).

El principal factor de riesgo para el desarrollo de la aterosclerosis es la hiperlipidemia, aunado a otros factores de riesgo como la hipertensión, diabetes Mellitus, síndrome metabólico, fumar y llevar una vida sedentaria (14). Aunque los mecanismos por los que se inicia la aterosclerosis no son del todo conocidos, se considera que las zonas endoteliales que están expuestas a cambios en el flujo sanguíneo y al cizallamiento celular, son las más susceptibles en presentar lesiones que desencadenan un proceso inflamatorio acompañado de la remodelación y reparación endotelial (16).

Las lesiones endoteliales afectan sus uniones estrechas y adelgazan el glucocalix, esto facilita la internación de LDL (lipoproteína de baja densidad) que viaja por el torrente sanguíneo y la íntima subendotelial; la oxidación de estos lípidos y la producción de radicales libres inducen reclutamiento de leucocitos y la expresión de citocinas pro-inflamatorias como el factor de necrosis tumoral- α (TNF- α) e interleucina 1 (IL-1) (16-18).

Los monocitos que arriban y penetran al espacio subendotelial se diferencian en macrófagos que fagocitan moléculas de colesterol, dando origen a células espumosas (18). Por otro lado, las condiciones oxidantes y pro-inflamatorias en el endotelio provocan que las células de músculo liso cambien su fenotipo y produzcan proteínas de matriz extracelular (19) como colágeno, elastina y proteoglicanos o bien adquieran características de macrófagos con capacidad fagocítica reducida (16).

La muerte por apoptosis de células espumosas, linfocitos y células de músculo liso además de la acumulación de LDL, producción de componentes de matriz, y la proliferación de células de músculo liso, provocan una cubierta fibrosa que da origen al núcleo lipídico o necrótico de la lesión también llamado ateroma (16, 19). El crecimiento del ateroma conlleva a un engrosamiento de la capa íntima del endotelio lo que provoca

la reducción del lumen arterial (20). El cierre parcial o total de la arteria provoca una isquemia.

El proceso de coagulación es activado por varias razones, las dos más importantes son: la inflamación que concurre en la placa, y que en ocasiones el ateroma posee bajas cantidades de colágeno; esto facilita que haya lesiones que permiten la activación de factores de coagulación y la consecuente formación de trombina que conlleva a la activación plaquetaria y con ello a la producción de fibrina formando así el trombo (16, 20). El trombo puede crecer sobre la placa y llevar a la oclusión o desprenderse y viajar a una zona distal permitiendo la oclusión embólica.

1.1.4 Fisiopatología de la Isquemia Cerebral.

El ACV de tipo isquémico se origina ya sea por la reducción de la luz arterial (estenosis) o por la liberación de un trombo que queda atrapado en alguna arteria importante en el cerebro, esta oclusión provoca que haya una hipoperfusión tisular que induce la activación de una serie de mecanismos de muerte celular que afectan principalmente a células del parénquima cerebral; a esta lesión primaria se le suma una lesión secundaria provocada por la inflamación y la generación de radicales libres (21), mecanismos que se agravan cuando hay reperfusión (22)

La caída drástica del suministro de sangre por debajo de 20ml/100g/min en alguna región arterial del cerebro genera que el tejido circundante no pueda mantener la viabilidad celular y sufra lesiones irreversibles, a esa región se le conoce como zona de infarto isquémico (23). El tamaño del infarto también va a depender de otros factores como del tiempo que dure la oclusión, la edad, y la presencia de patologías concomitantes como la hipertensión, diabetes, etc. (24)

Alrededor del infarto se encuentra tejido hipo-perfundido que mantiene niveles del flujo sanguíneo por arriba de 20 ml/100g/min, lo que permite que se mantenga la viabilidad celular aunque se presenten alteraciones en la actividad eléctrica (23), a ésta zona se le conoce como penumbra isquémica y está ligada a los mecanismos de muerte celular que se desarrollan en la zona de infarto como la excitotoxicidad, estrés oxidativo e inflamación (25); se dice que es una región en transición ya que puede convertirse en una zona infartada si no se llevan a cabo terapias de neuroprotección o bien, recuperarse y restaurar sus funciones. Las regiones donde hubo hipo-perfusión moderada que no conducen a alteraciones funcionales, metabólicas y tisulares se les conoce como zona de oligohemia benigna (26).

Una vez que se instaura la isquemia cerebral, se desencadenan eventos bioquímicos que resultan en alteraciones celulares que conducen a la muerte. Estos eventos en conjunto reciben el nombre de cascada isquémica.

1.1.4.1 Cascada Isquémica

El cerebro es un tejido que requiere del aporte constante de glucosa y de oxígeno, ya que posee muy pocas reservas de glucógeno en los astrocitos (27) y porque utiliza de manera constante ATP (adenosin trifosfato) para mantener el equilibrio iónico, las señales de neurotransmisión sináptica y la generación del potencial de acción, principalmente (28).

Durante la oclusión, el tejido cerebral que experimenta la ausencia drástica de oxígeno y glucosa interrumpe la formación de ATP debido a que se frena la fosforilación oxidativa, esto genera disfunción mitocondrial que conduce a la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) (29) y a la liberación y aumento de H⁺ en el medio celular (30). Al mismo tiempo, los astrocitos utilizan el glucógeno almacenado para proveer energía en forma de lactato a las neuronas por pocos minutos (27), pero al carecer de oxígeno no se puede continuar con el metabolismo aerobio, por lo tanto, el cúmulo de ácido láctico origina

acidosis metabólica que junto con el aumento de H^+ crea un ambiente que activa a los canales iónicos sensibles a ácido (ASIC, por sus siglas en inglés acid-sensing ion channels) (30).

La activación de ASIC provoca tanto el flujo de Na^+ al interior de las neuronas (30), como la salida de K^+ (31); a la par, la carencia de ATP altera la actividad en las bombas Na^+/K^+ lo que contribuye al incremento de estos iones ocasionando la despolarización neuronal (32).

Además de la despolarización neuronal que provoca la apertura de canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje, otros mecanismos intensifican la cantidad de Ca^{2+} intracelular, como es el caso de la activación de ASIC, alteración de intercambiadores Na^+/Ca^{2+} y falla en las bombas de Ca^{2+} tanto en la mitocondria como en el retículo endoplásmico (33). Por otra parte, la despolarización anóxica induce la liberación de neurotransmisores excitatorios de entre ellos el glutamato, que al ser liberado al espacio sináptico se une a sus receptores ionotrópicos que inducen una mayor despolarización al permitir la entrada de Na^+ con el consecuente incremento de Ca^{2+} intracelular lo que conduce a la liberación sostenida de glutamato (34) y a la formación de edema citotóxico. (Fig. 4)

Los altos niveles de Ca^{2+} intracelular activan moléculas como las calpaínas, éstas son proteasas que cortan o perturban moléculas vitales como la fodrina (proteína de membrana plasmática), proteína cinasa C (proteína implicada en mecanismos de transducción de señal), y Factor nuclear kappa B (Factor de transcripción) que se ha observado que contribuyen a la expresión de genes de muerte y a la ruptura de las membranas (35); la fosfolipasa A2, al ser activada por el Ca^{2+} hidroliza lípidos membranales liberando ác. grasos insaturados, ác. araquidónico e inicia la formación de radicales libres provocando lipoperoxidación de las membranas (36).

Los mecanismos de alteración membranal afectan también a las membranas lisosomales que al romperse liberan proteasas como la catepsina L y B las cuales causan degradación

de los componentes celulares (36); que en conjunto con el edema ocasionado por la hiperosmolaridad debida a la acumulación de iones intracelulares (37), conducen a las neuronas a muerte por necrosis.

En las zonas hipoperfundidas de la penumbra isquémica en donde las cantidades de oxígeno y glucosa son insuficientes para conservar el estado funcional de las neuronas, la excitotoxicidad conduce a la muerte por apoptosis (38). Ésta se debe principalmente a la liberación del citocromo c de las mitocondrias al citoplasma de la célula iniciando la cascada apoptótica.

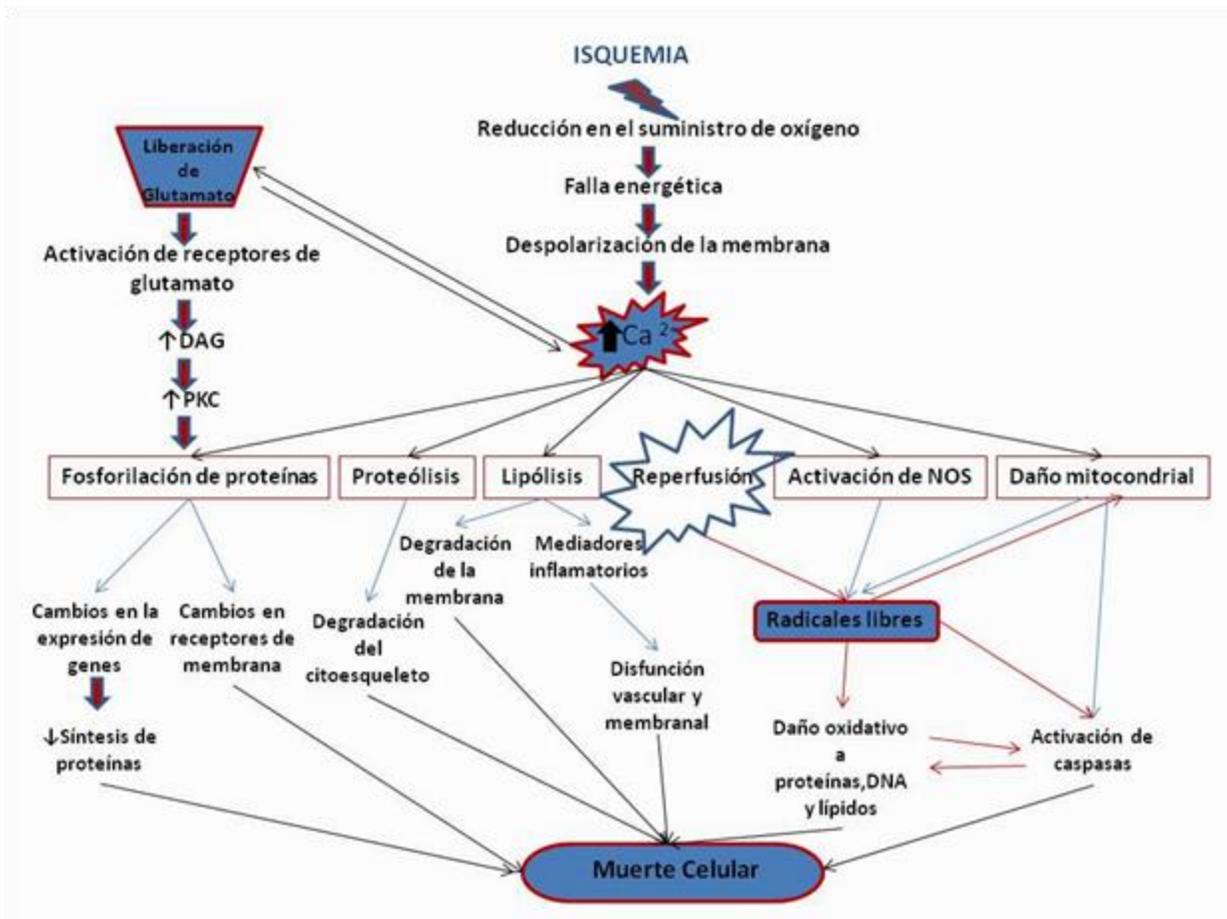


Fig 4. Fisiopatología de la isquemia cerebral. Imagen tomada y modificada de (39)

Los altos niveles de Ca^{2+} , Na^+ , los bajos niveles de ATP y la reperusión estimulan la producción de radicales libres, tanto de (RNS) como ROS. En cuanto a las ROS, la mayoría

de ellos son de origen mitocondrial (por alteración en la cadena transportadora de electrones y la subsecuente liberación de radicales superóxido $O^{\bullet-2}$); por la actividad de la xantina oxidasa (enzima que cataliza la conversión de xantina en ácido úrico utilizando O_2 que se convierte en H_2O_2); por NADPH oxidasa conocida como NOX (enzima que utiliza NADPH para reducir O_2 produciendo grandes cantidades de $O^{\bullet-2}$); y la Ciclooxygenasa COX (COX, induce la producción de prostaglandinas a partir de ácido araquidónico liberando $O^{\bullet-2}$ a partir de su activación por la fosfolipasa A_2) (38, 40). (Fig 5)

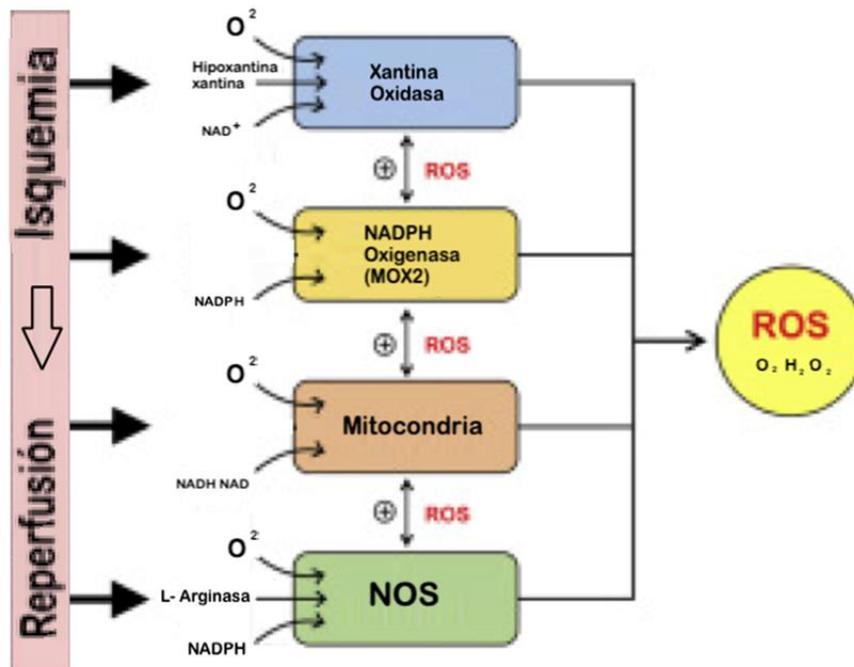


Fig. 5 Vías de producción de radicales libres y su principales reacciones. Imagen tomada y modificado de (40).

La inactivación de las enzimas antioxidantes Superóxido dismutasa (SOD) que regula la concentración de $O^{\bullet-2}$ a través de su dismutación en O_2 y H_2O_2 ; las peroxidasas (glutación peroxidasa y peroxirredoxina) que convierten el H_2O_2 en agua a través de una reacción de óxido/reducción y la catalasa que también convierte el H_2O_2 en agua pero a través de la dismutación (32) no logran proteger al tejido neural del daño oxidativo (41).

Las ROS poseen una alta reactividad sobre muchos tipos de estructuras celulares como las proteínas que al ser oxidadas provocan su desdoblamiento y cambio conformacional alterando su función biológica; los ácidos grasos insaturados de las membranas al ser atacados por ROS provocan su lipoperoxidación generando grandes daños en las membranas; también atacan a las moléculas de DNA originando modificaciones estructurales tanto en las bases nitrogenadas como en las azúcares provocando su fragmentación y promoviendo la muerte celular (42).

En cuanto a las RNS hay dos especies principales, el óxido nítrico (ON) y el peroxinitrito (ONOO-) (38), el ON se sintetiza a partir de la oxidación de L-arginina, la enzima que cataliza la reacción es la óxido nítrico sintasa (NOS) (Fig.6), ésta presenta tres isoformas; la óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS), la neuronal (nNOS) y la inducible iNOS; de ellas las dos primeras son constitutivas y están reguladas por los niveles de Ca^{2+} intracelular; la iNOS se expresa de forma inducible y su actividad es independiente del Ca^{2+} (43).

Los niveles altos de Ca^{2+} debido a la despolarización causada por la isquemia provocan un incremento en la producción de ON por eNOS y nNOS (43). A pesar de que el ON no es considerado un radical libre es una molécula pro-oxidante debido a su capacidad de reaccionar con el $O^{\bullet-}$ y H_2O_2 para formar $OH\bullet$ y $ONOO^-$, éste último se protona fácilmente y se convierte en ácido peroxinitroso (ONOOH), el cual es muy citotóxico (38) (Fig.6)

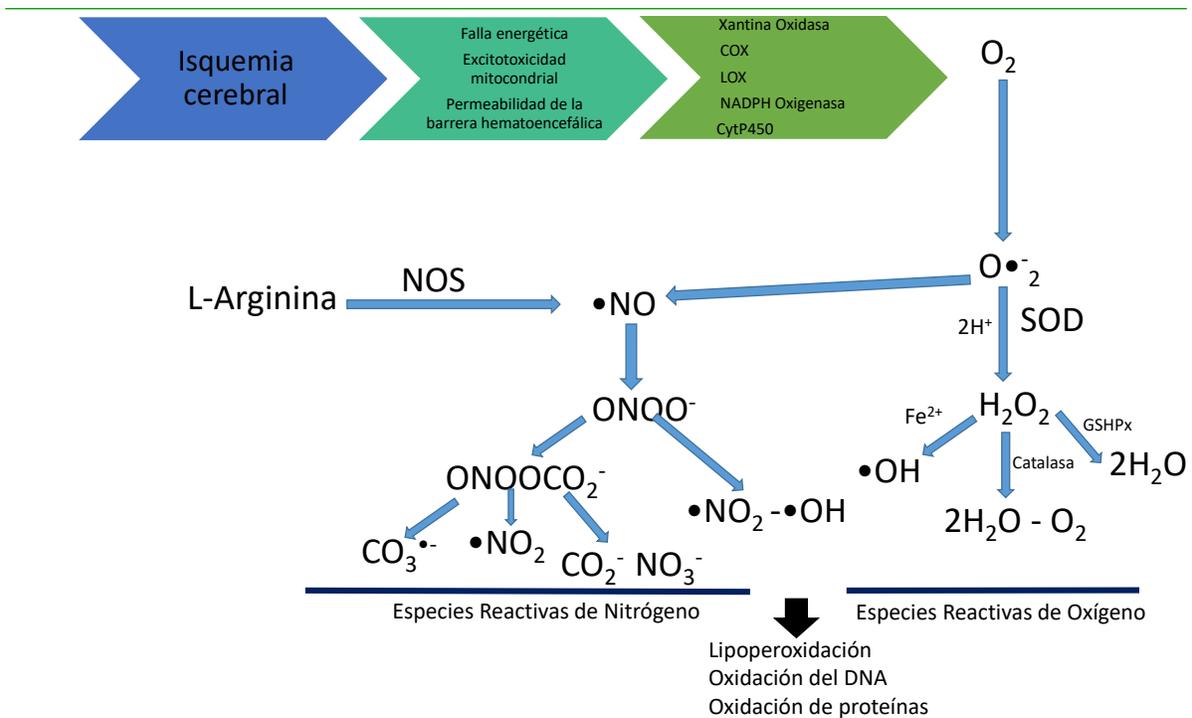


Fig 6. Principales reacciones de radicales libres. Imagen tomada y modificada de (32).

Al igual que la citotoxicidad, los radicales libres también median la permeabilidad de la mitocondria a través de la activación de la fosfolipasa A2 citosólica, esto facilita la liberación del citocromo *c* el cual activa la vía intrínseca de la apoptosis (44). El incremento de ON conlleva a la ruptura de la barrera hematoencefálica (BHE) a través de la activación de metaloproteinasas, éstas degradan la matriz extracelular del endotelio vascular afectando las uniones estrechas; el $ONOO^-$ produce la nitración del DNA esto provoca la activación exhaustiva de moléculas de reparación, que al final conduce a la muerte celular (43).

1.1.4.2 Inflamación post isquemia

Los mecanismos patológicos que desencadenan la formación del trombo que da origen al evento isquémico van acompañados de alteraciones reológicas hipercoagulantes que provocan daño endotelial suscitado por factores tisulares, moléculas de adhesión, citocinas pro-inflamatorias y micropartículas trombóticas (45).

Durante la formación del trombo en el espacio vascular hay cantidades importantes de trombina, ésta además de favorecer la formación de fibrina actúa como quimioquina para monocitos y neutrófilos, incrementa la expresión de moléculas de adhesión y activa a los componentes del complemento C3 y C5 (46); activa a las plaquetas provocando que éstas expresen selectina P y que se les una su ligando P-selectina glucoproteína-1 (PSGL-1) de los leucocitos.

Estudios in vitro han observado que la presencia de selectina P y de quimioquinas como CCL5 (RANTES) y CXCL4 (factor plaquetario-4, PF-4) secretadas por plaquetas activadas por trombina causan una mayor adherencia de monocitos a las células endoteliales en las paredes de los vasos (47).

Minutos después de la oclusión se expresan aún más moléculas de adhesión como las selectinas P y E, moléculas de adhesión intercelular 1 (ICAM-1) y moléculas de adhesión de células vasculares 1 (VCAM-1); y se producen rápidamente señales inflamatorias como la expresión de IL-1 (46). Como consecuencia de la falta de oxígeno y glucosa, las células activadas del endotelio producen ROS y reducen la viabilidad del ON y de su función vasodilatadora provocando una mayor constricción y aumento de la agregación leucocitaria y plaquetaria (48).

Tanto la producción de ROS como la activación de la vía de las prostaglandinas estimulan la producción de metaloproteinasas de matriz (MMP) por las células endoteliales, éstas son proteasas especializadas en degradar componentes de matriz extracelular (49); las cuales inician la remodelación endotelial durante las primeras etapas de la isquemia buscando la protección de la BHE; sin embargo, horas después se ha observado que participan en la alteración de su integridad y ruptura (34).

El daño local es identificado por receptores de patrones de reconocimiento (PRR) que dan como resultado que los mastocitos liberen histamina, proteasas y TNF; y que los macrófagos liberen citocinas pro-inflamatorias (50).

Si bien esta inflamación intravascular establece el escenario para la ruptura de la BHE y la invasión de leucocitos al tejido isquémico, también se inician procesos inflamatorios en el parénquima cerebral (46).

La microglia son las células inmunes innatas del Sistema Nervioso Central (SNC), forman parte del sistema de fagocitos mononucleares (51) y expresan receptores que al ser estimulados provocan su activación (52). La microglia se activa minutos después de la isquemia y presenta un pico máximo a los 2-3 días y se mantiene por varias semanas (51).

Varios estudios han detectado diversos fenotipos de microglia activada (50); la M1 corresponde a la forma clásica, en ella sus receptores de reconocimiento son activados por patrones moleculares asociados al daño (DAMPs) que pueden ser proteínas de choque térmico, purinas, peroxirredoxinas o bien puede ser activada por interferón gamma ($\text{INF-}\gamma$), moléculas oxidantes, entre otras; que inducen vías de señalización de carácter pro-inflamatorio provocando la producción de citocinas como $\text{IL-1}\beta$, IL-6 , $\text{TNF-}\alpha$, quimiocinas, ON y adquieren capacidad fagocítica, además de expresar el complejo principal de histocompatibilidad tipo II (MHCII) (52, 53), éste tipo de activación incrementa el daño tisular (Fig.7) (54).

La microglia activada alternativamente corresponde al fenotipo M2; su activación se realiza a través de IL-4 e IL-13 (55), éste tipo de activación promueve la reparación del tejido neural e inhibe la inflamación ya que produce IL-10 , IL-4 , IL-13 , factor de crecimiento transformante tipo beta ($\text{TGF-}\beta$) y factor de crecimiento parecido a la insulina (IGF-1) (54).

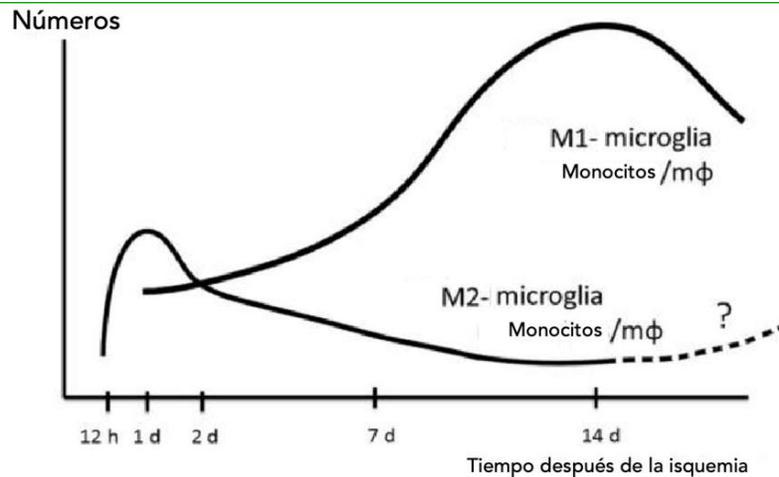


Fig.8 Polarización de la microglia a través del tiempo. Imagen tomada y modificada de Kanazawa (54).

En los espacios perivasculares, se encuentran macrófagos y mastocitos, los cuales son activados por mediadores inflamatorios producidos en el tejido neural lesionado (57); los mastocitos producen histamina, TNF- α y proteasas; los macrófagos producen citocinas pro-inflamatorias como IL-1 β y TNF- α las cuales contribuyen a incrementar el daño en la BHE y promueven la infiltración de leucocitos (48).

Tanto las citocinas y quimiocinas liberadas en la región del endotelio vascular lesionado como las del parénquima cerebral favorecen la extravasación leucocitaria. Los neutrófilos son los primeros leucocitos en infiltrarse, se ha observado su presencia desde 6 h después de la isquemia en zonas cercanas al tejido afectado alcanzando un pico a los 3 días (51).

Cuando los neutrófilos llegan al sitio de la lesión, reaccionan casi de inmediato a los DAMPS, TNF- α e INF- γ que se encuentran ampliamente distribuidos alrededor de la zona perivascular y parénquima cerebral. Esto causa su activación y su posterior liberación de ROS, IL-1 β , TNF- α , IL-6, enzimas líticas y quimiocinas como CXCL9 y CXCL10 que influyen en el reclutamiento de linfocitos (58), esto desencadena una respuesta inflamatoria que exagera aún más la lesión.

Las quimiocinas liberadas en el sitio de lesión también reclutan monocitos los cuales pueden diferenciarse en función del medio isquémico; estos se han encontrado en el tejido lesionado hasta después de 10 h de haber iniciado la isquemia (49). Los macrófago reclutados durante la fase aguda se diferencian hacia un fenotipo M1 pro-inflamatorio (51), provocando que liberen citocinas como INF- γ (52), TNF- α e IL-1 β (59) causando inflamación y contribuyendo a la muerte celular. No obstante, también se ha demostrado que los macrófagos pueden participar en la protección y reparación del tejido isquémico cuando adquieren un fenotipo M2 y producen citocinas anti-inflamatorias como la IL-10 y TGF- β (51).

Los linfocitos T también infiltran al tejido lesionado, estos se han encontrado desde unas horas después de la lesión y hasta 30 días después (60). De los diferentes subtipos, los linfocitos T $\gamma\delta$ son los primeros en llegar al sitio de lesión (61) seguidos por los linfocitos TCD8⁺, posteriormente llegan los linfocitos T CD4⁺ y TNK, quienes llegan después de las 24h de la isquemia, los últimos son los linfocitos Treg estos se presentan días después (62).

Se ha demostrado que las células de infiltración temprana T $\gamma\delta$ son las principales secretoras de INF- γ , IL-17 e IL-23; estas citocinas contribuyen el incremento de la inflamación y del tamaño del infarto (61, 63).

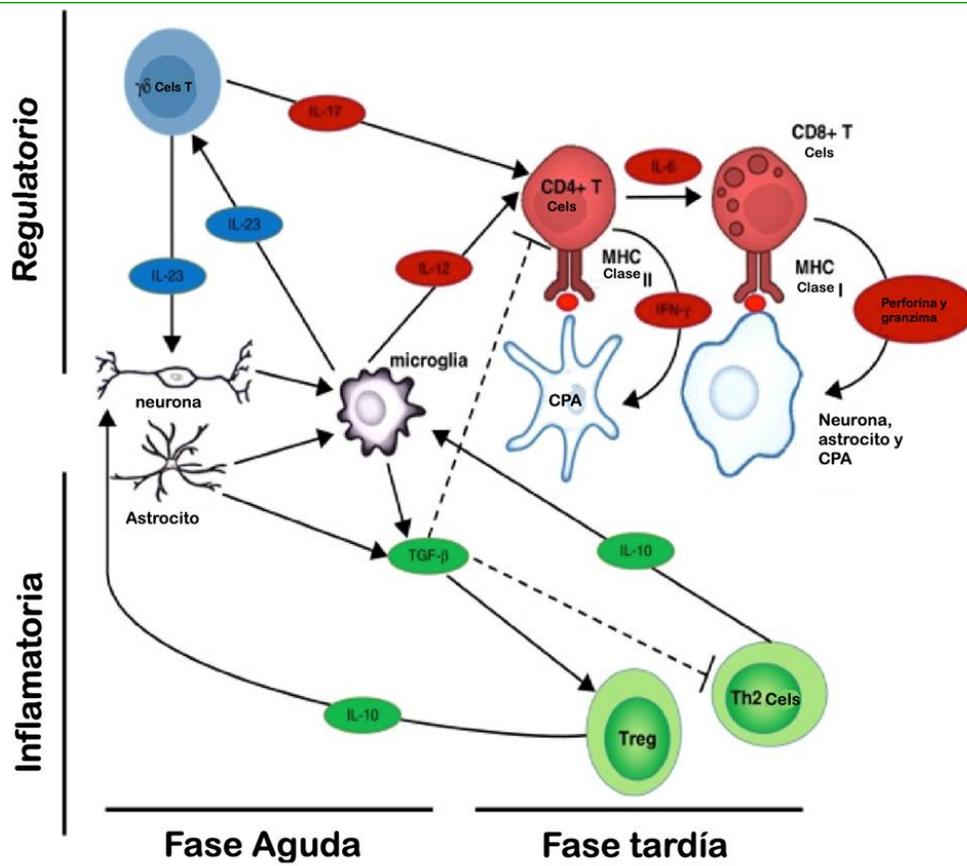


Fig. 9. Participación de los linfocitos en la isquemia cerebral. Imagen tomada y modificada de (63).

La expresión del MHCII por varias células en el parénquima cerebral lesionado permite la presentación de antígenos a los linfocitos TCD4⁺ (Fig. 9) (58). Las células TCD4⁺ adquieren un fenotipo Th1 y liberan citocinas pro-inflamatorias como IL-6, IL-12, TNF-α e INF-γ; las cuales exacerban la inflamación y el daño tisular (58). A nivel experimental, varios investigadores han demostrado que si se induce un cambio en el fenotipo de Th1 a Th2 se evita que se incremente el daño tisular y se reduce la inflamación (64).

La activación de los linfocitos T CD8⁺ conducen a la muerte neural a través de la vía perforina-granzima (63). Las células NK también contribuyen a la lesión produciendo INF-γ (65).

Los linfocitos T reg. permiten la tolerancia inmune e inducen la supresión de la inflamación; en el caso de la isquemia se ha observado que persisten hasta por 30 días

después de la oclusión y que poseen una función protectora ya que producen citocinas anti-inflamatorias como IL-10 y TGF- β (58), además, suprimen la producción de la metaloproteinasa-9 de los neutrófilos (63).

Recientes estudios han evidenciado que la ruptura de la BHE no es el único sitio de entrada de leucocitos al parénquima cerebral, también lo son los plexos coroideos, ya que estos en condiciones fisiológicas normales pueden funcionar como un reservorio de células inmunes como los linfocitos T y actuar rápidamente ante alguna lesión cerebral (66).

1.1.5 Plexos coroideos

Los plexos coroideos son estructuras localizadas dentro de los ventrículos cerebrales, están conformados por una red vascular que es rodeada por tejido conectivo que constituye el estroma y éste a su vez está cercado por una mono-capa de células epiteliales que lo separa del espacio ventricular (Fig. 10) (67); el endotelio vascular posee fenestraciones que permiten una alta permeabilidad de sustancias que contiene el flujo sanguíneo y que se incorporan al estroma, el epitelio del plexo posee uniones estrechas, evitando así el flujo de moléculas y tipos celulares provenientes de los vasos sanguíneos que están en contacto con la cara apical del estroma (68).

Las células epiteliales poseen una superficie apical (orientada a la zona de los ventrículos) que posee una gran cantidad de microvellosidades que incrementan la superficie de contacto; en su región basolateral que está próxima al estroma, carecen de vellosidades; y en las membranas laterales, presentan uniones estrechas en su zona más apical, además de transportadores, lo que permite que funcionen como una barrera (69), la llamada barrera hematoliquoral (BHE-LCR) (70).

Las células epiteliales son las responsables de generar el líquido cefalorraquídeo (LCR) a partir de sangre arterial que penetra a la región del estroma a través de difusión y transporte activo (71), el control de este flujo está regulado por el sistema nervioso simpático (72). En éstas células se encuentran una gran cantidad de transportadores y enzimas que contribuyen a la homeostasis de los nutrientes, a la formación de una barrera metabólica y a la producción de LCR (Fig. 10), todos ellos acoplados a las necesidades del parénquima cerebral.

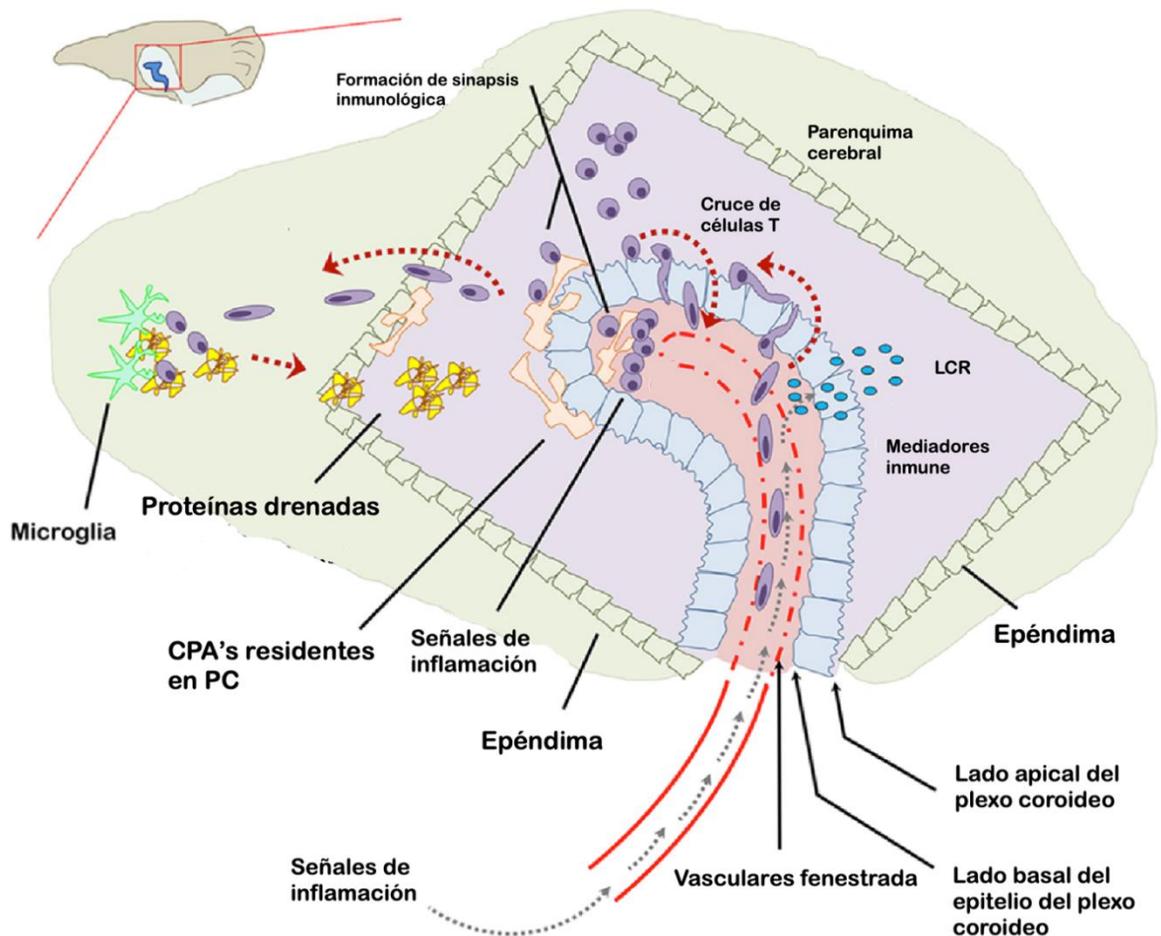


Fig. 10. Estructura y tipos celulares que se encuentran en los plexos coroideos. Imagen tomada y modificada de (68).

El epitelio de los plexos coroideos no sólo transporta iones (Ca^{2+} , Na^+ , K^+ y Cl^-) (72), también nutrientes como ácido Ascórbico, glucosa, folato, ácido Retinoico; hormonas (ej. aldosterona, tiroxina T4, etc) precursores metabólicos, proteínas (73) (ej. transtiterina, apolipoproteína D, fibulina, etc) (74), factores de crecimiento (ej. TGF- β , factor de

crecimiento parecido a la insulina-2, IGF-2; Factor de crecimiento vascular endotelial, VEGF; etc) (73); etc. que serán filtrados o convertidos en moléculas necesarias para formar el LCR. (Fig. 10).

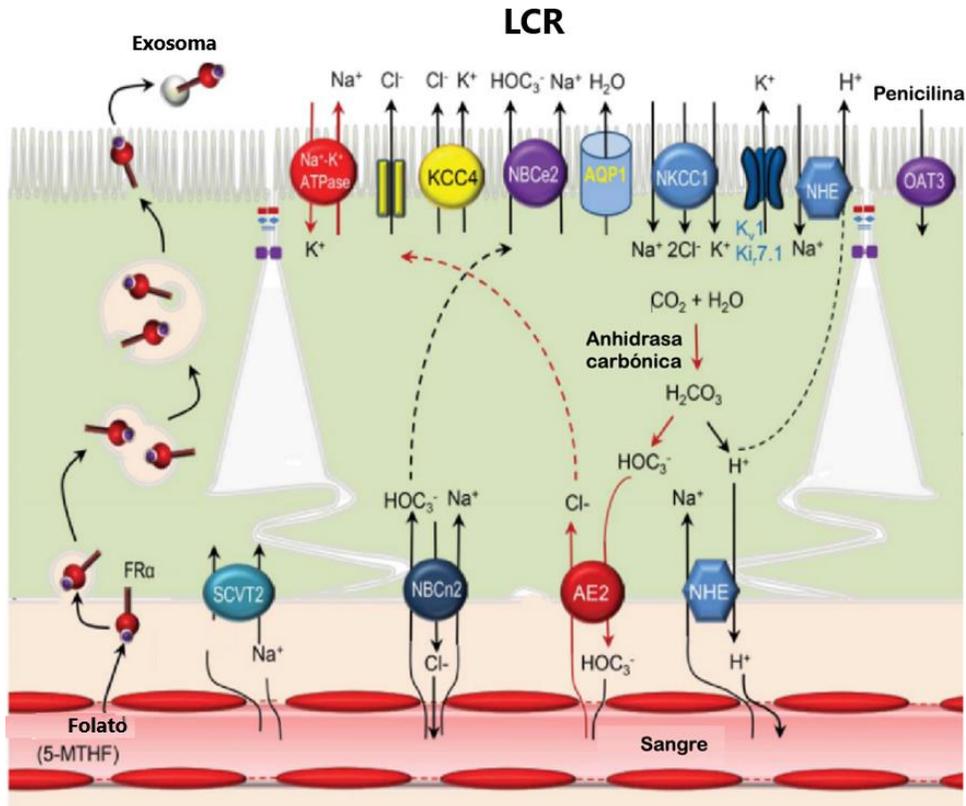


Fig 11. Transportadores de iones y moléculas a través del epitelio del plexo coroideo. Imagen tomada y modificada de (73).

El LCR producido por las células epiteliales fluirá desde los ventrículos laterales al tercer ventrículo y de allí al cuarto, finalmente ingresará al espacio subaracnoideo (75) para poder ingresar al parénquima cerebral a través de los espacios perivasculares y facilitar el flujo de solutos y moléculas de desecho contenidas en el líquido intersticial que serán conducidas mayoritariamente al sistema glinfático para ser desechadas (73, 76).

En cuanto al tipo de células que se encuentran en los plexos coroideos, evidencias demuestran que este sitio alberga células inmunes que allí residen en condiciones no patológicas como macrófagos (conocidas como células epiplexas de Kolmer), células dendríticas (CD), células B, granulocitos (77) y linfocitos T CD4⁺ (Fig. 10)(68). No obstante,

los plexos son un sitio que por sus condiciones estructurales y fisiológicas permiten el paso controlado de células inmunes que provienen de la periferia (67).

Actualmente se conoce que en la superficie apical de las células epiteliales se expresan de manera constitutiva moléculas de adhesión como VCAM, ICAM y P-selectina, conjuntamente con quimiocinas como CXCL10 y CCL20, estas moléculas pueden facilitar el asentamiento de leucocitos desde el LCR al epitelio de los plexos coroideos y facilitar la interacción con CPAs ante alguna lesión o infección del SNC (Fig. 12) (68).



Fig. 12. Ambiente neuroinmune en el plexo coroideo en condiciones sanas. Imagen tomada y modificada de (78).

En un intento por identificar y comprender la participación de las células inmunes en los plexos coroideos en el cerebro sano, Baruch y sus cols. en el 2013 (79) demostraron la residencia de linfocitos T CD4⁺ específicas para antígenos del SNC y que éstas eran capaces de producir IL-4 e INF- γ lo que indica la presencia de vigilancia constante de células Th1 y Th2 (80), aunque también se ha demostrado que las células T de memoria de tipo efector que se hallan en el plexo coroideo cambian durante el envejecimiento

facilitando el deterioro cognitivo (79) lo que indica la participación de las células inmunes en procesos distintos a la defensa y protección.

En ese mismo sentido, Kipnis y cols en el 2012 (77) observaron que la producción de IL-4 por parte de los linfocitos T residentes en la periferia del cerebro es necesaria durante procesos de memoria y aprendizaje, probablemente porque esta IL induce la producción de BDNF (factor neurotrófico derivado del cerebro), el cual se sabe que es un factor que interviene en procesos de memoria y aprendizaje.

En cuanto a la actividad de las células inmunes presentes en los plexos durante procesos patológicos, Meerker y cols. (67) en un intento por dilucidar los tipos celulares presentes en el LCR de varias patologías, recopilaron información de varias fuentes para evidenciar que cada patología presenta patrones de células inmunes características Fig. 13 presumiblemente como resultado de diversas formas en el que el plexo selecciona y activa las células inmunitarias.

Por otra parte, Kunis y cols. en el mismo año demostraron que el INF- γ es necesario para la activación de células del plexo y necesarias para que se permita el tráfico de leucocitos en un modelo de lesión en la médula espinal (81).

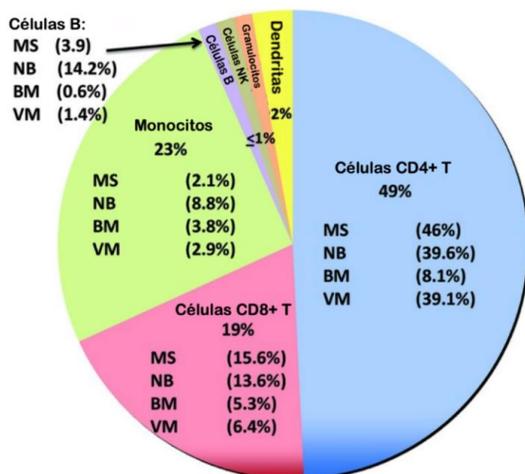


Fig. 13. Tipo de células inmunes presentes en LCR en diferentes patologías. Imagen tomada y modificada de(67).

La funciones específicas de las células inmunes que residen en los plexos coroideos y que circulan rutinariamente en el LCR no se conocen del todo bien, pero se considera que estas células pueden proporcionar un microambiente de modulación que intervenga en proceso fisiológicos como la cognición (específicamente por linfocitos T) (82), neurogénesis (77, 83) y que sean los responsables de montar una respuesta inmune temprana ante cualquier lesión incrementando la expresión de moléculas de adhesión, reclutando células inmunes de la periferia como monocitos y produciendo factores neurotróficos que faciliten la sobrevivencia y reparación neural (79).

1.1.5.1 Plexos coroideos en la isquemia cerebral.

A pesar de la poca información con la que se cuenta, evidencias han demostrado que los plexos coroideos son un sitio de tráfico de linfocito T después de la isquemia cerebral; experimentos realizado por el grupo de Llovera en el 2017 (66) demostraron que en el modelo de obstrucción de la arteria cerebral media (OACM) por 90 min en ratones, 60% de la infiltración de linfocitos T se lleva a cabo por esta ruta en el plexo coroideo ipsilateral, específicamente; y que rápidamente arriban a la periferia del infarto, esto como consecuencia del incremento de la quimiocina CCR2 en el parénquima cerebral lesionado; cabe destacar que en uno de sus experimentos bloquearon la circulación de LCR con la intención de corroborar si esa era la entrada de los linfocitos T, interesantemente revelaron que no afectaba la cantidad de linfocitos infiltrados, sugiriendo que los linfocitos T se traslocan preferentemente desde el estroma de los plexos coroideos al parénquima cerebral y no atravesaban en epitelio para llegar al LCR (66)

Por otra parte, Pedragosa J. en el 2018 (84) observó en un modelo de OACM transitoria por 1h que los macrófagos perivascuales, incluyendo los encontrados en los plexos coroideos al ser activados expresan una mayor cantidad de quimiocinas como spp1, IL-6, Ccl17 y Ccl22 que reclutan principalmente neutrófilos y que induce la expresión del factor

de crecimiento vascular endotelial (VEGF) promoviendo la disfunción neurológica en la fase aguda de la isquemia (84). Muy parecido a los datos anteriores; los resultados obtenidos por Ge y cols. en el 2017 (85), observaron en el modelo de OACM permanente un incremento en la expresión de quimiocinas Ccl2, Ccl1 y Cx3 y también en moléculas de adhesión como VCAM; además de esto mostraron que la administración de macrófagos de tipo M2 en el LCR son capaces de infiltrarse al parénquima cerebral y promover la recuperación motora y cognitiva (85).

Los datos anteriores siguieron que los plexos coroideos son una puerta de entrada de células inmunes en donde no se ha explorado el efecto de inmunomoduladores que buscan la recuperación neural después de la isquemia y promover mecanismos como la neurogénesis.

1.2 Neurogénesis en la etapa adulta.

La neurogénesis es el proceso de formación de nuevas neuronas funcionales a partir de células madre/progenitoras neurales (NSC, por sus siglas en inglés Neural Stem Cells), incluida la proliferación de NSC endógenas, la migración y la diferenciación hacia neuronas funcionales maduras (86). En la última década se ha demostrado que la neurogénesis continúa hasta la edad adulta y que ocurre toda la vida en dos regiones bien identificadas; la zona subventricular (ZSV) hallada en los ventrículos laterales y la zona subgranular (ZSG) del giro dentado del hipocampo (GD) (87).

Los neuroblastos producidos en la ZSV migran hacia el bulbo olfatorio (BO) donde serán diferenciados en interneuronas y se incorporarán a los circuitos neurales ya establecidos (88); los neuroblastos producidos en la ZSG desarrollarán dendritas apicales que alcanzarán la capa molecular y sus proyecciones axonales alcanzan la región CA3 del hipocampo (Fig. 14) (89).

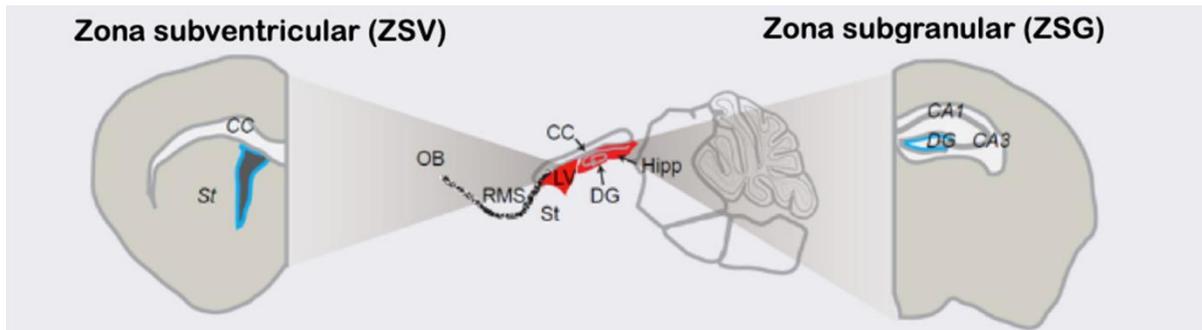


Fig.14 Sitios neurogénicos. Imagen tomada y modificada de (90).

1.2.1 Neurogénesis en la ZSV

En la ZSV, las NSC se encuentran debajo de las células endociliares ubicadas en ambos ventrículos laterales del cerebro, estas células reciben el nombre de células B 1 (también conocidas como células madre neurales radiales de tipo glía) y se caracterizan por poseer un proceso basal que está en contacto con los vasos sanguíneos y un proceso apical con un cilio que se asoma a través de las células endociliares para tener contacto con el LCR de los ventrículos (90), estos cilios permiten tener contacto con factores que modulan la proliferación y diferenciación por ej. en el LCR se encuentra el IGF-2 que regula directamente la proliferación de estas células; posteriormente los procesos forman los túbulos gliales (tallo rostral migratorio) por los que migrarán los neuroblastos (Fig. 15) (91).

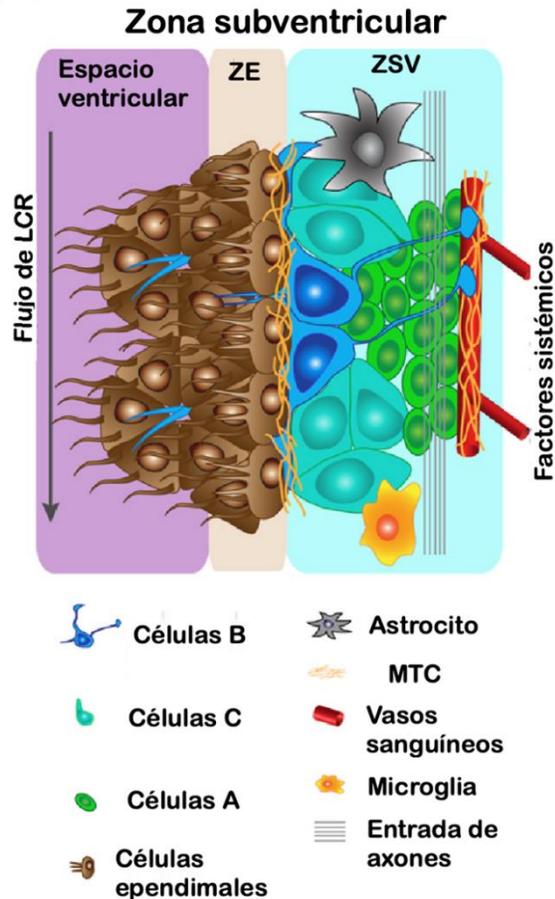


Fig. 15. Distribución de las células B en la ZSV. Imagen Tomada y modificada de (90).

Las células NSC reciben señales tanto de las células ependimales (como noggin y el inhibidor de la señalización de la proteína morfogenética ósea (BMP), los cuales permiten su activación) como de moléculas contenidas en el LCR (90). Las células B1 presentan marcadores parecidos a los astrocitos como la proteína ácida glial-fibrilar (GFAP), el transportador de aspartato de glutamato (GLAST) y la proteína de unión a los lípidos del cerebro (BLBP), además de poseer pies astrocitos y receptores para diferentes tipos de factores de crecimiento como el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) (88), factor de crecimiento de fibroblastos 2 (FGF2) y EGF, que también participan en la regulación de la proliferación, diferenciación y supervivencia (92).

Las NSC de tipo B1 dan lugar a las células C que se dividen unas cuantas veces antes de convertirse en neuroblastos (células A) (90). Las células C expresan *Ascl1* y *Pax6*, estos

genes participan en la diferenciación a neuroblastos. Los neuroblastos ya formados expresan la proteína Doublecotina (DCX) y la molécula de adhesión de células neurales polisializada (PSA-NCAM) (Fig. 16), las cuales permiten la migración de los neuroblastos de la ZSV al BO (88).

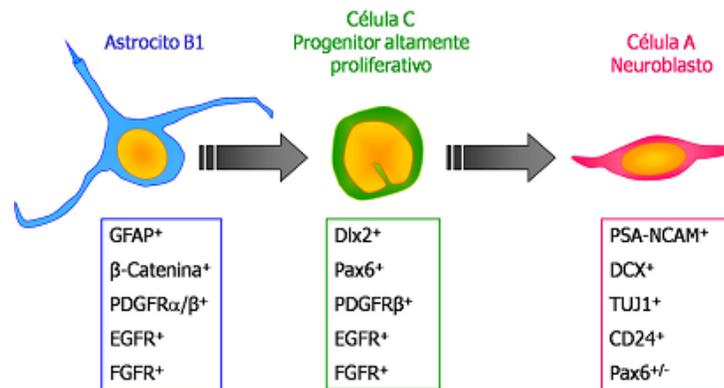


Fig. 16. Marcadores representativos en cada estadio de proliferación y diferenciación durante la neurogénesis en la ZSV. Tomado y modificado de (93).

Los neuroblastos migran a través del tallo rostral migratorio, éste es una red de células interconectadas que forman una cadena por las que se desplazan las neuronas nuevas, al llegar a la parte media del BO, los neuroblastos migran hacia la capa granular donde continúan su diferenciación en interneuronas GABAérgicas y dopaminérgicas (Fig. 17) (94).

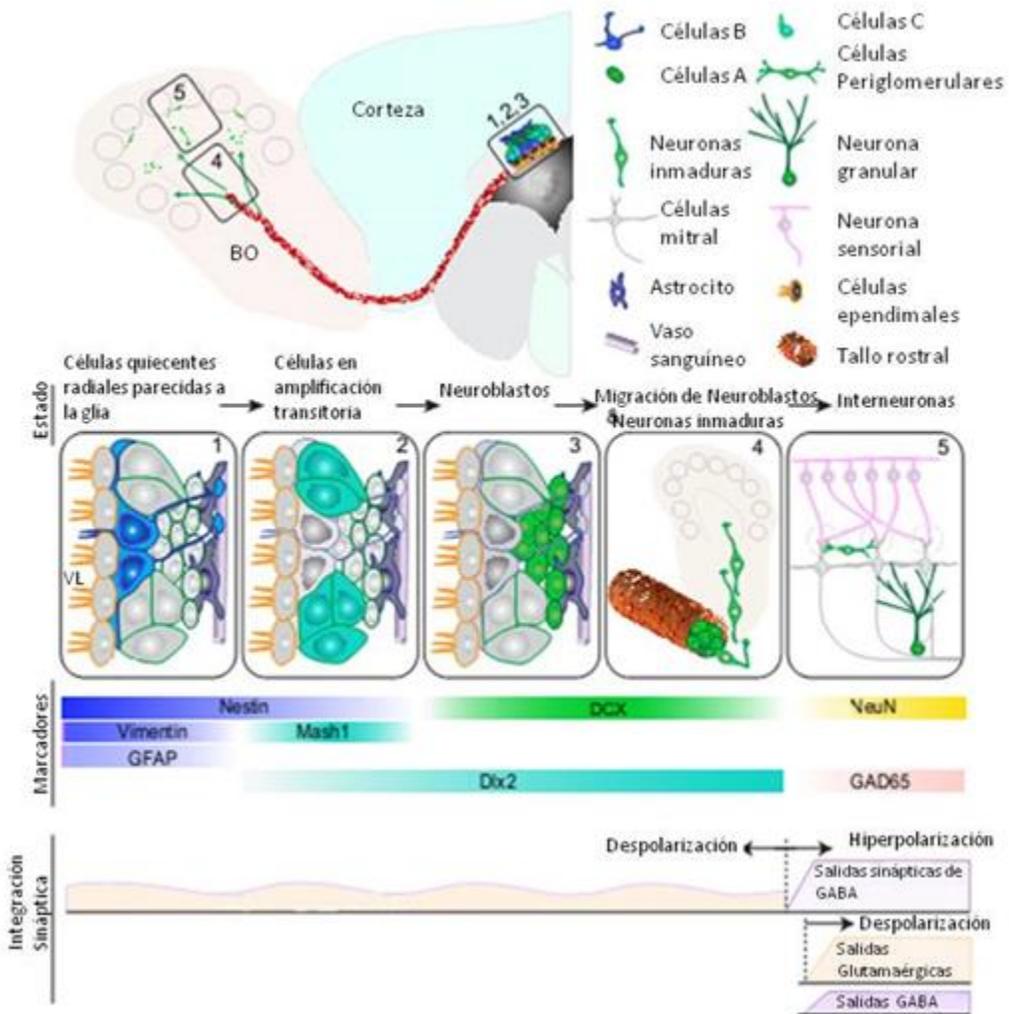


Fig. 17. Marcadores específicos durante las diferentes etapas de la neurogénesis en la ZSV. Tomada y modificada de (95).

1.2.2 Neurogénesis en la ZSG

Las NSC de la ZSG se encuentran ubicadas entre la capa de células granulares internas y el hilio (90) (Fig.18). Estas células madre son conocidas como células tipo 1, poseen un soma triangular, pies astrocitos y procesos cortos y horizontales; de manera característica poseen un proceso apical que se sumerge en la capa molecular del DG; este tipo de células expresan marcadores para GFAP, nestina, BLBP y Sox2 (factor de transcripción que permite la autorrenovación de células madre) (96).

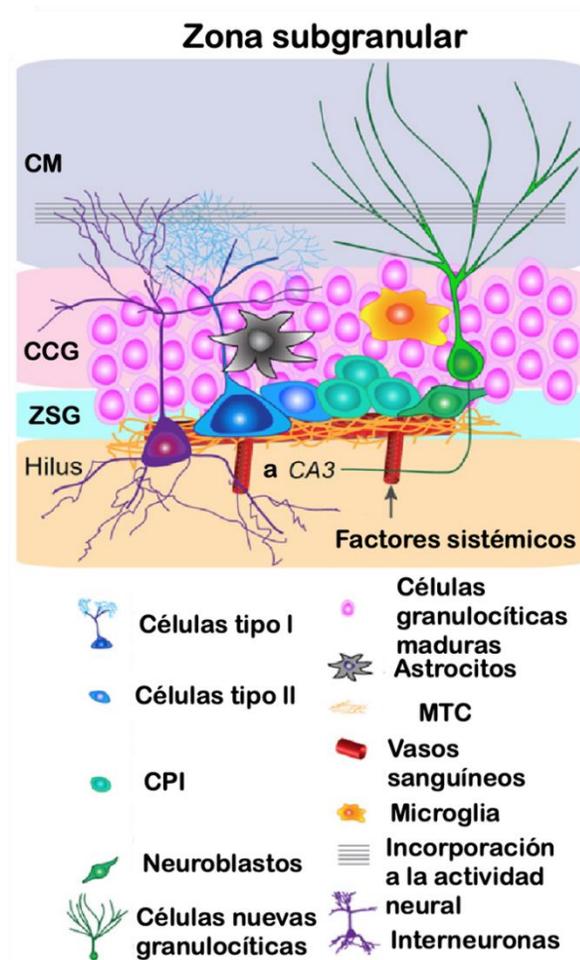


Fig.18. Distribución de las células tipo 1 en la ZSG. Imagen Tomada y modificada de (90).

Las células tipo 1 dan lugar a las células tipo 2 a y 2b (89), las cuales presentan una morfología distinta ya que carecen del proceso apical y tienen un núcleo redondo u ovoide, presentan marcadores como DCX, PSA-NCAM y GFAP; estas se diferencian en células tipo 3 o células granulares inmaduras, las cuales presentan morfologías variables aunque la mayoría presentan procesos cortos y las orientaciones cambian de horizontal a vertical, presentan marcadores como DCX, PSA-NCAM, NeuroD, NeuN y Prox1 (Fig. 19) (96).

Las células tipo 3 se diferencian en células granulares las cuales envían proyecciones axonales a la región CA3 del hipocampo (89) las cuales se incorporan a los circuitos neuronales existentes.

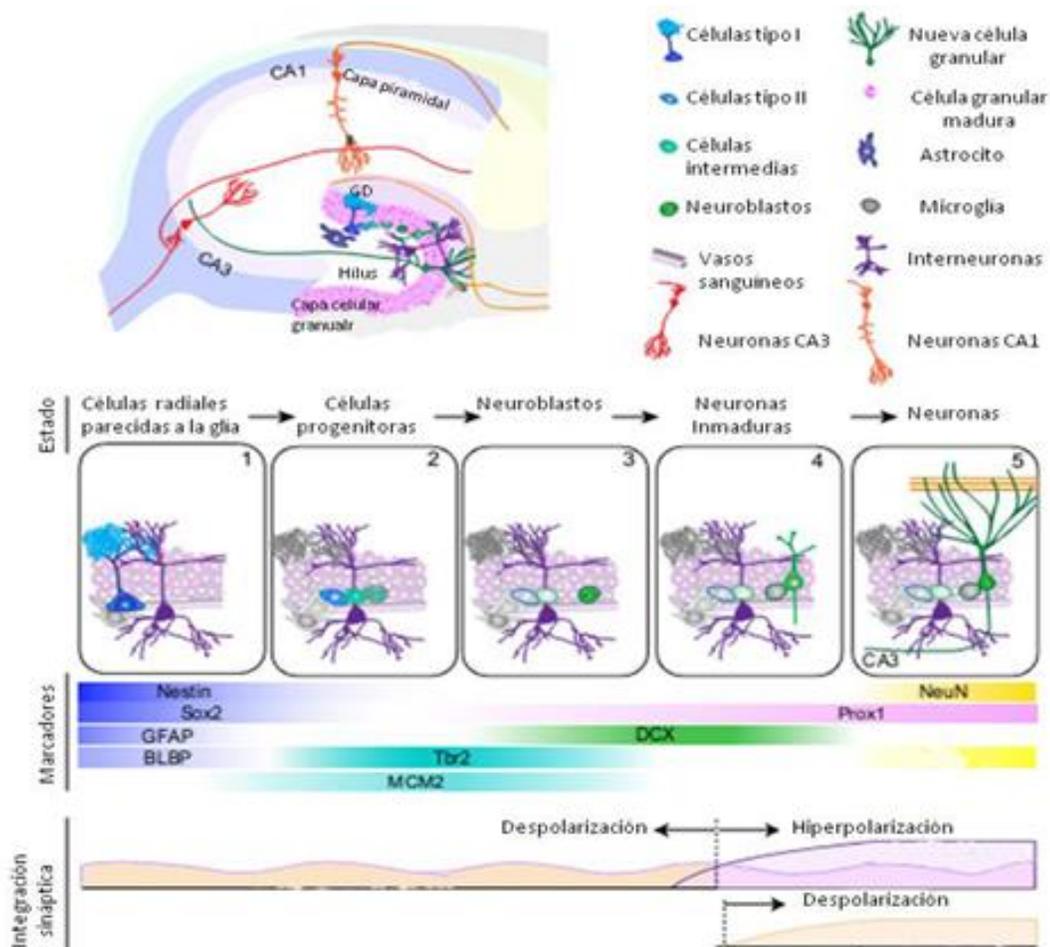


Fig 19. Marcadores específicos durante las diferentes etapas de la neurogénesis en la ZSG. Tomada y modificada de (95).

1.2.3 Regulación de la neurogénesis

Numerosos factores intrínsecos y extrínsecos afectan los procesos de la neurogénesis adulta, incluida la proliferación de las NSC, la determinación de su destino, la diferenciación, migración y maduración a neuronas adultas; se dice que hay cinco moduladores cruciales que regulan la neurogénesis: la transducción de señalización, los sistemas vasculares y angiogénicos, los factores metabólicos y la regulación epigenética (89).

Dentro de las vías de señalización, la vía Wnt juega un papel importante en el desarrollo neural embrionario y adulto a través de la activación de la vía canónica de la β -catenina que induce la expresión de genes de proliferación celular, esta vía se ha observado que está activada en NSC tanto en la ZSV como en la ZSG en cerebros adultos (97). La vía Notch presenta varios receptores, los cuales al unirse a su ligando regulan la expresión de genes que participan en la autorrenovación de las células NSC de las zonas neurogénicas, el desarrollo de neuritas y el destino específico de las neuronas nuevas (98). La señalización de Sonic hedgehog (Shh) desempeña un papel crucial en la diferenciación neuronal, controla la proliferación de NSC principalmente en la ZSG del cerebro adulto (89).

Los factores vasculares son de suma importancia ya que tanto la ZSV como la ZSG están halladas de manera colindante con vasos sanguíneos, estos les proporcionan a las NSC moléculas de señalización circulante, factores de crecimiento y nutrientes, además también se ha observado que las células endoteliales liberan factores de crecimiento que estimulan la neurogénesis (89).

Los factores de crecimiento que intervienen en la neurogénesis han sido muy explorados, los más destacados son: VEGF, BDNF, IGF-1, FGF2, neurotrofina 3, 4 y 5. (NT-3, NT4/5). El VEGF, es una proteína angiogénica que se une a su receptor en las células endoteliales

para inducir la angiogénesis aunque las NSC también expresan receptores para este factor y se ha observado que induce su proliferación tanto en la ZSV como en la ZSG (86).

Estudios han demostrado que las NSC expresan receptores TrkB que interactúan principalmente con el BDNF, éste es producido por una gran variedad de tipos celulares como: neuronas, células endoteliales, astrocitos y células inmunes; se considera que el BDNF influye en los procesos de supervivencia, maduración y migración de las neuronas de nueva formación a través de la activación del factor de transcripción CREB, el cual media la transcripción de genes esenciales para la supervivencia y diferenciación de neuronas (Fig. 20)(99).

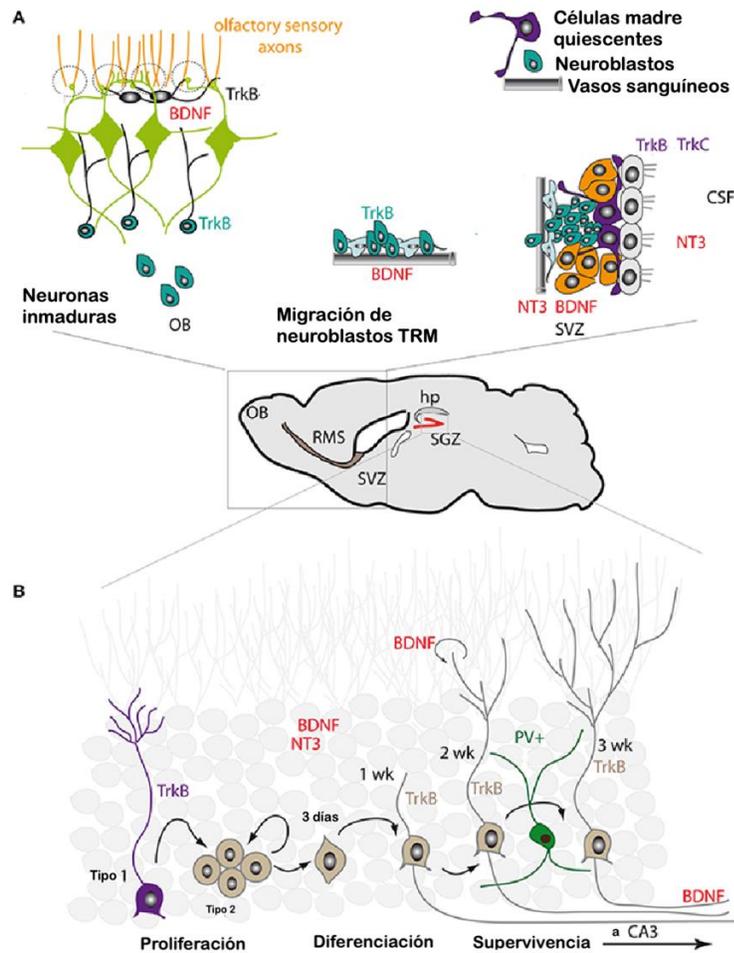


Fig. 20 Patrones de expresión de algunas neurotrofinas. Tomado y modificado de (99).

El IGF-1 se produce principalmente en el hígado, pero se ha observado que induce la proliferación y diferenciación de las NSC a través de la vía MEK / ERK y la señalización de la ruta PI3K / Akt en la SGZ y la SVZ, respectivamente (89), también evita la apoptosis y facilita la sinaptogénesis (100).

Las neurotrofinas fueron las primeras en identificarse como factores de sobrevivencia de neuronas en desarrollo aunque ahora se sabe que también participan en la regulación de la diferenciación neuronal, crecimiento axonal y dendrítico; y plasticidad sináptica a través de la unión con sus receptores TrkC (para NT-3 principalmente) y TrkB (para NT-4/5); Nt-3 es producido por células endoteliales y células inmunes, además también se ha relacionado a procesos de aprendizaje y de memoria (99, 101).

1.2.4. Neurogénesis y Plexos coroideos

Las células NSC se encuentran dentro de nichos especializados, (ZSV y ZSG) que están organizados para establecer contacto con el LCR (102). En el caso de las NSC en la ZSV presentan un cilio que atraviesa la capa de células ependimales para mantener contacto con él (Fig. 21) (90).

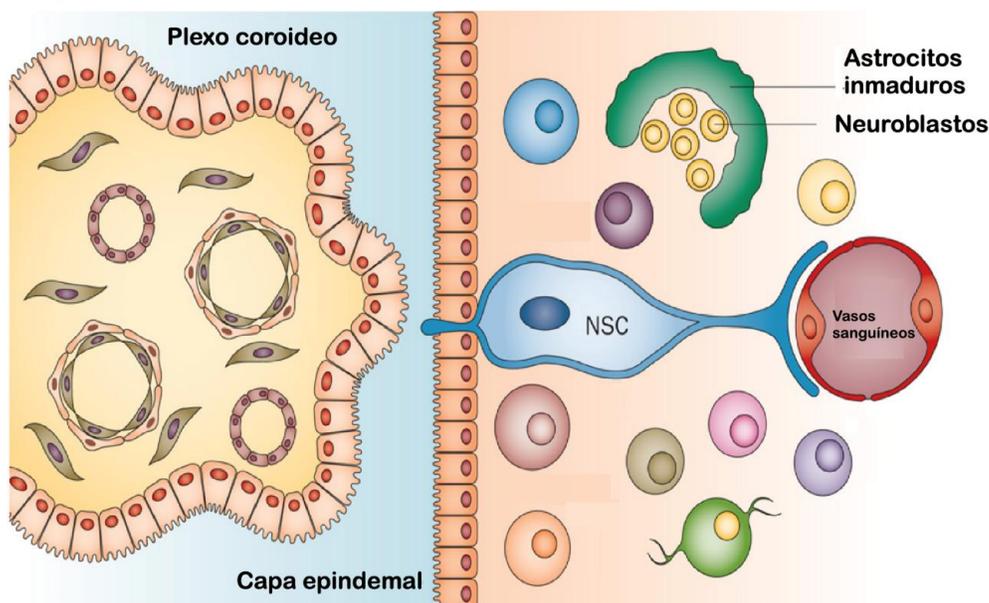


Fig. 21. Estructura de la ZSV colindante con el plexo coroideo. Tomado y modificado de (102).

El LCR contiene una gran diversidad de factores de crecimiento, péptidos y hormonas que pueden promover el mantenimiento de las NSC y su proliferación; dado que el epitelio del PC es el que controla lo que fluye a través de él, se considera actualmente que dentro de sus funciones está regular la neurogénesis (103).

El PC secreta factores de crecimiento como BDNF, EVGF, IGF-1 (104) y NT-3 (99), y una gran variedad de moléculas de señalización que influyen en la neurogénesis, algunas de ellas se muestran en la siguiente tabla.

Moléculas secretadas con potencial influencia sobre la neurogénesis			
Cxcl12	20315	Quimiocina (C-X-C), Ligando 12	Quimiocina/actividad factor de crecimiento
Reln	19699	Relina	Desarrollo del sistema nervioso
Fgf15	14170	Factor de crecimiento de fibroblasto 15	Actividad de factor de crecimiento
Fgf18	14172	Factor de crecimiento de fibroblasto 18	Actividad de factor de crecimiento
Gdf5	14563	Factor de crecimiento de diferenciación 5	Señales/Tgfb-Hippo
Pmch	110312	Hormona concentradora de promelanina	Señales de neuropeptido
Sfrp2	20319	Frizzled relacionada con proteína 2	Señales Wnt/BMP
Spp1	20750	Fosfoproteína 1	Señales BMP
Sulf1	240725	Sulfatasa 1	Receptores de señal Wnt/BMP/FGF
Tgfb1	21803	Factor de crecimiento transformante 1	Señales Tgfb
Tgfb2	21808	Factor de crecimiento transformante 2	Señales Tgfb
Tgfb3	21809	Factor de crecimiento transformante 3	Señales Tgfb

Tabla 2. Factores que intervienen en la neurogénesis hallados en el LCR. Imagen tomada y modificada de (103).

La composición del LCR se va a determinar por varios factores, ya sea por el tipo de moléculas que se incorporan del flujo sanguíneo a través del estroma, por señales que provengan del parénquima cerebral y por la producción de moléculas del epitelio del PC (103).

Varios experimentos han evidenciado que las condiciones fisiológicas influyen en la producción de factores de crecimiento como en los experimentos de Baruch y cols. en el 2013 (105), en donde evidenciaron que durante el envejecimiento hay un incremento de INF- γ y que éste provoca una reducción en la producción de BDNF e IGF-1 que finalmente afecta la función cognitiva y la neurogénesis.

Como se ha mencionado, el microambiente en los plexos va a ser determinante para el desarrollo de la neurogénesis; es por ello de gran importancia evaluar el efecto que tienen sobre este sitio los fármacos o terapias que busquen inducirla. Al respecto, actualmente nuestro grupo de investigación ha demostrado que la inmunización con péptidos neurales modificados, promueve una respuesta autorreactiva que induce protección al tejido neural y además neurogénesis (106, 107).

1.3 Autorreactividad protectora

Tradicionalmente la autorreactividad era considerada como un mecanismo en el que el reconocimiento de auto-antígenos regularmente conducía al desarrollo de enfermedades autoinmunes; sin embargo, desde hace ya unas décadas se sabe que en la respuesta inmunológica donde intervienen células T CD4⁺ que reconocen auto-antígenos del SNC, se activa un mecanismo de protección, mantenimiento y reparación del cuerpo en la salud y la enfermedad (80) a éste mecanismo se le nombró autorreactividad protectora y actualmente se considera como una respuesta fisiológica de nuestro cuerpo a una lesión del SNC.

Bajo este contexto se desarrollaron varios experimentos donde se demostraba que las células T específicas contra algún componente del SNC son necesarias para ejercer la neuroprotección ya sea en lesiones post-traumáticas (108) o en patologías de carácter inflamatorio (109); y que este tipo de neuroprotección podía estimularse utilizando péptidos no encefalitogénicos con el objetivo de potenciar el efecto benéfico, tal es el caso del Copolimero-1 (Cop-1) que se probó su efecto en modelos como encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE) (110), trauma craneoencefálico (111), isquemia cerebral (106), etc.; y el péptido A-91 probado en lesión de médula espinal (112); el péptido MOG, evaluado en isquemia cerebral (113), etc.

Evidencias experimentales, han demostrado que la autorreactividad protectora es capaz de inducir diversos efectos benéficos (114): a) las células inmunes circulantes (las células T CD4+) que reconocen antígenos cerebrales participan en la plasticidad del cerebro en la salud y la enfermedad; b) las células inmunes tienen la habilidad de producir diversos factores que intervienen en la neuroprotección y neurorestauración (80); c) las células inmunes innatas del SNC interactúan con la inmunidad adaptativa y esta interacción puede promover la neuroprotección del tejido cerebral (115); d) las células inmunes pueden pasar al cerebro a través de la barrera hematoencefálica y obtener acceso al cerebro sano sin entrar en el parénquima (116); e) la carencia de linfocitos T o linfocitos T autorreactivos reducen la proliferación de células progenitoras neurales conduciendo a la disminución de nuevas neuronas en el cerebro adulto (117); f) las células T autorreactivas son indispensables para el desarrollo de habilidades cognitivas incluyendo la memoria, el aprendizaje espacial y la expresión de genes que codifican proteínas relacionadas con la actividad presináptica (118).

De acuerdo a las evidencias anteriores, el equipo de Schwartz y cols. en el 2013 plantearon que los plexos coroideos son la zona donde debe existir esa comunicación indispensable entre el cerebro y sistema inmune periférico (80), específicamente los linfocitos T CD4+ autorreactivos; y se ha planteado que es ahí donde debe existir una población de células bajo un estricto control inmunológico que permitan mantener la homeostasis entre el sistema inmune y el SNC para tener un funcionamiento adecuado del cerebro (105).

En este sentido, Baruch y cols. en el 2013 demostraron que las células T de memoria de tipo efector que se hallan en el plexo coroideo cambian durante el envejecimiento facilitando el deterioro cognitivo (105).

Hasta hoy, no se ha descrito detalladamente el mecanismo por el que las células inmunes que se encuentran en estas zonas en individuos sanos permitan mantener la homeostasis o induzcan la neuroprotección y/o neurorestauración; ni cómo estas

células se modifican durante alguna lesión en el SNC o durante la inmunización con algún péptido neural modificado como Cop-1.

1.3.1 Copolímero-1

El Cop-1, nombrado también acetato de glatiramer o Copaxona es un antagonista del epítipo 82-100 de la proteína básica de la mielina (PBM), la cual se encuentra ampliamente dispersa cuando existe alguna lesión en el SNC, este péptido no posee características encefalitogénicas y al competir con la PBM por el sitio de unión de moléculas de MHC tipo II induce la inhibición de la producción de citocinas pro-inflamatorias y con ello limita el desarrollo de una inflamación exacerbada después de una lesión (119).

Cop-1 está aprobado por la Food and Drug Administration (FDA) para el tratamiento de la esclerosis múltiple, funciona como un autoantígeno no encefalitogénico que potencia la autorreactividad protectora; por lo que ha mostrado la capacidad de reducir la degeneración secundaria en tejido neural y de promover la recuperación motora en varios modelos experimentales como trauma craneoencefálico (111), isquemia cerebral (106), Alzheimer (120), etc.

El mecanismo de acción sólo se ha descrito para esclerosis múltiple y en él se indica que el copolímero posee una mayor afinidad por moléculas de MHCII que la PBM u otros péptidos encefalitogénicos como la proteína de oligodendrocito de mielina (MOG), induce la desviación del fenotipo Th1 a Th2 y Treg a través de la reducción de la expresión de INF- γ , TNF- α e IL-12; el cambio de fenotipo induce la producción de IL-4, 5, 10, 13, 27 y TGF- β ; también hay evidencias que Cop-1 aumenta la frecuencia de células Treg y provoca la disminución de IL-17 (Fig. 22) (121).

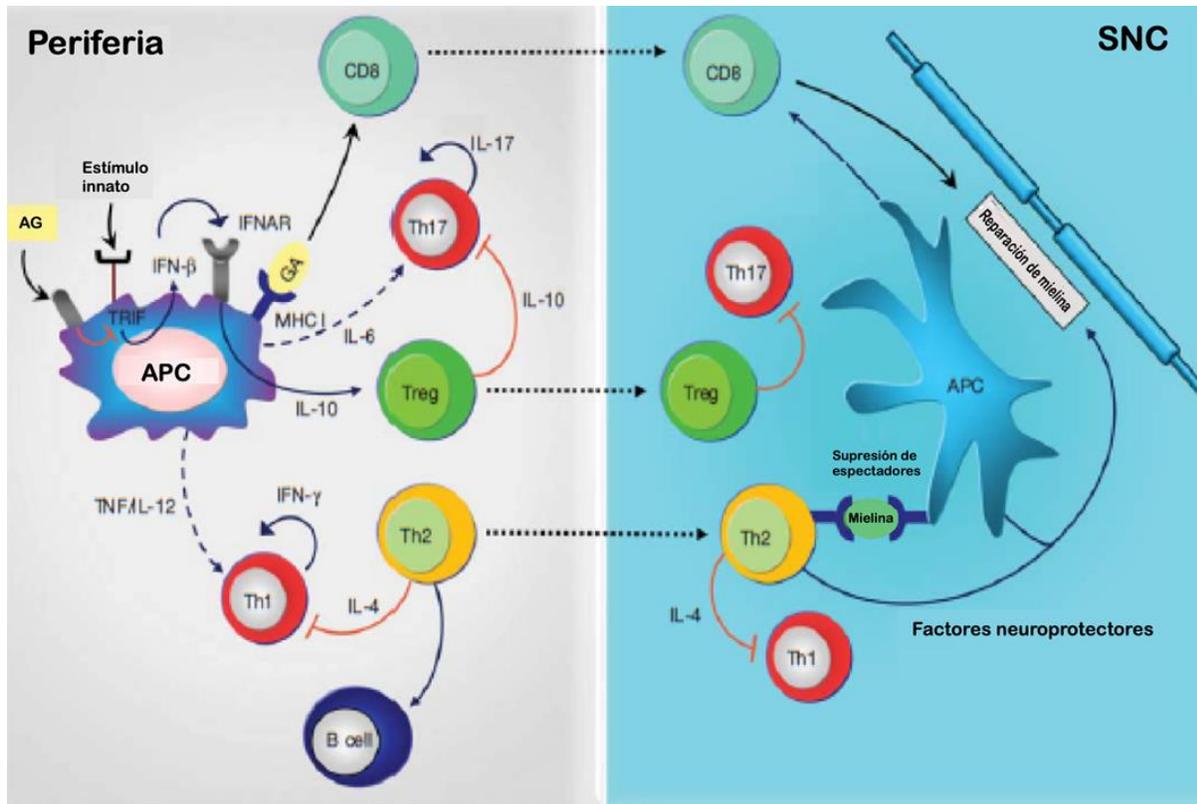


Fig. 22. Mecanismo de acción de Cop-1. Imagen tomada y modificada de Prod'homme (121).

La capacidad de inducir la liberación de citocinas con un fenotipo Th2 (anti-inflamatorio) le otorga la capacidad neuroprotectora; además de que presenta la cualidad de inducir la liberación de factores neurotróficos como el BDNF, IGF-I, NT-3 y 4 (Neurotrofinas 3 y 4) en modelos como la EAE (122) y esquizofrenia (123); misma que se ha probado en patologías como la isquemia cerebral focal con reperfusión donde mostró una reducción significativa del tamaño del infarto (106) y recientemente nuestro equipo de trabajo demostró que también induce neurogénesis en la ZSV, ZSG del giro dentado hipocampal y corteza cerebral en el mismo modelo (107).

1.3.2 Cop-1 y la neurogénesis en isquemia cerebral.

Durante los últimos años, al buscar alguna alternativa terapéutica para tratar a los pacientes isquémicos, se propuso explorar la restauración del tejido lesionado como posible mecanismo para poder aminorar los efectos dañinos. Es por ello, que se estudian métodos para inducir dicha restauración y uno de ellos es la autorreactividad protectora.

Desde el año 2007, Ibarra y sus colaboradores demostraron que al utilizar el péptido Cop-1 como regulador de autorreactividad, se puede evitar el incremento expansivo del área de infarto (106).

Cop-1, en otros modelos como la EAE (122, 124) y esquizofrenia (123) ya había demostrado ser capaz de inducir factores neurotróficos que participan en el desarrollo de la neurogénesis; al igual que en el modelo de isquemia cerebral, donde se demostró que es capaz de incrementar la neurogénesis en la ZSV, ZSG del giro dentado hipocampal y en la periferia del infarto, junto con el incremento de los factores neurotróficos BDNF y NT-3 (107).

Al momento, no se conocen los mecanismos por medio de los cuales las células inmunes presentes en los nichos inmunológicos, como los plexos coroideos, participan ya sea promoviendo la regulación de moléculas que afecten a las células precursoras de neuronas, reclutando a otras células que ayuden a mantener el diálogo con las células del parénquima cerebral implicadas en la neurogénesis o bien, sufriendo modificaciones a través de la inmunización con Cop-1 y con ello facilitar la neurogénesis y la recuperación motora después de la isquemia.

2. JUSTIFICACIÓN

La isquemia cerebral es un problema de salud que afecta casi al 3% de la población mundial causando importantes secuelas motoras que en muchas ocasiones originan invalidez. Durante la última década han sido investigados diversos fármacos con propiedades neuroprotectoras y neurorestauradoras, sin embargo, hasta el momento los resultados obtenidos han sido muy limitados y no existen tratamientos satisfactorios que ayuden a restaurar el daño neural.

La inmunización con péptidos neurales modificados (activación de la autoreactividad protectora) como Cop-1, ha brindado resultados alentadores ya que se basa en la estimulación y modulación de una respuesta propia del organismo que por sus características, ha demostrado ser capaz de incrementar la producción de factores neurotróficos facilitando con ello, el desarrollo de la neurogénesis y la posible restauración del tejido neural.

Recientemente se ha demostrado que la autorreactividad protectora participa en procesos fisiológicos normales y durante el desarrollo de las patologías; por lo que es de suma importancia entender la comunicación que existe entre el parénquima cerebral y los diferentes tipos celulares inmunológicos que se hallan en los plexos coroideos. Sin embargo, a la fecha se sabe muy poco acerca de cómo se realiza esa comunicación y cómo ésta determina procesos como la neurogénesis.

El presente proyecto, busca contribuir al entendimiento de cómo se realiza la comunicación celular entre el sistema inmune y el sistema nervioso central después de un evento isquémico y cómo la inmunización con Cop-1 participa en ese proceso; del mismo modo, esto será de gran utilidad para el mejor conocimiento de los mecanismos inmunes partícipes en la neurogénesis, mismos que podrán ser aprovechados para mejorar la restauración neural y así brindar a los paciente una alternativa terapéutica.

3. PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN

¿Cuáles son los cambios microambientales y las diferentes estirpes celulares en los plexos coroideos de animales sometidos a isquemia cerebral focal?

¿Cuáles son los cambios microambientales y su relación con las diferentes estirpes celulares en los plexos coroideos en animales con isquemia cerebral focal inmunizados o no con Cop-1?

¿El incremento o la disminución de alguna de las estirpes celulares correlacionan con el incremento en la neurogénesis de los animales inmunizados con Cop-1?

¿Cuál es el cambio microambiental que correlaciona con el incremento en la neurogénesis de animales con isquemia cerebral inmunizados con Cop-1?

4. HIPÓTESIS

Habrà una correlaci3n entre la neurogénesis y, los cambios celulares y el microambiente en el plexo coroideo despu3s de la isquemia cerebral en animales inmunizados con Cop-1.

5. OBJETIVO GENERAL

Correlacionar los cambios microambientales y de estirpes celulares en los plexos coroideos con la neurogénesis en ratas isquémicas e inmunomoduladas por Cop-1.

5.1 Objetivos particulares

- Evaluar la neurogénesis en la zona subventricular y del giro dentado hipocampal en ratas sometidas a isquemia sin tratamiento y ratas con isquemia inmunizadas con Cop-1.
- Caracterizar y cuantificar el microambiente en los plexos coroideos en ratas con isquemia cerebral sin tratamiento e inmunizadas con Cop-1.
- Correlacionar los cambios microambientales de los plexos coroideos con la neurogénesis en ratas sometidas a isquemia e inmunizadas con Cop-1.
- Caracterizar las estirpes celulares en los plexos coroideos en ratas sometidas a isquemia cerebral sin tratamiento e inmunizadas con Cop-1.
- Correlacionar la caracterización celular de los plexos coroideos con la neurogénesis en ratas con isquemia sin tratamiento e inmunizadas con Cop-1.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Diseño experimental

Se desarrollaron tres experimentos. En el primero se determinó el déficit neurológico y la neurogénesis, en el segundo experimento se evaluó el microambiente a través del análisis de expresión génica de varias citocinas y factores de crecimiento y en el último experimento se cuantificaron los tipos celulares en el LCR. Todos se realizaron en ratas de la cepa Sprague Dawley, machos con un peso aproximado entre 320-350g; en total se utilizaron 76 ratas.

Tamaño de la muestra: se utilizaron en total 76 ratas macho, 19 ratas por cada grupo. De esas 19 ratas, 9 se utilizaron para la caracterización de células inmunes a través de citometría de flujo, 5 para evaluar neurogénesis, y los 5 restantes para la análisis de expresión de citocinas y factores de crecimiento.

El tamaño de la muestra se determinó mediante la fórmula (125), en donde se tomaron en cuenta los siguientes valores: $\alpha = 0.05$ ($Z_{\alpha} = 1.96$); $\beta = 0.1$ ($Z_{\beta} = 1.28$) y una diferencia entre los grupos con inmunización activa y el grupo testigo (sin tratamiento) del 30%.

Los grupos se clasificarán de la siguiente forma:

Grupo 1: ratas con isquemia cerebral, grupo Control (n=19)

Grupo 2: ratas con isquemia cerebral + Cop-1 + SS (n=19)

Grupo 3: ratas con isquemia cerebral + Cop-1 + ACF (n=19)

Grupo 4: ratas con isquemia cerebral + ACF + SS (n=19)

Nota: Al grupo 3 y 4 se les aplicó la inmunización acompañada con ACF (adjuvante completo de Freund), el cual contiene 5 mg/ml de *Mycobacterium tuberculosis*, con la finalidad de exacerbar la respuesta inmune.

6.1.2 Dosis y tratamiento

Se utilizó una dosis de 250µg de Cop-1 en un volumen total de 150µL para cada rata. Tanto la SS y el ACF se aplicaron en igual volumen que el Cop-1. Las emulsiones fueron inyectadas en la región interescapular vía subcutánea (sc) inmediatamente después de la reperusión (106).

6.1.3 Modelo quirúrgico de isquemia cerebral

A las ratas se les anestesió inicialmente con isofluorano al 3% hasta alcanzar un estado de anestesia profundo; posteriormente se redujo al 1.5% con el fin de mantener la anestesia. Se colocó al animal en decúbito dorsal y se realizó una incisión quirúrgica en la piel a nivel de la región cervical ventral de aproximadamente 1.5 cm. de largo. Se localizó la arteria carótida común izquierda, arteria carótida interna izquierda y arteria carótida externa izquierda y se disecó cuidadosamente el tejido involucrado con el nervio vago. Se ubicó la arteria pterigoidea y la occipital, y se cauterizaron. La porción distal de la arteria carótida externa a nivel proximal se ligó (126).

Se flameó por un segundo uno de sus extremos de una sutura de nylon calibre 3-0 para engrosar el mismo y así se introdujo en el lumen de la arteria carótida externa en dirección de la arteria carótida interna. La sutura avanzó 18 mm aproximadamente hasta llegar el émbolo donde la carótida interna se convierte en la arteria cerebral media. Posteriormente se suturó al animal manteniendo ocluida la arteria por 90 min libre de anestesia; después de transcurrido este tiempo, se le anestesió de igual forma con la finalidad de extraer la sutura de nylon permitiendo así la reperusión sanguínea (126).

6.1.3.1 Evaluación neurológica.

Esta evolución se realizó a las 24h, 48h, 72h, 7d y 14d post isquemia. Se utilizó la escala de evaluación funcional descrita por Zea Longa (1989) (127), la cual evalúa la presencia o ausencia de los siguientes signos neurológicos:

0: Sin déficit observable.

1: Flexión de miembros podálicos anteriores.

2: Vueltas continuas unidireccionales.

3: Caída hacia el lado contra-lateral.

4: Disminución o ausencia del estado de conciencia.

5: Muerte.

6.1.4 Cuantificación celular del LCR por citometría de flujo.

De cada grupo se tomaron 9 ratas al azar, a las cuales se les extrajo LCR de la cisterna magna (Zarghami A., 2013), de cada rata se obtuvieron aproximadamente 200µl de LCR, este debía estar completamente transparente, aquel que se mostró con sangre fue desechado. Se unieron los LCR's de tres ratas para formar un pull, éste fue centrifugado por 3 min a 2500 rpm, se decantó el sobrenadante, al botón se le agregó 1ml de solución de lisis y se incubó por 5 min. Posteriormente se centrifugó de nuevo por 10 min a 2500 rpm y se decantó el sobrenadante, se le agregó 100µl de PBS, se centrifugó por 5 min, se decantó y se distribuyó el resto del contenido del tubo en 5 tubos (a cada tubo se le agregaron 25µl). Se incubaron los anticuerpos por 30 min. Después se agregaron 500µl de PBS, se centrifugó por 5 min, se decantó, se agregó 150µl de PBS y se leyó inmediatamente en el citómetro FacsAria II. La lista de los anticuerpos y la distribución de los mismos se presentan en la tabla 3. Los plots y análisis de resultados se analizaron en el programa Summit v4.3.

Tipo cel.	Marcador y fluorómetro	Tubo 1	Tubo 2	Tubo 3
Leucocitos	CD45 PE/Cy 7	✓		Sin teñir
Linfocitos	CD3/ FICT	✓	✓	Sin teñir
Linfocitos B	CD19/APC	✓		Sin teñir
NK	CD161/PE	✓		Sin teñir
Ly6G	APC/Cy7	✓		Sin teñir
Linfocitos T CD4+	CD4/ APC		✓	Sin teñir
Linfocitos T CD8+	CD8+/PerCp		✓	Sin teñir
Linfocitos TNK			✓	Sin teñir

Tabla 3. Anticuerpos utilizados en la citometría de flujo.

6.1.5 Caracterización del microambiente.

A cinco ratas de cada grupo se les extrajo el plexo coroideo completo, el cual fue procesado para determinar la expresión de las interleucinas IL-4, IL-10, IL-17, TNF- α e INF- γ y factores de crecimiento: BDNF, IGF-1 y NT-3 mediante la obtención de RNAm, utilizando el método del TRIZOL (128), como se describe a continuación:

- En 300 μ l de TRIZOL se homogeneizó el tejido
- Se agregó 12.5 μ l de glicógeno
- Se puso en vortex de 3-5 seg, se colocó en hielo por 5 min.
- Se agregaron 225 μ l de cloroformo a 4 °C, se colocó en vortex de 8-10 seg y se colocó sobre hielo por 5 min.

-
- Se centrifugó 15min/10 000rpm a 4°C y se obtuvo la fase superior del sobrenadante.
 - Se le agregó 500µl de isopropanol a punto de nieve y se colocó en el vortex de 2-5 seg. Se almacenó por 1 h a -70°C
 - Se centrifugó por 15 min a 10,000 rpm a 4°C y se eliminó el sobrenadante.
 - Se adicionó 1ml de etanol al 80% a 4 °C y se centrifugó 5 min/6,000 rpm a 4°C
 - Se eliminó el etanol, se dio un baño seco de 3 min a 45°C y a T.A. por 15 min en la cámara estéril y se agregó 25µl de agua inyectable.

Posteriormente se evaluó la integridad y pureza por medio de espectrofotometría (EPOCH, BioTek) leyendo a una longitud de onda de 260/ 280nm. Después se realizó la retrotranscripción y la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (PCR-TR) utilizando el tiempo real Cyler 96 (Roche Diagnostics, Indianapolis, USA).

Se realizó la retrotranscripción con 2µg de RNA total y los siguientes componentes: 1µl de Oligo DT, 2µl de dNTP Mix a 10mM y se llevó la mezcla a 12µl de volumen utilizando agua DEPC. Se incubó a 65°C por 5 min, se colocó en el vortex por 5 seg y posteriormente se le agregó la master Mix, la cual contenía: 4µl de buffer de reacción, 1µl de DTT 0.1M, 1µl de RNAsaOUT, 1µl de agua DEPC y 1µl de la enzima Thermo Scrypt. La mezcla final fue incubada a 25°C por 30 min, posteriormente a 55°C por 50min y posteriormente a 85°C por 5 min.

Los primers fueron diseñados utilizando el programa Custom Primers OligoPerfect™ <http://tools.invitrogen.com> y analizados por el software “Oligo” (Molecular Biology Insights, INC). Las características de cada primer para cada gen se muestran en la tabla 4. Las reacciones se realizaron con el FastStart Essential Kit DNA Green Master (Roche, Diagnostics, Indianapolis, USA).

Para la PCR en tiempo real, se realizó la siguiente mezcla: 1.0 µl de mezcla de primers (0.5 cadena F y 0.5 cadena R), 2µl de FastStart Essential DNA Green Master y 1µl de cDNA. Las condiciones de programación del tiempo real fueron las siguientes: 1 ciclo de

desnaturalización a 95°C por 10 min, seguido por 40 ciclos que incluyen un primer ciclo de desnaturalización a 95°C por 10 seg. alineación a 60°C por 10 seg y elongación a 72°C por 10 seg, a melting curvea 65°C por 60seg y un paso de enfriamiento a 40°C por 30seg.

Todos los grupos se compararon con animales control. Las expresiones se obtuvieron por duplicado y el promedio de la expresión fue el analizado. Los valores obtenidos fueron normalizados utilizando como gen constitutivo HPRT y analizados utilizando el método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (129)

Primer para Tiempo Real			
GEN	GENBANK	SECUENCIA	AMPLICON.
IL-4	MN_201270	F gaaaaagggactccatgcac R tcttcaagcacggagggtaca	145 pb
IL-10	MN_012854	F aaggaccagctggacaacat R tctcccaggaattcaaatg	170 pb
1L-1 β	MN_031512	F aggacccaagcaccttcttt R agacagcacgaggcattttt	152 pb
TNF- α	MN_012675	F tgacccccattactctgacc R ttcagcgtctcgtgtgtttc	152 pb
INF- γ	MN_138880	F agcatggatgctatggaagg R ctgatggcctggttgtcttt	146 pb
BDNF	MN_001270630	F tggcctaacaatgtttgcag R cagctccaacttagcctccac	114 pb
IL-17	MN_001106897	F actttccgggtggagaagat R cttaggggctagcctcaggt	104 pb
IGF-1	MN_001082477	r cttaggggctagcctcaggt R gttccgatgttttgcagggt	158 pb
NT-3	MN_031073 MN_001270868 MN_001270870	F gggggattgatgacaaacac R gggggattgatgacaaacac	135 pb

Tabla 4. Primers utilizados en el análisis de expresión génica.

6.1.6 Evaluación de la neurogénesis

Se destinaron 5 ratas para la inmunofluorescencia, de cada cerebro se realizaron cortes a 20 μm de la zona subventricular y giro dentado hipocampal, para ello, tres días antes del sacrificio las ratas recibieron una dosis de 50 mg por cada kg de peso de la rata de manera intraperitoneal de 5-bromo-2'-deoxiuridina (BrdU) (abcam cat.ab142567) cada 12 h hasta el día del sacrificio. El BrdU, es un análogo de la timidina que se incorpora al ADN durante la fase S del ciclo celular y permite marcar tanto células proliferativas como su progenie.

Dos h después de la última inyección de BrdU, los animales se anestesiaron con Pentobarbital sódico (40 mg/Kg vía intraperitoneal) una vez anestesiados, se les administró 1000 UI de Heparina vía Intraperitoneal para evitar la activación de los factores de coagulación que pudieran interferir con el proceso de perfusión tisular; 20 min después, se perfundió a los animales a través de la arteria aorta con solución salina y después con paraformaldehído al 4%. Los cerebros fueron extraídos y post-fijados en paraformaldehído durante 24 h a temperatura ambiente. Una vez fijados, se colocaron en una solución crioprotectora de sacarosa al 30% por 3 días.

Se realizaron cortes coronales por congelación de 20 μm de grosor espaciadas cada 200 μm , los cortes iniciaron en el plano interaural 10.44 mm y 1.44 mm de Bregma (ZSV). Los cortes de la ZSG, se obtuvieron a partir de las coordenadas 6.00mm interaural y -3.00 en Bregma (130).

Los cortes se colocaron en placas de 24 pozos con solución de Buffer y se inició con el método de inmunofluorescencia en donde se marcaron células BrdU+/DCX+ utilizando los anticuerpos que se muestran en la tabla 5.

<i>REACTIVO</i>	<i>MARCA</i>	<i>DILUCIÓN</i>
<i>Anticuerpos Primarios:</i>		
Anti-BrdU hecho en ratón	Roche (cat 11 296 735 001) Kit I Marcaje y detección BrdU	1:250
Anti DCX hecho en cabra	Santa Cruz (cat Sc-8066)	1:250
<i>Anticuerpos Secundarios</i>		
Alexa Fluor 488 anti-ratón IgG hecho en burro	Invitogen (cat. A21202)	1:500
Alexa Fluor 568 anti cabra IgG hecho en conejo	Invitogen (cat. A11079)	1:500

Tabla 5. Anticuerpos utilizados para determinar neurogénesis.

Las laminillas fueron observadas en un microscopio confocal (Olympus Fluo View-1000) a un aumento de 20X. Por cada corte se capturaron las imágenes de los ventrículos laterales y del hipocampo. Los neuroblastos se identificaron por la presencia de BrdU+/DCX+ a un aumento de 60X. Mediante el procesador de imágenes FW10-ASW 1.7 Viewer (Olympus), se realizó el traslape de los tres marcadores. Se cuantificaron las células BrdU+/CDX+ para la ZSV y ZSG utilizando el procesador de imágenes, Image Pro Plus (Media Cybernetics versión 7), y se obtuvo la media de 9 cortes de cada región.

6.1.7 Método estadístico

Se realizó un análisis descriptivo de todos los grupos y se verificó la distribución de los datos bajo la curva de normalidad. Se aplicó la prueba estadística no paramétrica de Kruskal-Wallis y la prueba de Dunn's para comparar los grupos.

Para conocer la correlación entre la neurogénesis y el microambiente de los Plexos, se realizó la prueba de correlación de Spearman.

Los datos se mostraron con la $\bar{X} \pm SD$ (desviación estándar) o $\bar{X} \pm EE$ (error estándar) con un valor de significancia estadística de $p < 0.05$.

7. RESULTADOS

7.1 Cop-1 promueve la recuperación neurológica después de la Isquemia

Las evaluaciones neurológicas se realizaron posteriores a la isquemia y se recuperaron de la anestesia; la escala de déficit neurológico que se utilizó fue la de Zea Longa (130), todos obtuvieron una puntuación de 4. Las evaluaciones realizadas a las 24 h, 48h y 72h no muestran ninguna diferencia significativa. Las evaluaciones a 7 días indican una recuperación significativa del grupo tratado con Cop-1+ACF comparado con el grupo Control (1.4 ± 0.24 vs 3.0 ± 0.0 ; $p < 0.5$) también del grupo Cop-1+ACF comparado con el grupo ACF+SS (1.4 ± 0.24 vs 3.2 ± 0.2 ; $p < 0.5$, Fig. 23). La disminución del déficit neurológico se mostró más pronunciado a los 14 días post-isquemia obteniendo una significancia del grupo Cop-1+ACF comparado con el grupo Control (1.2 ± 2.0 vs 2.6 ± 0.24 ; $p < 0.05$) y también al ser comparado con el grupo ACF+SS (1.2 ± 2.0 vs 2.8 ± 0.2 ; $p < 0.001$; Fig.23)

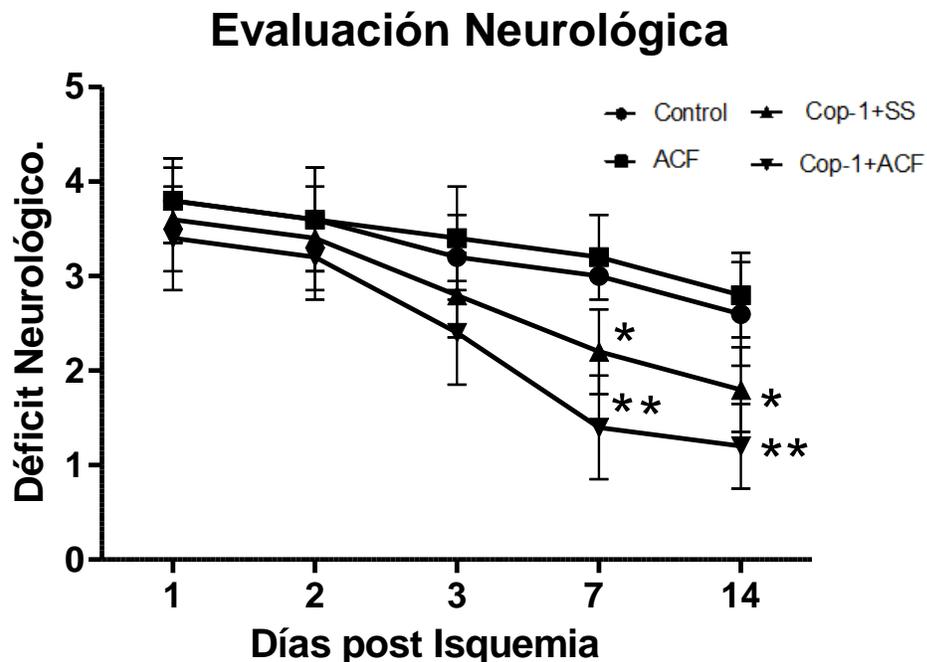


Fig. 23. Déficit neurológico de ratas sometidas a isquemia cerebral a las 24h, 48h, 72h, 7 días y 14 días post-isquemia. $n=5$ Media \pm SD. * $p < 0.05$ Control vs Cop-1+ACF, ** $p = 0.01$ ACF+SS vs Cop-1+ACF a 7 días. * $p < 0.05$ Control vs Cop-1+ACF, ** $p < 0.01$ ACF+SS vs Cop-1+ACF a 14 días. Kruskal Wallis seguida de la prueba de Dunn's. ACF, Adyuvante completo de Freund. SS, solución salina.

7.2 La inmunización con Cop-1 incrementa la Neurogénesis en la ZSV y ZSG

En el cerebro adulto existen dos sitios que se consideran neurogénicos, la pared de los ventrículos laterales considerada ZSV (88) y la zona ZSG del hipocampo (131); en estas regiones se encuentran las células madre neurales (NSC) que al ser estimuladas correctamente son capaces de generar nuevas neuronas aún en tejidos lesionados.

Para evaluar el efecto de Cop-1 sobre la neurogénesis se realizó el doble marcaje utilizando BrdU (nucleótido sintético análogo de la timidina que se incorpora durante la fase S del ciclo celular) y Doublecortina (DCX, proteína asociada a los microtúbulos de las neuronas necesaria para su migración); las células positivas BrdU+/CDX+ se contaron en la ZSV y ZSG a los 14 días post-isquemia (Fig. 24 B).

En la ZSV, los grupos tratados con Cop-1 presentaron un número significativamente mayor de neuroblastos (Fig. 24A) comparados con el grupo control (327.3 ± 7.164 Cop-1+ACF; 279.7 ± 7.15 Cop+SS vs 187.7 ± 9.52 Control; $p < 0.0001$), estos grupos de Cop-1 también exhibieron diferencia significativa al ser comparados con el grupo ACF+SS (187.7 ± 9.521 , $*p < 0.0001$) y entre ellos mismos (Fig. 24 A).

Neurogénesis en la ZSV

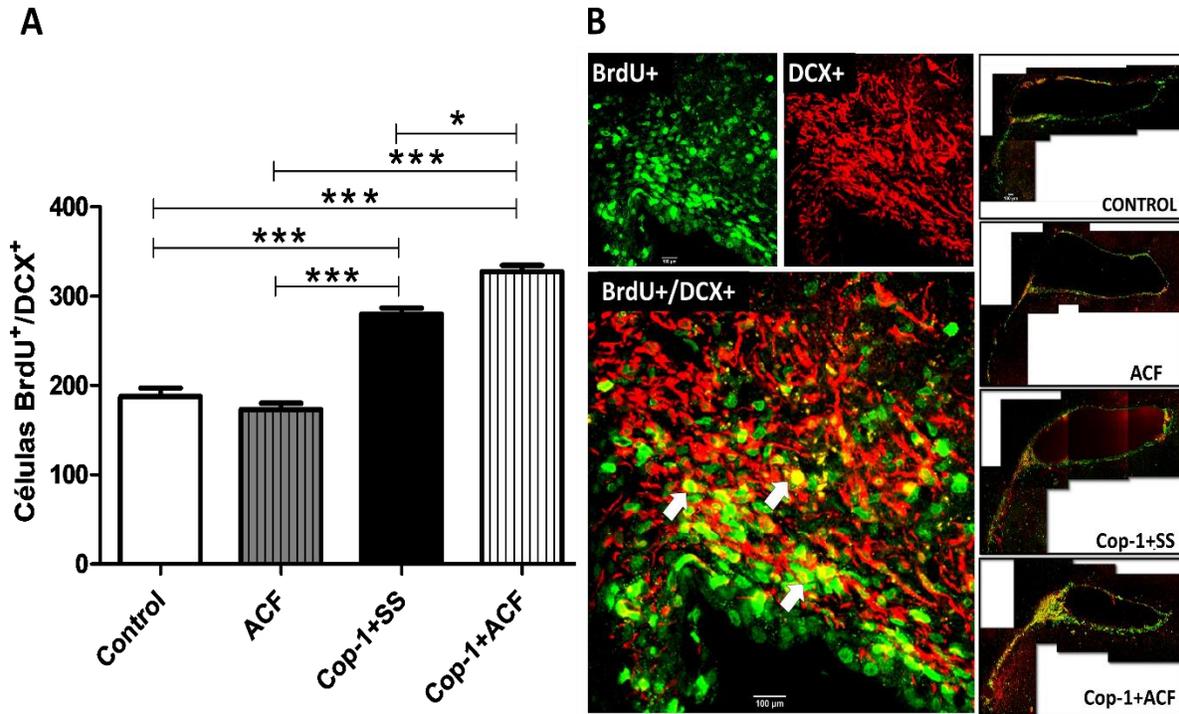


Fig. 24 Neurogénesis en la ZSV a 14 días post-isquemia. A) Cuantificación de células BrdU+/DCX+. n=5 Media \pm SD. * p <0.05; *** p <0.0001. Kruskal Wallis seguida de la prueba post-hoc de Dunn's. B) Del lado derecho se muestran las células BrdU+/DCX+ en cada uno de los grupos. Imágenes a 20X. Del lado izquierdo se muestran células BrdU+, DCX+ y BrdU+/DCX+. Las flechas señalan neuroblastos. Imágenes a 60X. ACF, adyuvante completo de Freund. SS, solución salina.

En el caso de la ZSG, la cantidad de neuroblastos también fue significativamente mayor en los grupos tratados con Cop-1 (Fig. 25 A) al ser comparados tanto con el grupo Control como con el grupo ACF+SS (52.37 \pm 2.35 Cop-1+ACF; 36.85 \pm 2.41 Cop-1+SS vs 28.22 \pm 1.40 Control; 22.17 \pm 1.28 ACF+SS).

Neurogénesis en la ZSG

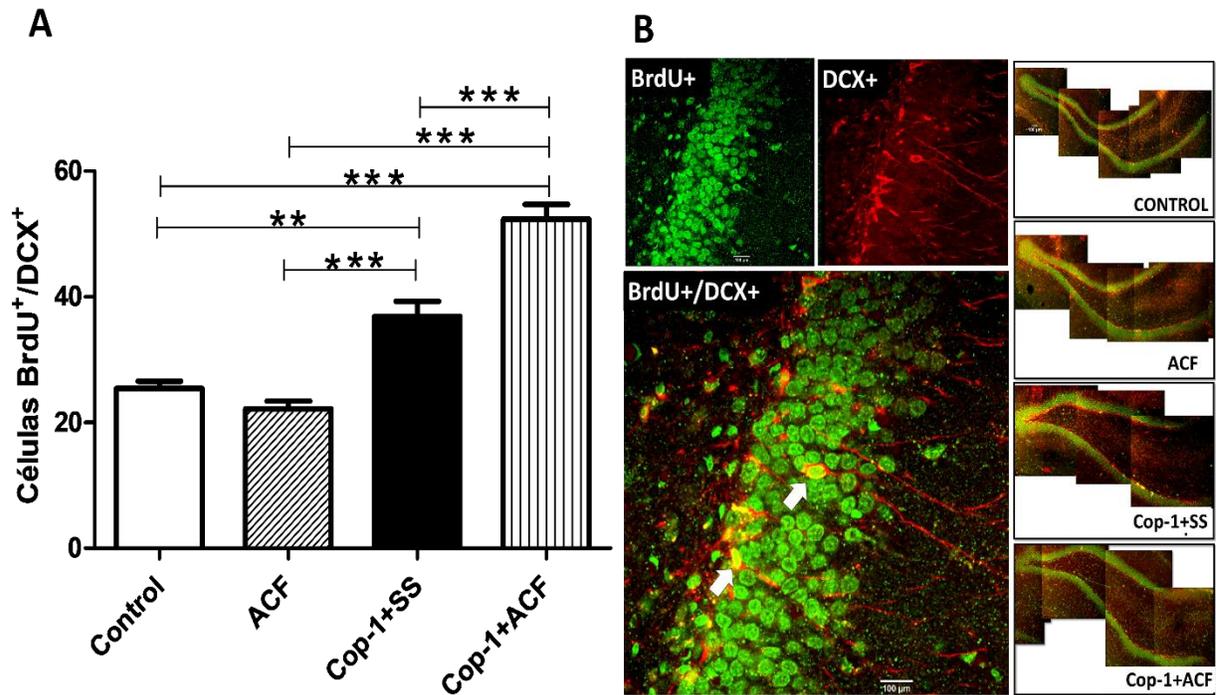


Fig 25 Neurogénesis en la ZSG a 14 días post-isquemia. A) Cuantificación de células BrdU⁺/DCX⁺, n=5 Media ± SD. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.0001$. Kruskal Wallis seguida de la prueba pos-hoc de Dunn's. B) Del lado derecho se muestran las células BrdU⁺/DCX⁺ en cada uno de los grupos. Imágenes a 20X. Del lado izquierdo se muestran células BrdU⁺, DCX⁺ y BrdU⁺/DCX⁺. Las flechas señalan neuroblastos. Imágenes a 60X. ACF, adyuvante completo de Freund. SS, solución salina.

7.3 La inmunización con Cop-1 incrementa la expresión relativa de IL-10 en los plexos coroideos después de la Isquemia.

Los plexos coroideos forman una estructura que por su localización es considerada como un sitio clave para la comunicación neuroinmune, en esta zona se producen citocinas y factores de crecimiento que intervienen directamente en procesos como la neurogénesis. Por ello, decidimos evaluar si Cop-1 modifica la expresión tanto de citocinas como de factores de crecimiento y si estos intervienen sobre la neurogénesis después de la isquemia. Para ello, decidimos evaluar la expresión génica de citocinas pro inflamatorias (INF- α , TNF- γ , IL-1 β e IL-17) y anti inflamatorias (IL-4 e IL-10).

La expresión de citocinas pro-inflamatorias (INF- α , TNF- α e IL-1 β) se mantuvo sin modificaciones (Fig. 26 A-D); sólo la IL-17 disminuyó de forma significativa en los grupos tratados con Cop-1 respecto al Control (39.19 \pm 5.25 Cop-1+SS; 37.96 \pm 4.3 Cop-1+ACF vs 62.59 \pm 11.3 Control; Fig. 26)

Efecto de Cop-1 en la expresión de citocinas pro-inflamatorias.

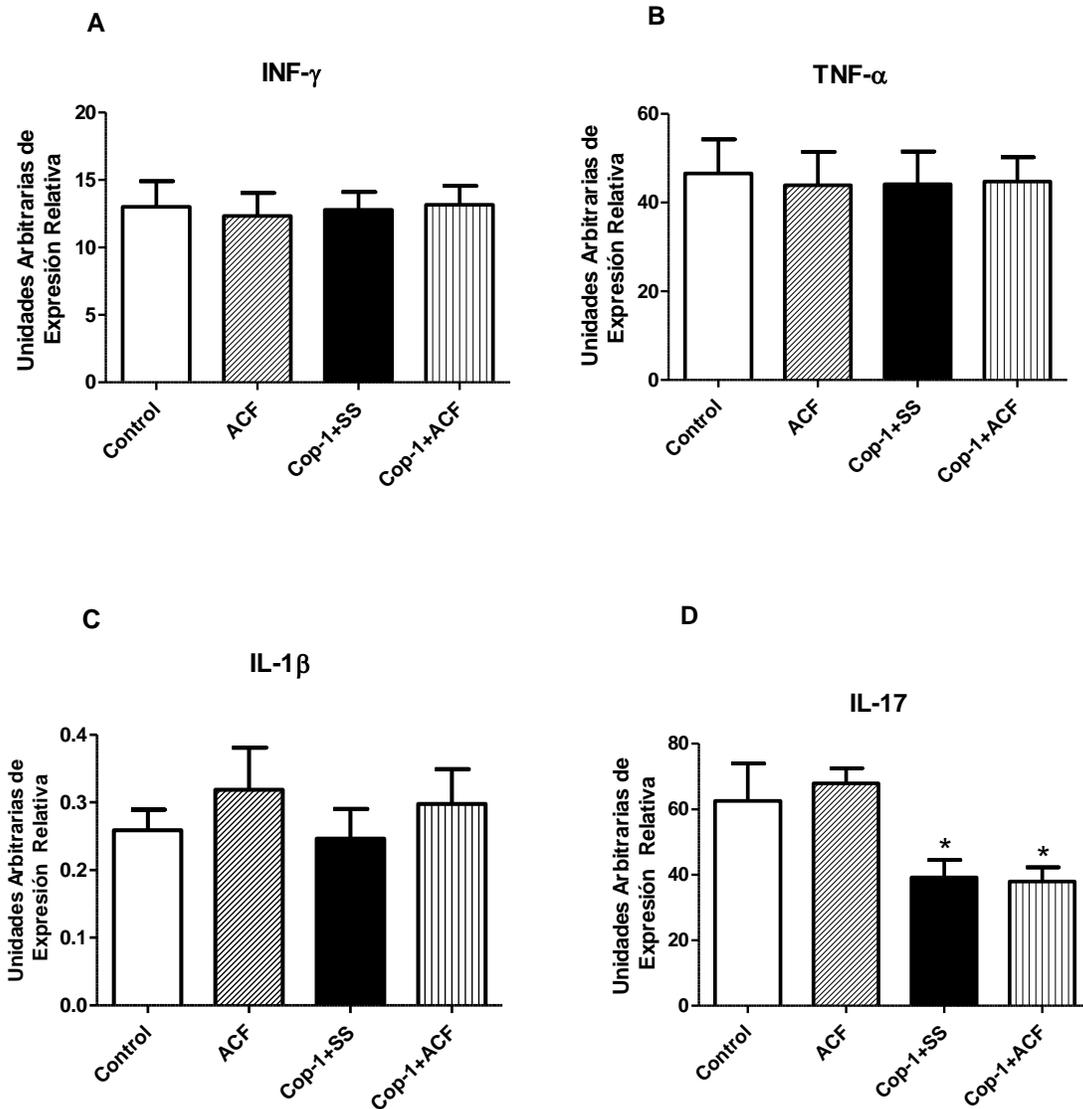


Fig. 26 Efecto de Cop-1 Sobre la expresión de citocinas Pro-inflamatorias. Expresión relativa de los genes INF- γ (A), TNF- α (B), IL-1 β (C) e IL-17 (D). Catorce días post-isquemia. $n=5$. Media \pm EE. * $p < 0.05$ vs Control. Kruskal Wallis seguida de la prueba post hoc de Dunn's. ACF, adyuvante completo de Freund. SS, solución salina. INF- γ , Interferon gama; TNF- α , Factor de necrosis tumoral- α . IL- interleucina.

En el caso de las citocinas anti-inflamatorias, la IL-4 no mostró modificaciones en su expresión después de la inmunización con Cop-1. Fue distinto en el caso de la IL-10 ya que ésta se incrementó significativamente respecto al grupo control (4.14 ± 0.81 Cop-1+SS; 4.60 ± 0.38 Cop-1+ACF; vs 0.661 ± 0.16 en el grupo control; $p < 0.016$; Fig. 27).

Efecto de Cop-1 en la expresión de citocinas anti-inflamatorias.

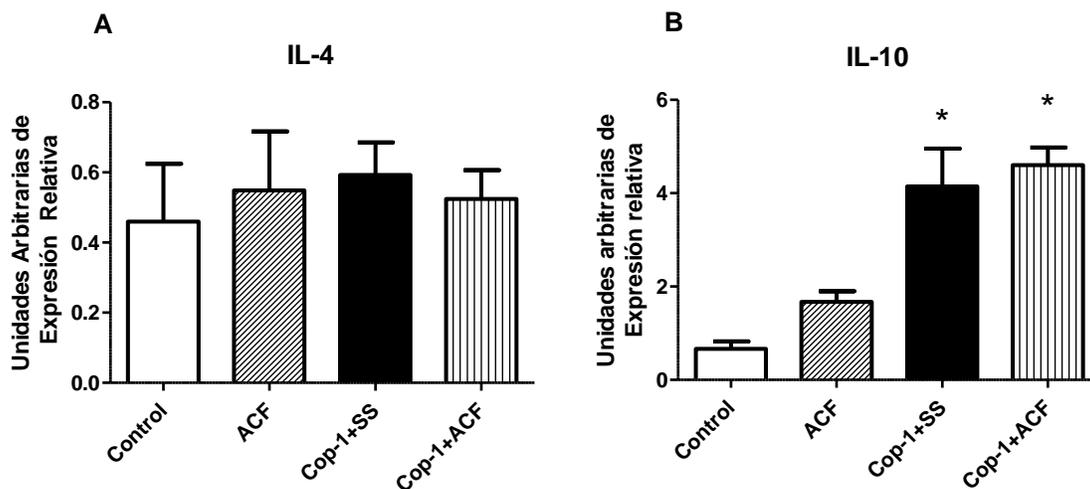


FIG. 27 Efecto de Cop-1 sobre la expresión de citocinas anti-inflamatorias. Expresión relativa de los genes IL-4 A) e IL-10 B) 14 días post-isquemia. $n=5$. Media \pm EE. * $p < 0.05$ vs Control. Kruskal Wallis seguida de la prueba post hoc de Dunn's. ACF, adyuvante completo de Freund. SS, solución salina. IL- interleucina.

7.4 La expresión de BDNF, NT-3, e IGF-1 es incrementada por la inmunización de Cop-1 después de la Isquemia.

La expresión de los factores de crecimiento BDNF, NT-3 e IGF-1 también fueron evaluados ya que se sabe que son factores importantes que pueden intervenir en el proceso de la neurogénesis (99).

La expresión relativa de BDNF (0.56 ± 0.16 vs 0.22 ± 0.05 ; $p < 0.05$), NT-3 (6.32 ± 0.81 vs 0.65 ± 0.17 ; $p < 0.0003$) e IGF-1 (0.24 ± 0.01 vs 0.11 ± 0.01 ; $p < 0.028$) se incrementaron de forma significativa respecto al grupo control (Fig. 28). También NT-3 presentó un incremento significativo en los grupos Cop-1+SS y ACF+SS comparados con el Control (2.40 ± 0.31 ; $p < 0.0013$; 1.69 ± 0.44 ; $p < 0.021$ vs 0.65 ± 0.17), y se mostraron diferencias del mismo orden entre los grupos Cop-1+ACF y Cop-1+SS (0.24 ± 0.01 vs 2.40 ± 0.31 ; $p < 0.001$; Fig. 28).

Efecto de Cop-1 en la expresión de factores de crecimiento.

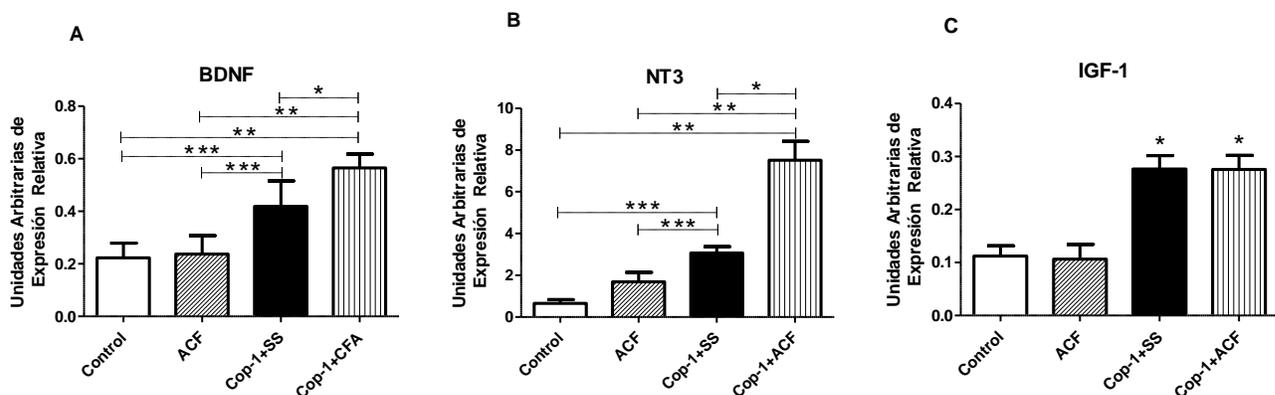


Fig 28. Efecto de Cop-1 sobre la expresión de factores de crecimiento. Expresión relativa del gen BDNF (A), NT-3 (B) e IGF-1 (C) 14 días después de la isquemia. n=5 Media \pm SD. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.0001$. Kruskal Wallis seguida de Dunn's. ACF, adyuvante completo de Freund. SS, solución salina. BDNF, Factor neurotrófico derivado del cerebro. IGF-1, Factor de crecimiento parecido a la insulina, NT-3, Neurotrofina-3.

7.5 Correlación de la neurogénesis con la IL-10 y los factores de crecimiento.

Después de observar el incremento significativo en la expresión génica de la IL-10 y los factores de crecimiento (BDNF, NT-3 e IGF-1), decidimos conocer si existe una relación directa de la expresión de estos genes y la neurogénesis del grupo que obtuvo los niveles más altos.

Las pruebas de coeficiente de correlación de Spearman nos indicaron que efectivamente existe una correlación positiva de la IL-10 con la neurogénesis tanto en la ZSV como en la ZSG ($r = 0.90$, $p < 0.01$; y $r = 0.90$ $p < 0.008$ respectivamente; Fig. 29). Lo mismo ocurrió para los factores de crecimiento BDNF ($r = 0.90$, $p < 0.04$ tanto en la ZSV como en la ZSG) y NT-3 ($r = 0.90$, $p < 0.04$ para ambas zonas). En el caso de IGF-1 en los dos sitios neurogénicos se presenta una correlación entre alta a moderada ya que se presentó una $r = 0.78$ ($p < 0.01$) para la ZSV y $r = 0.70$ ($p < 0.05$) para la ZSG (Fig. 29).

Correlación de la IL-10. y factores de crecimiento con la neurogénesis

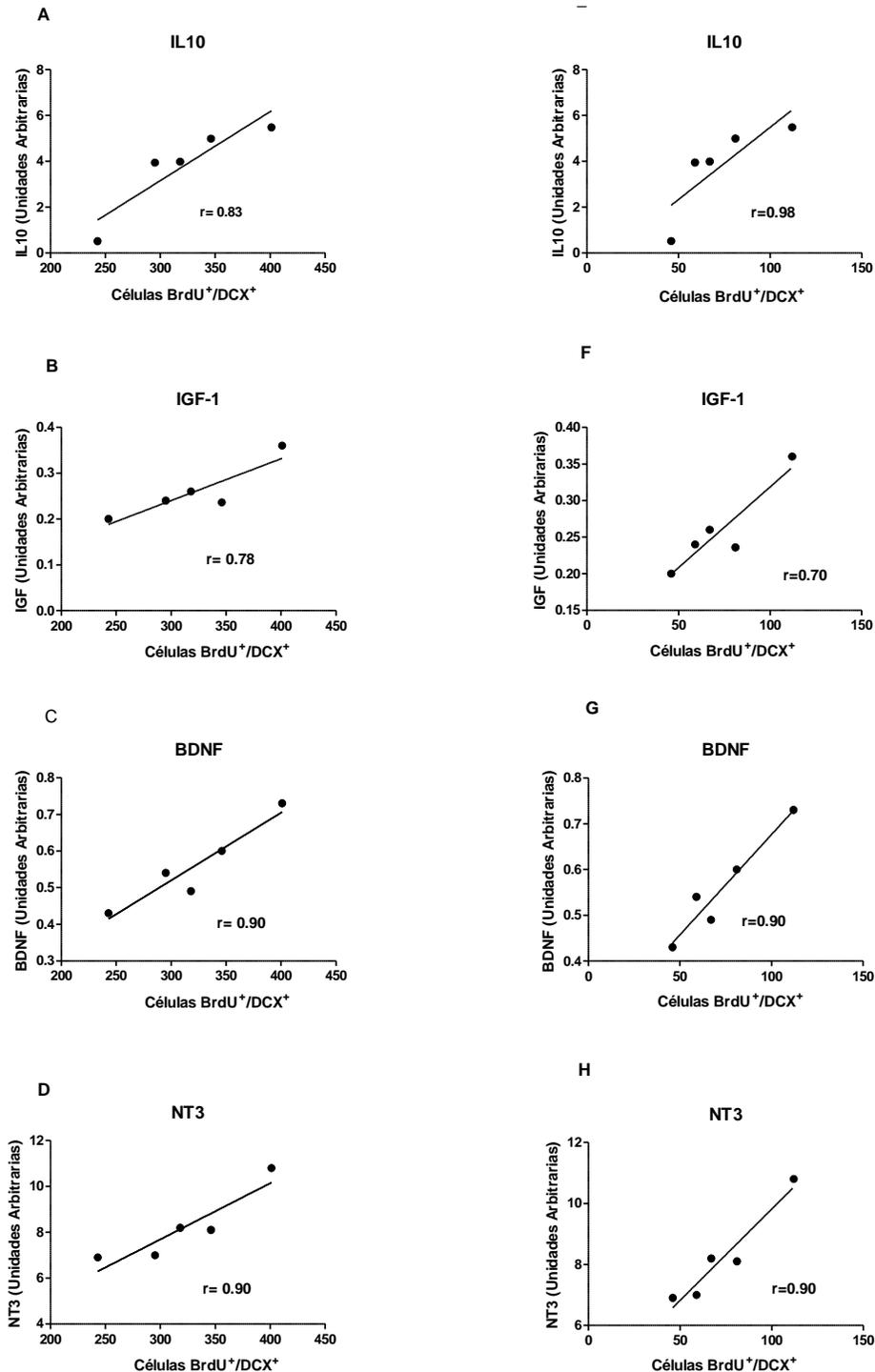


Fig. 29. Correlación de la IL-10 y los factores de crecimiento con la neurogénesis. Correlación de la neurogénesis en la ZSV con la A) IL-10 ($r = 0.90$, $p < 0.01$); B) IGF-1 ($r = 0.78$, $p < 0.01$); C) BDNF ($r = 0.90$, $p < 0.04$) y D) NT-3 ($r = 0.90$, $p < 0.04$). Correlación de la neurogénesis en la ZSG con la E) IL-10 ($r = 0.9$, $p < 0.008$); F) IGF-1 ($r = 0.70$, $p < 0.05$); G) BDNF ($r = 0.9$, $p < 0.04$) y H) NT-3 ($r = 0.90$, $p < 0.04$). Coeficiente de correlación de Spearman. $n = 5$. ZSV, Zona subventricular. ZSG, Zona subgranular. BrdU⁺/DCX⁺, neuroblastos. IL, interleucina. BDNF, Factor neurotrófico del cerebro. IGF-1, Factor de crecimiento parecido a la insulina, NT-3, Neurotrofina-3.

7.6 Efecto de Cop-1 sobre los Leucocitos en el Líquido Cefalorraquídeo.

Con la intención de analizar si Cop-1 es capaz de modificar la cantidad de células inmunes presentes en los plexos coroideos decidimos identificar y cuantificar algunos tipos celulares en el LCR a 14 días post-isquemia.

En la fig. 30, se muestran plots representativos del número de eventos para cada uno de los tipos celulares evaluados. En el análisis encontramos que el porcentaje de células CD45+ que marcan leucocitos se incrementó considerablemente en el grupo tratado con Cop-1+ACF con respecto al control (87.24 ± 0.7983 vs 8.073 ± 5.15 ; $*p < 0.05$; Fig. 31); de esas células el $88.19 \pm 3.1\%$ corresponden a linfocitos T (CD3+) ($p < 0.02$ vs 31.2 ± 1.4 Control). A pesar de que el grupo Cop-1+SS no presentó un incremento considerable de leucocitos con respecto al grupo Control, el $82.27 \pm 1.3\%$ de ellos corresponden a linfocitos T, este porcentaje muestra diferencia significativa respecto al grupo Control (82.27 ± 1.3 vs 31.2 ± 1.4 ; $p < 0.05$; Fig. 31).

Células en líquido cefalorraquídeo en ratas con isquemia cerebral

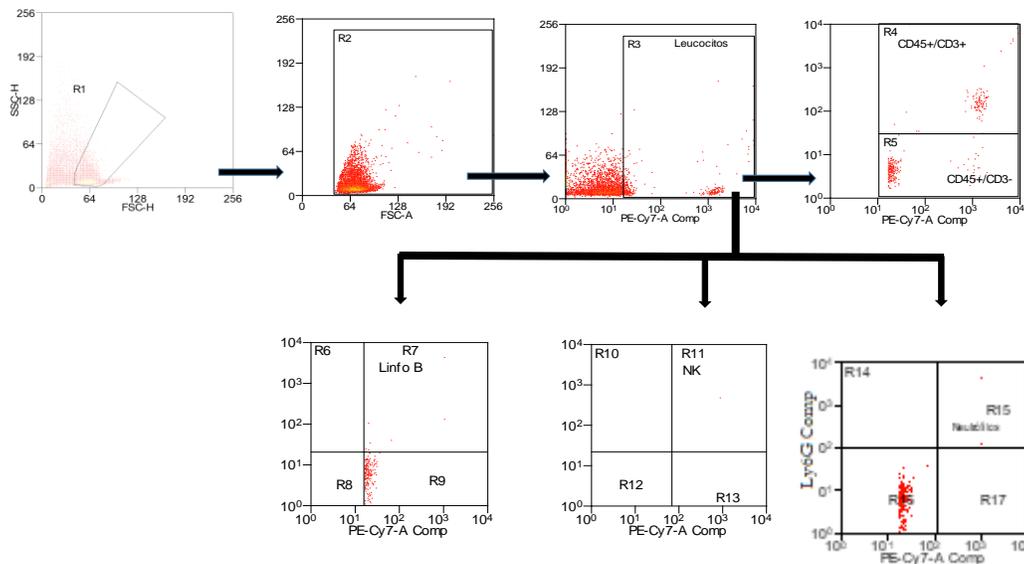


Fig. 30. Plots del análisis de citometría de flujo del LCR en ratas con isquemia cerebral. Leucocitos (CD45+), Linfocitos B (CD45+/CD19+), Linfocitos T (CD45+/CD3+), NK (CD45+/CD161+) y Neutrófilos (CD45+/Ly6g+).

En el caso del marcaje de células B (CD19) y NK (CD161) no se mostraron diferencias significativas, aunque vale la pena mencionar que, en el caso de las células NK se encontró una tendencia a la baja del 2% en el grupo Cop-1+ACF y del 2.5% en el grupo Cop-1+SS (Fig. 31).

Células inmunes en líquido cefalorraquídeo a 14 días post-isquemia

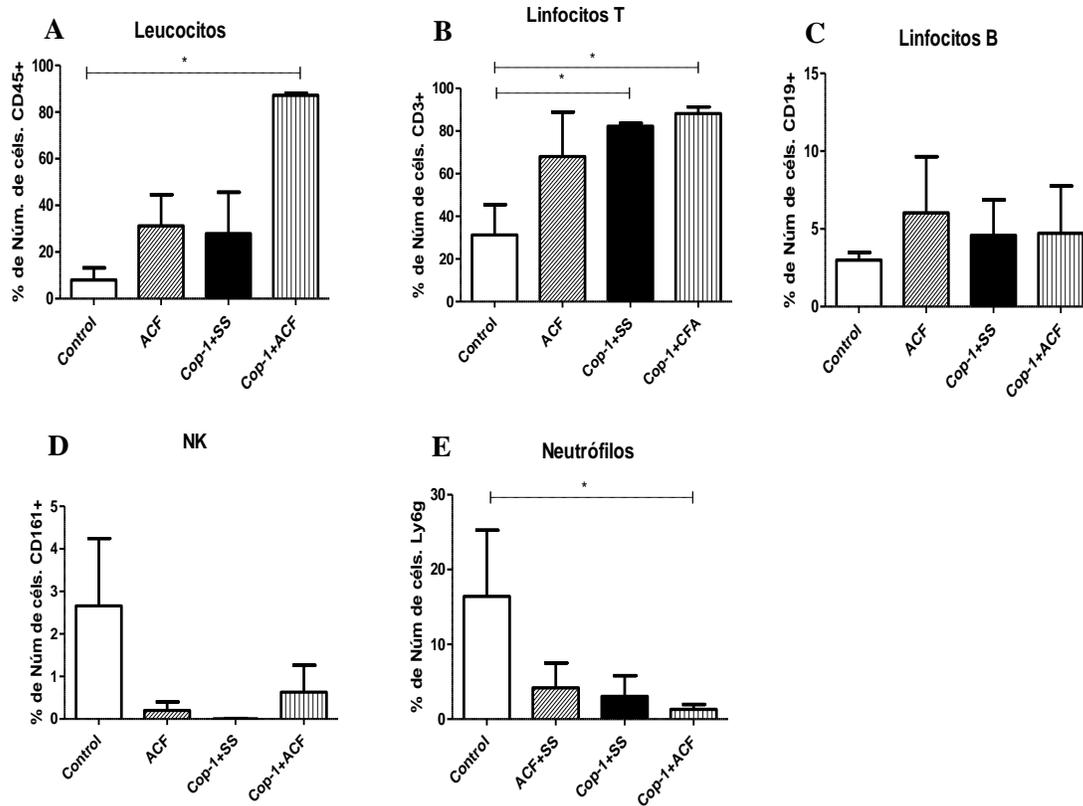


Fig. 31. Cuantificación de células Inmunes en líquido cefalorraquídeo en ratas a 14 días post-isquemia. Cuantificación de células expresadas en porcentaje A) leucocitos (CD45+), B) Linfocitos T (CD45+/CD3+), C) Linfocitos B (CD45+/CD19+), D) NK (CD45+/CD161) y E) Neutrófilos (CD45+/Ly6g. n=3 (cada muestra presenta un pull de LCR de 3 ratas) Media± EE. * $p < 0.05$; Kruskal Wallis seguida de Dunn's. ACF, adyuvante completo de Freund. SS, solución salina

A pesar de que se evaluaron las células a 14 días post-isquemia, encontramos un número significativo de neutrófilos (células que generalmente se incrementan durante las primeras horas del evento isquémico), los cuales disminuyen en los grupos tratados con

Cop-1 y el grupo ACF+SS aunque sólo muestra diferencia significativa el grupo Cop-1+ACF con respecto al grupo control (1.31 ± 0.6 vs 16.42 ± 8.8 ; $p<0.05$; Fig. 31).

7.7 Efecto de Cop-1 sobre las subpoblaciones de Linfocitos T CD4+ en Líquido Cefalorraquídeo.

Al observar que Cop-1 es capaz de incrementar la cantidad de linfocitos T en el LCR (Fig. 32A y B), decidimos examinar a qué clase de linfocitos T corresponden; para ello, a través del análisis de los plots (Fig 32 A) cuantificamos la cantidad de linfocitos T CD4+, CD8+ y NKT (CD-1d) (Fig 32B).

Cuando se cuantificó la cantidad de Linfocitos T CD4+ observamos que hay una disminución significativa en el grupo tratado con Cop-1+ACF respecto al control (18.15 ± 9.6 vs 56.24 ± 9.3 ; $p<0.049$); en el resto de los grupos experimentales no hay significancia estadística (Fig. 30C).

La cantidad de linfocitos T CD8+ se incrementó significativamente en el grupo tratado con Cop-1+ACF respecto al resto de los grupos (17.40 ± 4.2 Cop-1+ACF vs 1.040 ± 0.5 Cop-1+SS; 1.04 ± 0.5 ACF; 2.83 ± 2.7 Control; $p<0.05$; Fig. 32D). En la cuantificación de células NKT se observó un incremento considerable del 18% en el grupo Cop-1+ACF y del 31% en el grupo Cop-1+SS respecto al grupo Control sin llegar a presentar diferencia significativa (Fig. 32E).

Linfocitos en líquido cefalorraquídeo a 14 días post-isquemia

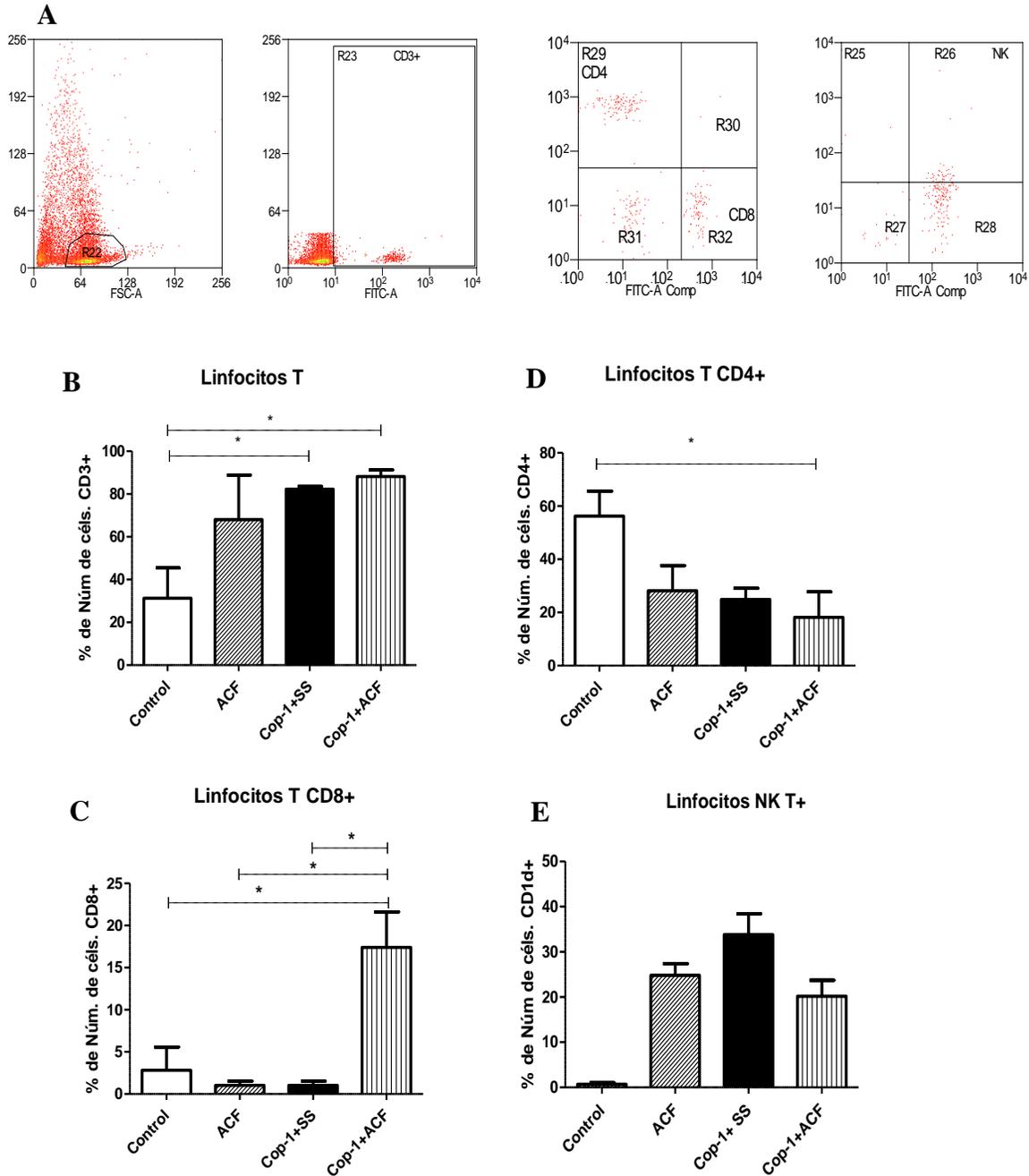


Fig.32. Linfocitos presentes en el líquido cefalorraquídeo de ratas a 14 días post-isquemia. A) Plots de citometría de flujo en la cuantificación de linfocitos (CD3+), Linfocitos TCD4+, CD8+ y NK T+ (CD1d). Las gráficas muestran la cuantificación de células expresada en porcentajes de Linfocitos T CD3+ B); Linfocitos T CD4+, C); Linfocitos T CD8+, D) y NKT, E). n=3 (cada muestra presenta un pull de LCR de 3 ratas) Media± EE. * $p < 0.05$; Kruskal Wallis seguida de Dunn's. ACF, adyuvante completo de Freund. SS, solución salina

7.8 Correlación entre la IL-10 y los factores de crecimiento con los linfocitos del líquido cefalorraquídeo.

Para evaluar si el incremento de IL-10 y los factores de crecimiento presentaban relación con el efecto de Cop-1 sobre cantidad y el tipo de linfocitos en el LCR después de la isquemia, decidimos realizar un análisis de correlación del grupo Cop-1+ACF.

El análisis de correlación entre la cantidad de linfocitos T CD4+ con la IL-10 y los factores de crecimiento mostraron una correlación negativa tanto para la IL-10 ($r=-0.98$, $p<0.047$), NT-3 ($r=-0.99$, $p<0.041$), BDNF ($r=-0.98$, $p<0.040$), como para el IGF-1 ($r=0.94$, $p<0.040$; Fig. 33); en el mismo sentido encontramos una correlación de manera positiva al analizar los mismo factores de crecimientos e IL-10 con los linfocitos T CD8+, para la IL-10 se obtuvo una $r=0.97$ ($p<0.041$), para NT-3 $r=0.96$ ($p<0.044$), BDNF $r=0.98$ ($p<0.040$) e IGF-1 $r=0.93$ ($p<0.041$);

Correlación de la IL-10. y factores de crecimiento con los linfocitos TC4D+ y TCD8+

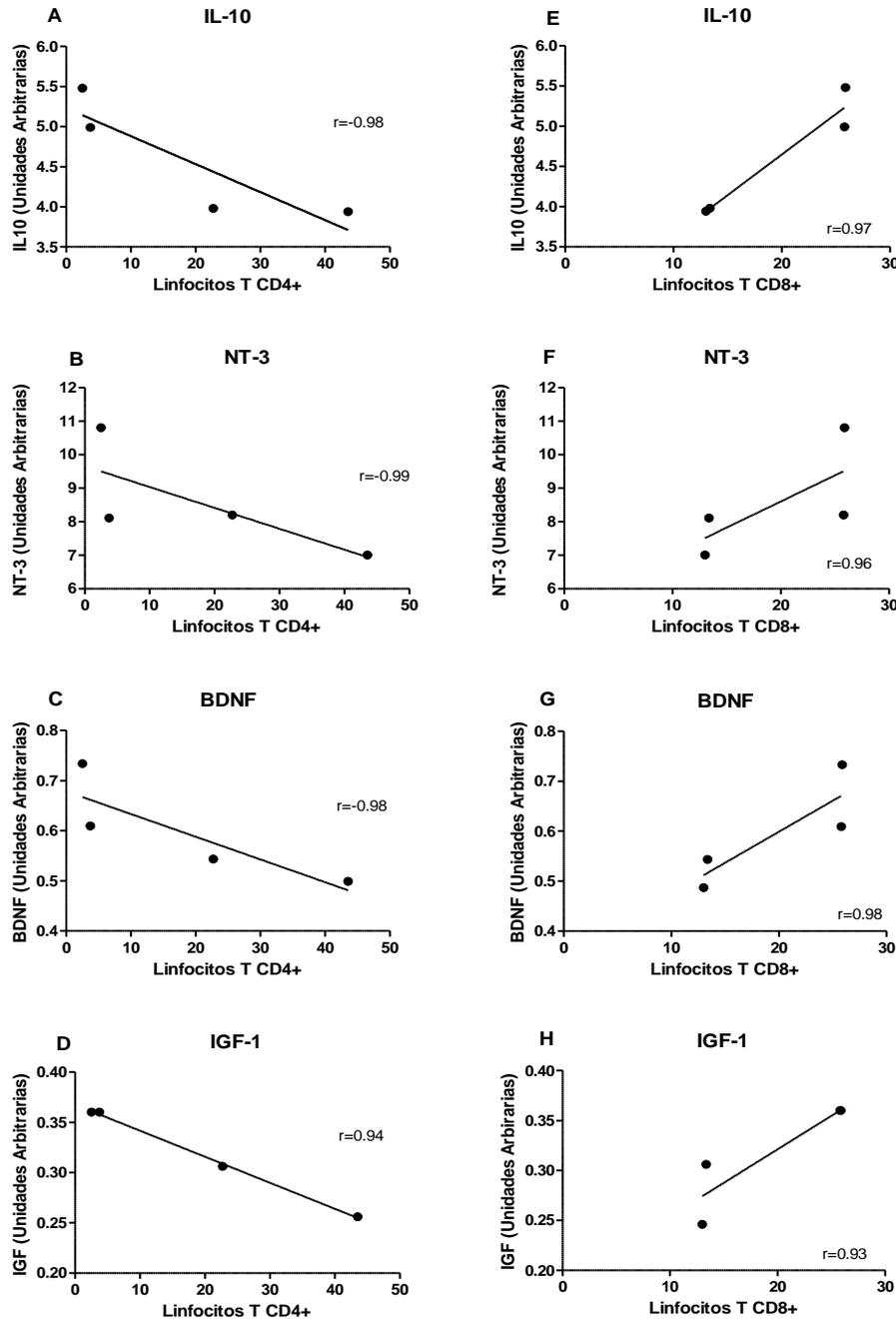


Fig. 33. Correlación de la IL-10 y los factores de crecimiento con los linfocitos CD4+ y CD8+. Correlación de los linfocitos T CD4+ con A) IL-10 ($r = 0.98$, $p < 0.040$); B) NT-3 ($r=0.99$, $p<0.041$); C) BDNF ($r=0.98$, $p<0.04$) y D) IGF-1 ($r=0.94$, $p<0.04$). Correlación de los linfocitos T CD8+ con la E) IL-10 ($r=0.97$, $p<0.041$); F) NT-3 ($r=0.96$, $p<0.044$); G) BDNF ($r=0.98$, $p<0.040$) e H) IGF-1 ($r=0.93$, $p<0.041$). Coeficiente de correlación de Spearman. $n=4$. Media \pm EE. * $p<0.05$. IL, interleucina. BDNF, Factor neurotrófico derivado del cerebro. IGF-1, Factor de crecimiento parecido a la insulina, NT-3, Neurotrofina-3.

8. DISCUSIÓN

La inflamación que ocurre después de un evento isquémico se ha asociado a un mayor detrimento del tejido neural (132) y por ende se ha tratado de inhibir o reducir para evitar ese daño; sin embargo, en las últimas décadas se ha demostrado que el uso de péptidos neurales modificados como Cop-1 a través de la modulación del sistema inmune no sólo evita el incremento del deterioro sino que también produce moléculas que promueven la reparación y la neurogénesis(106-108, 122, 124).

En este estudio se analizó el efecto que ejerce Cop-1 sobre factores de crecimiento (BDNF, NT-3 e IGF-1), citocinas (IL-4, IL-10, IL-1 β , TNF- α , INF- γ e IL-17) y linfocitos en los plexos coroideos y cómo correlacionan con el incremento de la neurogénesis promovida por Cop-1 en ratas con isquemia cerebral focal a 14 días.

Las evaluaciones del déficit neurológico y la cuantificación de la neurogénesis en la ZSV y ZSG observados en este estudio fueron similares a datos obtenidos en investigaciones previas realizadas por nuestro equipo de trabajo (106, 107), en donde se aprecia que Cop-1 estimula la recuperación del déficit neurológico a partir del día 7 post-isquemia aumentado hasta el día 14, la neurogénesis también fue elevada en los grupos tratados con Cop-1 en los dos sitios neurogénicos, la ZSV y ZSG, a los 14 días. Datos acordes fueron observados recientemente por el grupo de Mangin en el que también observa un incremento en la neurogénesis en la ZSV en ratones con isquemia cerebral permanente a 7 días inmunizados con copaxona (133).

El efecto de Cop-1 sobre la neurogénesis ha sido revisado en otros modelos con patología en el SNC como la enfermedad de Alzheimer (134) y EAE (124); y en circunstancias en donde son afectadas las condiciones cognitivas y de memoria como en la infección causadas por lipopolisacáridos (135) y en ratas que sufrieron irradiación craneal (136);

en todos ellos, se advirtió que el copolímero-1 incrementa las neuronas de nueva formación como en los resultados aquí mostrados.

El mecanismo por el que Cop-1 ejerce los efectos benéficos no han sido completamente dilucidado pero se ha demostrado utilizando el modelo de EAE y estudios in vitro que Cop-1 presenta mayor afinidad por moléculas de MHCII que la proteína básica de la mielina (PBM) u otros antígenos (137), tiene la capacidad de bloquear la proliferación de linfocitos T anti PBM (138), modifica el perfil Th1 pro inflamatorio por un fenotipo Th-2 caracterizado por la producción de citocinas anti-inflamatorias como IL-4, IL-10 y TGF- β (139) y posee la capacidad de incrementar la proliferación de células T CD8+ (140). Lo que permite una modificación en el microambiente idónea tanto para la recuperación neural como para que se faciliten y promuevan procesos como la neurogénesis.

Además, Cop-1 también es capaz de estimular la producción de factores de crecimiento como el BDNF (141) e IGF-1 (134) que son indispensables en procesos como la neurogénesis ya que facilitan la proliferación y diferenciación de la células madre neurales (NSC) (122).

La neurogénesis es un proceso altamente regulado por señales intrínsecas y extrínsecas que estimulan a las células madre en los nichos neurogénicos (ZSV y ZSG) (142), muchas de esas señales son producidas en los plexos coroideos, las cuales viajan a través de procesos apicales que se proyectan hacia el espacio ventricular (143).

A los plexos coroideos se les consideran funciones neuroinmunes ya que se ha evidenciado que poseen células linfoides inducibles que se activan al recibir señales del parénquima y del sistema inmune periférico (144) transformándolas en un lenguaje coordinado de moléculas que modulan mecanismos como la neurogénesis tanto en el cerebro sano como en el patológico. También se ha reportado que los plexos coroideos secretan una amplia gama de factores de crecimiento en el LCR entre los que se incluyen

BDNF, NT-3 e IGF-1 (145),(146) que regulan la neurogénesis (147),(148, 149). Es por ello, que decidimos evaluar el efecto de Cop-1 en este sitio tan conveniente.

Estudios previos en nuestro laboratorio mostraron que la inmunización con Cop-1 no presentaba efecto sobre los niveles de BDNF a los 7 días post-isquemia en las zonas de la penumbra isquémica (107); sin embargo, el presente estudio demuestra el incremento de BDNF a 14 días post-isquemia en los plexos coroideos; en otros modelos Cop-1 también ha demostrado inducir la producción de BDNF en el mismo sitio como en EAE al transferir células activadas por Cop-1 específicas en ratones lesionados (122) de igual manera se ha observado un incremento de BDNF en el LCR de pacientes con esclerosis múltiple tratados con el copolímero (150).

La neurotrofina 3 también fue incrementada significativamente en los grupos tratados con Cop-1 en los plexos coroideos, resultados acordes a los observados en un estudio previo realizado por nuestro grupo en donde observamos también un incremento de esta neurotrofina pero en la zona de penumbra isquémica a 7 días (107). Estos resultados son afines con lo publicado en otras investigaciones donde inmunizaron con Cop-1 como en el que encontraron una mayor cantidad de NT-3 en diferentes regiones del cerebro en ratones con EAE (124).

En el caso del IGF-1, también se observa un incremento significativo en los grupos tratados con Cop-1; esta neurotrofina también se ha observado incrementada en el modelo de Alzheimer (134), EAE (124), *in vitro* en cultivos de células T reactivas al copolímero 1 y en lesión de médula espinal (151).

El incremento en la expresión génica de NT-3, IGF-1 y BDNF en los grupos tratados con Cop-1 puede explicar la neurogénesis tanto en la ZSV como en ZSG, ya que se sabe que los factores neurotróficos mantienen contacto directo con las NSC que se encuentran tanto en la ZSV como en el ZSG; los factores que se hayan más cercanos al epitelio de los plexos son sujetos de pulsaciones que presenta el mismo plexo para provocar que el flujo

del LCR recorra toda la región ventricular incluido el 3º y 4º ventrículo (75) para garantizar que todas las células NSC puedan tener contacto con los factores de crecimiento y favorecer la neurogénesis.

Se sabe que NT-3 es requerida para la quiescencia y mantenimiento a largo plazo de las células madre de los nichos neurogénicos (148), facilita la plasticidad, el aprendizaje y la memoria (152), a través de la unión a su receptor TrkC que puede activar la vía PI3K/AKT, ERK o PLCY que activan el factor de transcripción CREB (153). IGF-1 también está involucrada en la regulación de la neurogénesis ya que promueve la diferenciación de las células madre través de la vía PI3K/AKT o MAP cinasas (154) y participa en la migración de neuroblastos (155).

Por otra parte, BDNF también promueve la sobrevivencia y migración de los neuroblastos en animales adultos al unirse a sus receptores TrkB o p75NRT los cuales activan las vías PI3K/AKT, ERK o PLCY (156) que a su vez activan el factor de transcripción CREB (153).

Para confirmar que el incremento en la neurogénesis se debe al aumento de los factores de crecimiento evaluados, determinamos el coeficiente de correlación, el cual en todos los casos presentó valores de r ($r=0.90$ para BDNF y NT-3; $r=0.78$ y $r=0.70$ para IGF-1 en la ZSV y ZSG) de los factores de crecimiento en las zona ZSV y ZSG.

La producción local de factores de crecimiento se consigue a través de la activación de células inmunes residentes en el estroma de los plexos coroideos (81), así Cop-1 puede conferir un microambiente que permita la producción de estos; para probar esta conjetura evaluamos interleucinas de carácter pro-inflamatorio y anti-inflamatorio.

TNF- α principalmente es considerado una citocina de carácter pro-inflamatorio que media la apoptosis, y se asocia al incremento del daño tisular y la inhibición de la neurogénesis en la isquemia cerebral (157); horas después del evento isquémico se ha

observado incrementada en neuronas, astrocitos, microglia, células endoteliales, células de los plexos coroideos y leucocitos infiltrantes (22).

Cop-1 ha demostrado ser capaz de reducir la expresión de TNF- α en diferentes modelos experimentales como la hipoperfusión cerebral crónica (158), EAE (Glatiramer acetate protects against inflammatory synaptopathy in experimental autoimmune experimental.(159), e *in vitro* en células T reactivas al copolímero (151), incluso en el modelo de isquemia cerebral permanente en ratones diabéticos en donde encontraron una disminución significativa de la expresión del RNAm de TNF- α en el hemisferio ipsilateral completo (133); no obstante, nuestros resultados se mantienen sin cambios en todos nuestros grupos experimentales.

Se ha reportado que el INF- γ (160) y la IL-1 β (133, 161) también disminuyen su expresión cuando se inmuniza con Cop-1 y se incrementa la expresión de la IL-4 (133, 162, 163); esto debido a que el incremento de esta citocina provoca la activación de la vía de señalización STAT-6 que promueve la sobre regulación del factor de transcripción GATA-3 que induce la diferenciación de los linfocitos Th0 aTh2 (164, 165); sin embargo, en nuestros resultados no observamos modificaciones en estas citocinas.

Por otra parte, recientemente se ha demostrado que el INF- γ es indispensable para la activación de las células inmunes que radican en los plexos coroideos e incluso que TNF- α potencia el efecto del IFN- γ sobre la producción de moléculas de tráfico celular (81); al haber una lesión en el cerebro es importante que células inmunes de la periferia penetren respondiendo a las señales de las quimiocinas que se producen en la zona infartada, por ello es que quizás no haya una reducción en los niveles de IFN- γ , ya que sin él o en cantidades menores el tráfico leucocitario al parénquima cerebral se vería afectado.

Como efecto colateral al no poder reducirse los niveles de INF- γ por la necesidad de permitir el tráfico celular, los niveles de esta citocina tal vez estén inhibiendo la activación

de la vía STAT6 de los linfocitos que habitan en el plexo coroideo evitando así que se produzcan mayores cantidades de IL-4 (165).

Al mantenerse sin cambio los niveles de INF- γ y de IL-4, no esperábamos que los niveles de IL-10 se incrementaran; sin embargo, la administración de Cop-1 tuvo un efecto positivo al inducir un aumento significativo de esta citocina.

La IL-10 es una citocina de gran relevancia por sus efectos inmunomoduladores, ésta puede ser producida y secretada por los linfocitos Th2, macrófagos M2, células B, microglia, astrocitos y linfocitos T reg. (137); sus efectos se han caracterizado porque a través de la activación de la vía STAT 3, la IL-10 reduce los niveles de expresión de moléculas MHC tipo II (166)), que bloquea la producción de citocinas proinflamatorias y la liberación de quimiocinas (167).

Se ha reportado que la IL-10 posee efectos neuroprotectores al reducir el volumen de infarto en animales sometidos a OACM (168, 169), a través de su capacidad moduladora que media el proceso inflamatorio (170), además, se ha observado su efecto neuroprotector en otras patologías como el Alzheimer (171) y demencia vascular (65).

Por otra parte, también se ha observado que la IL-10 regula la proliferación de las células madre neurales en la ZSV a través de ERK/STAT3 que media la vía Nocht (98, 172) en ratones con isquemia cerebral (173), incrementando así la neurogénesis; es por ello, que decidimos evaluar si esta citocina interviene con el incremento en la neurogénesis después de la inmunización con Cop-1.

Los resultados obtenidos en la correlación de Spearman entre la neurogénesis en la ZSV y ZSG del giro dentado del hipocampo con la IL-10 son muy altos ($r= 0.83$ y $r=0.98$), lo que indica que esta citocina interviene de manera positiva sobre la proliferación de neuronas nuevas.

Se sabe que la depleción de las células T reg e IL-10 provoca una mayor expresión de la IL-17 (170), incrementando la patogénesis de la isquemia cerebral (174). En el modelo de EAE se ha observado que Cop-1 es capaz de disminuir la expresión de IL-17 a través del aumento de las células T reg (175, 176); en nuestros resultados, la reducción significativa de la IL-17 quizá es efecto del aumento de la IL-10. Con estos datos podemos inferir que Cop-1 a través de la IL-10 es capaz de modular la zona de los plexos coroideos y favorecer la neurogénesis involucrando el incremento de factores de crecimiento.

Para determinar si Cop-1 posee la capacidad de modular el ambiente celular en los plexos coroideos en el modelo de isquemia cerebral, decidimos evaluar el tipo de células que se encuentran en el líquido cefalorraquídeo 14 días después de la inmunización.

La cuantificación de células en el LCR a través de citometría de flujo denota que hubo un incremento significativo de leucocitos en el grupo tratado con Cop-1+ACF, esto nos indica que Cop-1 facilita su reclutamiento; de esos leucocitos alrededor del 80% fueron células T, los cuales son vitales para que se active la autorreactividad protectora (79). El incremento en la infiltración de leucocitos al LCR quizás se deba a que se mantuvo sin cambio el nivel de expresión de INF- γ , el cual como ya se ha mencionado media el tráfico leucocitario (81).

Con la intención de conocer el tipo de linfocitos T hallados en el LCR, tratamos de identificar cuántos de ellos corresponden a linfocitos T CD4+, CD8+ y NKT. Lo que esperábamos encontrar era una mayor cantidad de linfocitos T CD4+ ya que se han observado en aumento en condiciones fisiológicas normales (68), los cuales mantienen un ambiente de carácter anti inflamatorio en tejido sano (79). Sin embargo, en nuestro estudio se observó una disminución significativa en el grupo tratado con Cop+CFA.

Para tratar de esclarecer si la disminución de linfocitos T CD4+ en el grupo Cop-1+ACF se relaciona con el incremento de la IL-10 y los factores de crecimiento, evaluamos su

correlación; la cual resultó ser negativa y muy alta ($r=-0.98$, 0.99 , 0.98 y 0.94 para IL-10, NT-3, BDNF e IGF-1 respectivamente).

No conocemos con certeza la razón y el mecanismo por el que los linfocitos T CD4+ se hayan reducido en el LCR, pero podemos inferir que quizá los linfocitos de esta clase que radican en los plexos coroideos y los que infiltran de la periferia liberan factores de crecimiento y citocinas que son incorporados al LCR, mientras que migran al sitio de lesión en respuesta al incremento de quimiocinas como CXCL9 y CXCL10 que se producen en la zona del infarto (58) o bien, como lo demuestran los experimentos realizados por Llovera y cols en el 2017 (66); en el que los linfocitos T encontrados en los plexos coroideos no se incorporan al parénquima cerebral a través del flujo del LCR, si no que se traslocan a través del estroma de los plexos coroideos y viajan hasta el sitio de la lesión.

En nuestros resultados también se observa un incremento de células T CD8+ en el grupo tratado con Cop-1+ACF; acorde a estudios previos donde han demostrado que el copolímero 1 induce una respuesta proliferativa en células T CD8+ aumentando la respuesta al fármaco en pacientes con esclerosis múltiple (140); además, se ha evidenciado que éste tipo de células son necesarias para la acción de Cop-1 *in vivo* ya que estudios en ratones con EAE deficientes en células T CD8+ no reducen los signos de la enfermedad (140).

El tipo de células T CD8+ que se han vinculado con el efecto benéfico del copolímero-1 son células T CD8+ de carácter modulador, las cuales no se han identificado de manera clara, ya que algunas pueden inducir la producción de INF- γ (140) e IL-6, mientras que otras reducen la expresión de moléculas co-estimuladoras CD80 y CD86 y otras inducen la síntesis de IL-10 por las células dendríticas (Yu., Y. 2018).

El incremento de células T CD8+ que observamos en el grupo tratado con Cop-1+ACF corresponde al mismo que presenta la mayor cantidad de IL-10, esto quizás se deba a que algún porcentaje importante de linfocitos T CD8+ sean de carácter regulador, y a su

vez los responsables de inducir la producción de IL-10 por otros tipos celulares como las células dendríticas que se ha observado que al ser estimuladas por este tipo de células adquieren un fenotipo II y producen grandes cantidades de IL-10 (177); ante estos resultados, valdría la pena identificar los subtipos de células T CD8+ que se encuentran en el LCR y el tipo de células responsables directamente del incremento en la producción de la IL-10.

La modificación en el microambiente en los plexos coroideos encabezado por el aumento de linfocitos T CD8+ estimulan no sólo el incremento en las cantidades de IL-10, nuestros resultados en el análisis de correlación evidencia que directamente influyen en una mayor producción de factores de crecimiento; aunque no podemos determinar con toda seguridad cuáles son las células responsables de su producción.

Los resultados de esta investigación muestran que Cop-1 a través del incremento de linfocitos T CD8+ y su estimulación en el aumento de la producción de IL-10 y de los factores neurotróficos BDNF, IGF-1 y NT-3 en los plexos coroideos directamente intervienen en la neurogénesis post-isquemia; demostrando que Cop-1 es capaz de modular este sitio de comunicación neuroinmune el cual debe explorarse a mayor profundidad para conocer a detalle el mecanismo que emplea Cop-1 en isquemia cerebral.

9. CONCLUSIÓN

El Copolímero 1 es capaz de modular la respuesta inmunológica en los plexos coroideos a través del incremento de linfocitos T CD8+ que estimulan la producción de la IL-10 y factores de crecimiento BDNF, NT-3 e IGF-1 que inducen el incremento de la neurogénesis tanto en la ZSV y ZSG del hipocampo en ratas con isquemia cerebral a 14 días.

10. PERSPECTIVAS

- Identificar los subtipos de linfocitos T CD8+ en el LCR y en el tejido de los plexos coroideos.
- Profundizar acerca de los mecanismos que ejerce Cop-1 sobre los linfocitos T CD8+.
- Analizar los mecanismos que ejerce Cop-1 en el parénquima cerebral y analizar si son distintos a los que se llevan a cabo en los plexos coroideos.

11. REFERENCIAS

1. Engelhardt E. Apoplexy, cerebrovascular disease, and stroke: Historical evolution of terms and definitions. *Dement Neuropsychol.* 2017;11(4):449-53.
2. Stroke TNlONDa. Stroke Information 2019 [Available from: <https://www.ninds.nih.gov/Disorders/All-Disorders/Stroke-Information-Page>].
3. Organization WH. Global Status Report on Noncommunicable Diseases. World Health Organization; 2014.
4. Truong DT, Venna VR, McCullough LD, Fitch RH. Deficits in auditory, cognitive, and motor processing following reversible middle cerebral artery occlusion in mice. *Exp Neurol.* 2012;238(2):114-21.
5. Shrivastava SR, Shrivastava PS, Ramasamy JD. Reduction in global burden of stroke in underserved areas. *J Neurosci Rural Pract.* 2013;4(4):475-6.
6. *OurWorldInData.org*. Causes of death 2018 [Available from: <https://ourworldindata.org/causes-of-death>].
7. OMS. Top 10 causas de muerte. Datos del observatorio mundial de la salud (GHO). 2018:<http://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>.
8. *organization Wh*. Informe mundial sobre discapacidad 2011 [Available from: https://www.who.int/disabilities/world_report/2011/accessible_es.pdf?ua=1].
9. Organization WH. Global Action Plan for the Prevention and Control of NCDs 2013-2020 2013 [Available from: https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/94384/9789241506236_eng.pdf?sequence=1].
10. Americas PHIPft, Facebook Fuo, Twitter Fuo, Instagram Fuo, LinkedIn Fuo, Youtube Fuo, et al. Main causes of death by country 2017 [Available from: <http://www.paho.org/data/index.php/es/mnu-mortalidad/principales-causas-de-muerte.html?showall=&start=1>].
11. Daniel LTJ. Campaña de concientización sobre el infarto cerebral. Ciudad de México: La crónica; 2018.
12. Feigin VL, Mensah GA, Norrving B, Murray CJ, Roth GA, Group GSPE. Atlas of the Global Burden of Stroke (1990-2013): The GBD 2013 Study. *Neuroepidemiology.* 2015;45(3):230-6.
13. Organization Wh. International classification of diseases, 11Th revision (ICD11). The 11th Revision of the International Classification of Diseases (ICD-11) is due by 2018!2018.
14. Banerjee C, Chimowitz MI. Stroke Caused by Atherosclerosis of the Major Intracranial Arteries. *Circ Res.* 2017;120(3):502-13.
15. Tsigoulis G, Safouris A, Kim DE, Alexandrov AV. Recent Advances in Primary and Secondary Prevention of Atherosclerotic Stroke. *J Stroke.* 2018;20(3):417.
16. Zmysłowski A, Szterk A. Current knowledge on the mechanism of atherosclerosis and pro-atherosclerotic properties of oxysterols. *Lipids Health Dis.* 2017;16(1):188.

-
17. Badimon L, Vilahur G. Thrombosis formation on atherosclerotic lesions and plaque rupture. *J Intern Med.* 2014;276(6):618-32.
 18. Libby P, Ridker PM, Maseri A. Inflammation and atherosclerosis. *Circulation.* 2002;105(9):1135-43.
 19. Carvajal Carvajal, Carlos. LDL oxidada y la aterosclerosis *Medicina Legal de Costa Rica.* 2015;32(scielo):161-9
 20. T. Padró CM, L. Badimon,. Inflammation and arteriosclerosis. *Hipertensión y Riesgo Vascular.* 2005;22(4):173-82.
 21. Carmichael ST. The 3 Rs of Stroke Biology: Radial, Relayed, and Regenerative. *Neurotherapeutics.* 2016;13(2):348-59.
 22. Pan J, Konstas AA, Bateman B, Ortolano GA, Pile-Spellman J. Reperfusion injury following cerebral ischemia: pathophysiology, MR imaging, and potential therapies. *Neuroradiology.* 2007;49(2):93-102.
 23. Yao H, Ago T, Kitazono T, Nabika T. NADPH Oxidase-Related Pathophysiology in Experimental Models of Stroke. *Int J Mol Sci.* 2017;18(10).
 24. Harston GW, Okell TW, Sheerin F, Schulz U, Mathieson P, Reckless I, et al. Quantification of Serial Cerebral Blood Flow in Acute Stroke Using Arterial Spin Labeling. *Stroke.* 2017;48(1):123-30.
 25. Ramos-Cabrer P, Campos F, Sobrino T, Castillo J. Targeting the ischemic penumbra. *Stroke.* 2011;42(1 Suppl):S7-11.
 26. Hossmann KA. The two pathophysiologies of focal brain ischemia: implications for translational stroke research. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2012;32(7):1310-6.
 27. Obel LF, Müller MS, Walls AB, Sickmann HM, Bak LK, Waagepetersen HS, et al. Brain glycogen-new perspectives on its metabolic function and regulation at the subcellular level. *Front Neuroenergetics.* 2012;4:3.
 28. Hofmeijer J, van Putten MJ. Ischemic cerebral damage: an appraisal of synaptic failure. *Stroke.* 2012;43(2):607-15.
 29. Liu F, Lu J, Manaenko A, Tang J, Hu Q. Mitochondria in Ischemic Stroke: New Insight and Implications. *Aging Dis.* 2018;9(5):924-37.
 30. Song M, Yu SP. Ionic regulation of cell volume changes and cell death after ischemic stroke. *Transl Stroke Res.* 2014;5(1):17-27.
 31. Vats K, Sarmah D, Kaur H, Wanve M, Kalia K, Borah A, et al. Inflammasomes in stroke: a triggering role for acid-sensing ion channels. *Ann N Y Acad Sci.* 2018;1431(1):14-24.
 32. Aggarwal Ashua AP, Khatak Mamta, Khatak Sunil. Cerebral ischemic stroke: Sequels of cascade. *International Journal of Pharma and Bio Sciences.* 2010;1(3):1-24.
 33. Cross JL, Meloni BP, Baker AJ, Lee S, Knuckey NW. Modes of neuronal calcium entry and homeostasis following cerebral ischemia. *Stroke Research and treatment.* 2010;1(9).
 34. Hu HJ, Song M. Disrupted Ionic Homeostasis in Ischemic Stroke and New Therapeutic Targets. *J Stroke Cerebrovasc Dis.* 2017;26(12):2706-19.
 35. Won SJ, Kim DY, Gwag BJ. Cellular and molecular pathways of ischemic neuronal death. *J Biochem Mol Biol.* 2002;35(1):67-86.
 36. Qin AP, Zhang HL, Qin ZH. Mechanisms of lysosomal proteases participating in cerebral ischemia-induced neuronal death. *Neurosci Bull.* 2008;24(2):117-23.

-
37. Wu MY, Yiang GT, Liao WT, Tsai AP, Cheng YL, Cheng PW, et al. Current Mechanistic Concepts in Ischemia and Reperfusion Injury. *Cell Physiol Biochem*. 2018;46(4):1650-67.
 38. Ramón R, César GJ. Excitotoxicity and Oxidative Stress in Acute Stroke. In: Schaller B, editor. *Ischemic Stroke - Updates: INTECH*; 2016.
 39. Crack PJ, Taylor JM. Reactive oxygen species and the modulation of stroke. *Free Radic Biol Med*. 2005;38(11):1433-44.
 40. Granger DN, Kvietys PR. Reperfusion injury and reactive oxygen species: The evolution of a concept. *Redox Biol*. 2015;6:524-51.
 41. Broughton BR, Reutens DC, Sobey CG. Apoptotic mechanisms after cerebral ischemia. *Stroke*. 2009;40(5):e331-9.
 42. Konigsberg Fainstein M. Radicales libres y estres oxidativo, aplicaciones médicas 2010.
 43. Sun MS, Jin H, Sun X, Huang S, Zhang FL, Guo ZN, et al. Free Radical Damage in Ischemia-Reperfusion Injury: An Obstacle in Acute Ischemic Stroke after Revascularization Therapy. *Oxid Med Cell Longev*. 2018;2018:3804979.
 44. Shirley R, Ord EN, Work LM. Oxidative Stress and the Use of Antioxidants in Stroke. *Antioxidants (Basel)*. 2014;3(3):472-501.
 45. van der Spuy WJ, Pretorius E. Interrelation between inflammation, thrombosis, and neuroprotection in cerebral ischemia. *Rev Neurosci*. 2012;23(3):269-78.
 46. Anrather J, Iadecola C. Inflammation and Stroke: An Overview. *Neurotherapeutics*. 2016;13(4):661-70.
 47. Anyanwu C, Hahn M, Nath M, Li J, Barone FC, DM R, et al. Platelets Pleiotropic Roles in Ischemic Stroke. *Austin J Cerebrovasc Dis & Stroke*. 2016;3(2):1-4.
 48. Iadecola C, Anrather J. The immunology of stroke: from mechanisms to translation. *Nat Med*. 2011;17(7):796-808.
 49. Kim JY, Kawabori M, Yenari MA. Innate inflammatory responses in stroke: mechanisms and potential therapeutic targets. *Curr Med Chem*. 2014;21(18):2076-97.
 50. Vidale S, Consoli A, Arnaboldi M, Consoli D. Postischemic Inflammation in Acute Stroke. *J Clin Neurol*. 2017;13(1):1-9.
 51. Kim E, Cho S. Microglia and Monocyte-Derived Macrophages in Stroke. *Neurotherapeutics*. 2016;13(4):702-18.
 52. Liu R, Pan M-X, Tang J-C, Zhang Y, Hua-Bao Liao YZ, Zhao D, et al. Role of neuroinflammation in ischemic stroke. *Neuroimmunol Neuroinflammation* 2017;4:158-66.
 53. Gülke E, Gelderblom M, Magnus T. Danger signals in stroke and their role on microglia activation after ischemia. *Ther Adv Neurol Disord*. 2018;11:1756286418774254.
 54. Kanazawa M, Ninomiya I, Hatakeyama M, Takahashi T, Shimohata T. Microglia and Monocytes/Macrophages Polarization Reveal Novel Therapeutic Mechanism against Stroke. *Int J Mol Sci*. 2017;18(10).
 55. Ma Y, Wang J, Wang Y, Yang GY. The biphasic function of microglia in ischemic stroke. *Prog Neurobiol*. 2017;157:247-72.
 56. Xiong XY, Liu L, Yang QW. Functions and mechanisms of microglia/macrophages in neuroinflammation and neurogenesis after stroke. *Prog Neurobiol*. 2016;142:23-44.

-
57. Mattila OS, Strbian D, Saksi J, Pikkarainen TO, Rantanen V, Tatlisumak T, et al. Cerebral Mast Cells Mediate Blood-Brain Barrier Disruption in Acute Experimental Ischemic Stroke Through Perivascular Gelatinase Activation. *Stroke*. 2011;42:3600-5.
 58. Jin R, Yang G, Li G. Inflammatory mechanisms in ischemic stroke: role of inflammatory cells. *J Leukoc Biol*. 2010;87(5):779-89.
 59. Ritzel R, Patel A, Grenier J, Crasper J, Verma R, Jellison E, et al. Functional differences between microglia and monocytes after ischemic stroke. *Journal of neuroinflammation*. 2015;12(106).
 60. Stubbe T, Ebner F, Richter D, Engel O, Klehmet J, Royl G, et al. Regulatory T cells accumulate and proliferate in the ischemic hemisphere for up to 30 days after MCAO. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2013;33(1):37-47.
 61. Selvaraj UM, Stowe AM. Long-term T cell responses in the brain after an ischemic stroke. *Discov Med*. 2017;24(134):323-33.
 62. Cramer JV, Benakis C, Liesz A. T cells in the post-ischemic brain: Troopers or paramedics? *J Neuroimmunol*. 2019;326:33-7.
 63. Gill D, Veltkamp R. Dynamics of T cell responses after stroke. *Curr Opin Pharmacol*. 2016;26:26-32.
 64. Xiong X, Barreto GE, Xu L, Ouyang YB, Xie X, Giffard RG. Increased brain injury and worsened neurological outcome in interleukin-4 knockout mice after transient focal cerebral ischemia. *Stroke*. 2011;42(7):2026-32.
 65. Liu QQ, Zhong D, Zhang X, Li GZ. IL-10 targets Th1/Th2 balance in vascular dementia. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2018;22(17):5614-9.
 66. Llovera G, Benakis C, Enzmann G, Cai R, Arzberger T, Ghasemigharagoz A, et al. The **choroid plexus is a key cerebral invasion route for T cells after stroke**. *Acta Neuropathol*. 2017;134(6):851-68.
 67. Meeker RB, Williams K, Killebrew DA, Hudson LC. Cell trafficking through the choroid plexus. *Cell Adh Migr*. 2012;6(5):390-6.
 68. Strominger I, Elyahu Y, Berner O, Reckhow J, Mittal K, Nemirovsky A, et al. The Choroid Plexus Functions as a Niche for T-Cell Stimulation Within the Central Nervous System. *Front Immunol*. 2018;9:1066.
 69. Falcão AM, Marques F, Novais A, Sousa N, Palha JA, Sousa JC. The path from the choroid plexus to the subventricular zone: go with the flow! *Front Cell Neurosci*. 2012;6:34.
 70. Pascual-Garvi JM, González-Llanos F, Prieto-Arribas R, Cerdán S, . RJ. La barrera hematoencefálica: desarrollo de una estructura que permite la heterogeneidad funcional del sistema nervioso central. *Rev Neuro*. 2004;38(06).
 71. Ransohoff R, Brown M. Innate immunity in the central nervous system. *J Clin Invest*. 2012;122(4):1164-71.
 72. Damkier HH, Brown PD, Praetorius J. Cerebrospinal fluid secretion by the choroid plexus. *Physiol Rev*. 2013;93(4):1847-92.
 73. Benarroch EE. Choroid plexus--CSF system: Recent developments and clinical correlations. *Neurology*. 2016;86(3):286-96.
 74. Gulbrandsen A, Vethe H, Farag Y, Oveland E, Garberg H, Berle M, et al. In-depth characterization of the cerebrospinal fluid (CSF) proteome displayed through the CSF proteome resource (CSF-PR). *Mol Cell Proteomics*. 2014;13(11):3152-63.

-
75. Plog BA, Nedergaard M. The Glymphatic System in Central Nervous System Health and Disease: Past, Present, and Future. *Annu Rev Pathol.* 2018;13:379-94.
 76. Fung P, Kong R. The Integrative Five-Fluid Circulation System in the Human Body. *Open Journal of Molecular and Integrative Physiology.* 2016;6:45-97.
 77. Kipnis J, Gadani S, Derecki NC. Pro-cognitive properties of T cells. *Nat Rev Immunol.* 2012;12(9):663-9.
 78. Ghersi-Egea JF, Strazielle N, Catala M, Silva-Vargas V, Doetsch F, Engelhardt B. Molecular anatomy and functions of the choroidal blood-cerebrospinal fluid barrier in health and disease. *Acta Neuropathol.* 2018;135(3):337-61.
 79. Baruch K, Ron-Harel N, Gal H, Deczkowska A, Shifrut E, Ndifon W, et al. CNS-specific immunity at the choroid plexus shifts toward destructive Th2 inflammation in brain aging. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013;110(6):2264-9.
 80. Schwartz M, Baruch K. The resolution of neuroinflammation in neurodegeneration: leukocyte recruitment via the choroid plexus. *EMBO J.* 2014;33(1):7-22.
 81. Kunis G, Baruch K, Rosenzweig N, Kertser A, Miller O, Berkutzki T, et al. IFN- γ -dependent activation of the brain's choroid plexus for CNS immune surveillance and repair. *Brain.* 2013;136(Pt 11):3427-40.
 82. Rook GA, Lowry CA, CL. R. Lymphocytes in neuroprotection, cognition and emotion: is intolerance really the answer?. *Brain Behav Immun* 25(4):591-601.
 83. Xiang J, Routhe LJ, Wilkinson DA, Hua Y, Moos T, Xi G, et al. The choroid plexus as a site of damage in hemorrhagic and ischemic stroke and its role in responding to injury. *Fluids Barriers CNS.* 2017;14(1):8.
 84. Pedragosa J, Salas-Perdomo A, Gallizioli M, Cugota R, Miró-Mur F, Briansó F, et al. CNS-border associated macrophages respond to acute ischemic stroke attracting granulocytes and promoting vascular leakage. *Acta Neuropathol Commun.* 2018;6(1):76.
 85. Ge R, Tornero D, Hirota M, Monni E, Laterza C, Lindvall O, et al. Choroid plexus-cerebrospinal fluid route for monocyte-derived macrophages after stroke. *J Neuroinflammation.* 2017;14(1):153.
 86. Ruan L, Wang B, ZhuGe Q, Jin K. Coupling of neurogenesis and angiogenesis after ischemic stroke. *Brain Res.* 2015;1623:166-73.
 87. Winner B, Winkler J. Adult neurogenesis in neurodegenerative diseases. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2015;7(4):a021287.
 88. Lim DA, Alvarez-Buylla A. The Adult Ventricular-Subventricular Zone (V-SVZ) and Olfactory Bulb (OB) Neurogenesis. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2016;8(5).
 89. Horgusluoglu E, Nudelman K, Nho K, Saykin AJ. Adult neurogenesis and neurodegenerative diseases: A systems biology perspective. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.* 2017;174(1):93-112.
 90. Bond AM, Ming GL, Song H. Adult Mammalian Neural Stem Cells and Neurogenesis: Five Decades Later. *Cell Stem Cell.* 2015;17(4):385-95.
 91. Mirzadeh Z, Merkle FT, Soriano-Navarro M, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A. Neural stem cells confer unique pinwheel architecture to the ventricular surface in neurogenic regions of the adult brain. *Cell Stem Cell.* 2008;3(3):265-78.

-
92. Mudò G, Bonomo A, Di Liberto V, Frinchi M, Fuxe K, Belluardo N. The FGF-2/FGFRs neurotrophic system promotes neurogenesis in the adult brain. *J Neural Transm (Vienna)*. 2009;116(8):995-1005.
 93. G G. Neurogénesis y gliogénesis en el cerebro rostral del ratón adulto heterocigoto para Pax6 (+/SeyDey). . España: Universidad de Salamanca; 2010.
 94. Alvarez-Buylla A, Garcia-Verdugo JM. Neurogenesis in adult subventricular zone. *J Neurosci*. 2002;22(3):629-34.
 95. Ming GL, Song H. Adult neurogenesis in the mammalian brain: significant answers and significant questions. *Neuron*. 2011;70(4):687-702.
 96. Lu J, Manaenko A, Hu Q. Targeting Adult Neurogenesis for Poststroke Therapy. *Stem Cells Int*. 2017;2017:5868632.
 97. Varela-Nallar L, Inestrosa NC. Wnt signaling in the regulation of adult hippocampal neurogenesis. *Front Cell Neurosci*. 2013;7:100.
 98. Wang L, Chopp M, Zhang RL, Zhang L, Letourneau Y, Feng YF, et al. The Notch pathway mediates expansion of a progenitor pool and neuronal differentiation in adult neural progenitor cells after stroke. *Neuroscience*. 2009;158(4):1356-63.
 99. Vilar M, Mira H. Regulation of neurogenesis by neurotrophins during adulthood: expected and unexpected roles. *Front Neurosci*. 2016;10(26).
 100. Nieto-Estévez V, Defterali Ç, C. V-A. IGF-I: A Key Growth Factor that Regulates Neurogenesis and Synaptogenesis from Embryonic to Adult Stages of the Brain. *Front Neurosci*. 2016;10(52).
 101. Lee E, Son H. Adult hippocampal neurogenesis and related neurotrophic factors. *BMB Rep*. 2009;42(5):239-44.
 102. Ziegler AN, Levison SW, Wood TL. Insulin and IGF receptor signalling in neural-stem-cell homeostasis. *Nat Rev Endocrinol*. 2015;11(3):161-70.
 103. Johansson PA. The choroid plexuses and their impact on developmental neurogenesis. *Front Neurosci*. 2014;8:340.
 104. Spector R, Robert Snodgrass S, Johanson CE. A balanced view of the cerebrospinal fluid composition and functions: Focus on adult humans. *Exp Neurol*. 2015;273:57-68.
 105. Baruch K, Schwartz M. CNS-specific T cells shape brain function via the choroid plexus. *Brain Behav Immun*. 2013;34:11-6.
 106. Ibarra A, Avendaño H, Cruz Y. Copolymer-1 (Cop-1) improves neurological recovery after middle cerebral artery occlusion in rats. *Neuroscience letters*. 2007;425:110-3.
 107. Cruz Y, Loera J, Mestre H, Kim-Lee J, Herrera J, Mellado R, et al. Copolymer-1 promotes neurogenesis and improves functional recovery after acute ischemic stroke in rats. *PLoS one*. 2015.
 108. Kipnis J, Mizrahi T, Yoles E, Ben-Nun A, Schwartz M, Ben-Nur A. Myelin specific Th1 cells are necessary for post-traumatic protective autoimmunity. *J Neuroimmunol*. 2002;130(1-2):78-85.
 109. Monsonigo A, Beserman ZP, Kipnis J, Yoles E, Weiner HL, Schwartz M. Beneficial effect of orally administered myelin basic protein in EAE-susceptible Lewis rats in a model of acute CNS degeneration. *J Autoimmun*. 2003;21(2):131-8.

-
110. Aharoni R, Kayhan B, Eilam R, Sela M, Arnon R. Glatiramer acetate-specific T cells in the brain express T helper 2/3 cytokines and brain-derived neurotrophic factor *in situ*. Proc Natl Acad Sci U S A. 2003;100(24):14157–62.
 111. Kipnis J, Nevo U, Panikashvili D, Alexandrovich A, Yoles E, Akselrod S, et al. Therapeutic vaccination for closed head injury. J Neurotrauma. 2003;20(6):559-69.
 112. Ibarra A, Sosa M, García E, Flores A, Cruz Y, Mestre H, et al. Prophylactic neuroprotection with A91 improves the outcome of spinal cord injured rats. Neurosci Lett. 2013;554:59-63.
 113. Frenkel D, Huang Z, Maron R, Koldzic DN, Hancock WW, Moskowitz MA, et al. Nasal vaccination with myelin oligodendrocyte glycoprotein reduces stroke size by inducing IL-10-producing CD4⁺ T cells. The Journal of Immunology. 2004;172:6549-55.
 114. Schwartz M, Kipnis J. A conceptual revolution in the relationships between the brain and immunity. Brain Behav Immun. 2011;25(5):817-9.
 115. Schwartz M, J. K. Protective autoimmunity and neuroprotection in inflammatory and noninflammatory neurodegenerative diseases. J Neurol Sci. 2005;233:163-6.
 116. Ransohoff RM, Kivisäkk P, Kidd G. Three or more routes for leukocyte migration into the central nervous system. Nat Rev Immunol. 2003;3(7):569-81.
 117. Schwartz M, Shechter R. Protective autoimmunity functions by intracranial immunosurveillance to support the mind: The missing link between health and disease. Mol Psychiatry. 2010;15(4):342-54.
 118. Wolf SA, Steiner B, Akpınarlı A, Kammertoens T, Nassenstein C, Braun A, et al. CD4-positive T lymphocytes provide a neuroimmunological link in the control of adult hippocampal neurogenesis. J Immunol. 2009;182(7):3979-84.
 119. Fridkis-Hareli M, Santambrogio L, Stern J, Fugger L, Brosnan C, JL. S. Novel synthetic amino acid copolymers that inhibit autoantigen-specific T cell responses and suppress experimental autoimmune encephalomyelitis. The Journal of Clinical Investigation. 2002;109(12):1635-43.
 120. Koronyo Y, Salumbides BC, Sheyn J, Pelissier L, Li S, Ljubimov V, et al. Therapeutic effects of glatiramer acetate and grafted CD115⁺ monocytes in a mouse model of Alzheimer's disease. Brain. 2015;138(Pt 8):2399-422.
 121. Prod'homme T, Zamvil SS. The Evolving Mechanisms of Action of Glatiramer Acetate. Cold Spring Harb Perspect Med. 2019;9(2).
 122. Aharoni R, Kayhan B, Eilam R, Sela M, R. A. Glatiramer acetate-specific T cells in the brain express T helper 2/3 cytokines and brain-derived neurotrophic factor *in situ* Proc Natl Acad Sci U S A. 2003;100(24):14157-62 .
 123. Kipnis J, Cohen H, Cardon M, Ziv Y, Schwartz M. T cell deficiency leads to cognitive dysfunction: implications for therapeutic vaccination for schizophrenia and other psychiatric conditions. Proc Natl Acad Sci U S A. 2004;101(21):8180-5.
 124. Aharoni R, Eilam R, Domev H, Labunskay G, Sela M, Arnon R. The immunomodulator glatiramer acetate augments the expression of neurotrophic factors in brains of experimental autoimmune encephalomyelitis mice. PNAS. 2005;102(52):19045-50.
 125. Young MJ, Bresnitz EA, Strom BL. Sample size nomograms for interpreting negative clinical studies. Ann Intern Med. 1983;99(2):248-51.

-
126. Peña-Tapia P, Díaz, AH., Torres, JL. Oclusión endovascular permanente de la arteria cerebral media en ratas Wistar: descripción del abordaje a través de la arteria carótida interna. *Revista de Neurología*. 2004;39(11):1011-6.
 127. Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, Cummins R. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *Stroke*. 1989;20(1):84-91.
 128. Chomczynski P, Mackey K. Short technical reports. Modification of the TRI reagent procedure for isolation of RNA from polysaccharide- and proteoglycan-rich sources. *Biotechniques*. 1995;19(6):942-5.
 129. Schmittgen KJ. LTD. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-. *METHODS*. 2001;402-8.
 130. Paxinos G, Watson C. *The rat brain in stereotaxic coordinates.*: Academic Press; 2004
 131. Seri B, Alvarez-Buylla A. Neural stem cells and the regulation of neurogenesis in the adult hippocampus. *Clin Neurosci Res*. 2002;2(1-2):11-6.
 132. Downes CE, Crack PJ. Neural injury following stroke: are Toll-like receptors the link between the immune system and the CNS? *Br J Pharmacol*. 2010;160(8):1872-88.
 133. Mangin G, Poittevin M, Charriaut-Marlangue C, Giannesini C, Merkoulouva-Rainon T, Kubis N. Glatiramer acetate reduces infarct volume in diabetic mice with cerebral ischemia and prevents long-term memory loss. *Brain Behav Immun*. 2019;80:315-27.
 134. Butovsky O, Ziv Y, Schwartz A, Landa G, Talpalar A, Pluchino S, et al. Microglia activated by IL-4 or IFN- γ differentially induce neurogenesis and oligodendrogenesis from adult stem/progenitor cells. *Neuroscience*. 2006;31(1):149-60.
 135. Mohammadi F, Rahimian R, Fakhraei N, Rezayat SM, Javadi-Paydar M, Dehpour AR, et al. Effect of glatiramer acetate on short-term memory impairment induced by lipopolysaccharide in male mice. *Fundam Clin Pharmacol*. 2016;30(4):347-56.
 136. He F, Zou JT, Zhou QF, Niu DL, Jia WH. Glatiramer acetate reverses cognitive deficits from cranial-irradiated rat by inducing hippocampal neurogenesis. *J Neuroimmunol*. 2014;271(1-2):1-7.
 137. Sheremata W, Y. C. Mechanisms of action of glatiramer acetate in the treatment of multiple sclerosis . In *Multiple Sclerosis: A Mechanistic View*. . Elsevier Inc. 2015:339-63
 138. Aharoni R, Teitelbaum D, Arnon R, Sela M. 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;96(2):634-9.
 139. Comi G, Amato MP, Bertolotto A, Centonze D, De Stefano N, Farina C, et al. The heritage of glatiramer acetate and its use in multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis and Demyelinating Disorders*. 2016;1(1):6.
 140. Tyler AF, Mendoza JP, Firan M, Karandikar NJ. CD8(+) T Cells Are Required For Glatiramer Acetate Therapy in Autoimmune Demyelinating Disease. *PLoS One*. 2013;8(6):e66772.
 141. Arnon R, Aharoni R. Neurogenesis and neuroprotection in the CNS--fundamental elements in the effect of Glatiramer acetate on treatment of autoimmune neurological disorders. *Mol Neurobiol*. 2007;36(3):245-53.
 142. Faigle R, Song H. Signaling mechanisms regulating adult neural stem cells and neurogenesis. *Biochim Biophys Acta*. 2013;1830(2):2435-48.

-
143. Lehtinen MK, Bjornsson CS, Dymecki SM, Gilbertson RJ, Holtzman DM, Monuki ES. The choroid plexus and cerebrospinal fluid: emerging roles in development, disease, and therapy. *J Neurosci*. 2013;33(45):17553-9.
 144. Sanberg PR, Eve DJ, Metcalf C, Borlongan CV. Advantages and challenges of alternative sources of adult-derived stem cells for brain repair in stroke. *Prog Brain Res*. 2012;201:99-117.
 145. Borlongan CV, Skinner SJ, Geaney M, Vasconcellos AV, Elliott RB, Emerich DF. Intracerebral transplantation of porcine choroid plexus provides structural and functional neuroprotection in a rodent model of stroke. *Stroke*. 2004;35(9):2206-10.
 146. Sathyanesan M, Girgenti MJ, Banasr M, Stone K, Bruce C, Guilchicek E, et al. A molecular characterization of the choroid plexus and stress-induced gene regulation. *Transl Psychiatry*. 2012;2:e139.
 147. Schäbitz WR, Steigleder T, Cooper-Kuhn CM, Schwab S, Sommer C, Schneider A, et al. Intravenous brain-derived neurotrophic factor enhances poststroke sensorimotor recovery and stimulates neurogenesis. *Stroke*. 2007;38(7):2165-72.
 148. Delgado AC, Ferrón SR, Vicente D, Porlan E, Perez-Villalba A, Trujillo CM, et al. Endothelial NT-3 delivered by vasculature and CSF promotes quiescence of subependymal neural stem cells through nitric oxide induction. *Neuron*. 2014;83(3):572-85.
 149. Yan YP, Sailor KA, Vemuganti R, Dempsey RJ. Insulin-like growth factor-1 is an endogenous mediator of focal ischemia-induced neural progenitor proliferation. *Eur J Neurosci*. 2006;24(1):45-54.
 150. Azoulay D, Vachapova V, Shihman B, Miler A, Karni A. Lower brain-derived neurotrophic factor in serum of relapsing remitting MS: reversal by glatiramer acetate. *J Neuroimmunol*. 2005;167(1-2):215-8.
 151. Skihar V, Silva C, Chojnacki A, Döring A, Stallcup WB, Weiss S, et al. Promoting oligodendrogenesis and myelin repair using the multiple sclerosis medication glatiramer acetate. *PNAS*. 2009;106(42).
 152. Shimazu K, Zhao M, Sakata K, Akbarian S, Bates B, Jaenisch R, et al. NT-3 facilitates hippocampal plasticity and learning and memory by regulating neurogenesis. *Learn Mem*. 2006;13(3):307-15.
 153. Allen SJ, Dawbarn D. Clinical relevance of the neurotrophins and their receptors. *Clin Sci (Lond)*. 2006;110(2):175-91.
 154. Yuan H, Chen R, Wu L, Chen Q, Hu A, Zhang T, et al. The regulatory mechanism of neurogenesis by IGF-1 in adult mice. *Mol Neurobiol*. 2015;51(2):512-22.
 155. Hurtado-Chong A, Yusta-Boyo MJ, Vergaño-Vera E, Bulfone A, de Pablo F, Vicario-Abejón C. IGF-I promotes neuronal migration and positioning in the olfactory bulb and the exit of neuroblasts from the subventricular zone. *Eur J Neurosci*. 2009;30(5):742-55.
 156. Snapyan M, Lemasson M, Brill M, Blais M, Massouh M, Ninkovic J, et al. Vasculature guides migrating neuronal precursors in the adult mammalian forebrain via brain-derived neurotrophic factor signaling. *J Neurosci*. 2009;29:4172-88.
 157. Tobin MK, Bonds JA, Minshall RD, Pelligrino DA, Testai FD, Lazarov O. Neurogenesis and inflammation after ischemic stroke: what is known and where we go from here. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2014;34(10):1573-84.

-
158. Chen J, Shehadah A, Pal A, Zacharek A, Cui X, Cui Y, et al. Neuroprotective effect of Human Placenta-Derived Cell Treatment of Stroke in Rats. *Cell Transplantation*. 2013;22(5):871-9.
159. Gentile A, Rossi S, Studer V, Motta C, De Chiara V, Musella A, et al. Glatiramer acetate protects against inflammatory synaptopathy in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmune Pharmacol*. 2013;8(3):651-63.
160. Aharoni R, Teitelbaum D, Sela M, Arnon 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 U S A*. 1997;94(20):10821-6.
161. Carpintero R, Brandt KJ, Gruaz L, Molnarfi N, Lalive PH, Burger D. Glatiramer acetate triggers PI3K δ /Akt and MEK/ERK pathways to induce IL-1 receptor antagonist in human monocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(41):17692-7.
162. Corey-Bloom J, Aikin AM, Gutierrez AM, Nadhem JS, Howell TL, Thomas EA. Beneficial effects of glatiramer acetate in Huntington's disease mouse models: Evidence for BDNF-elevating and immunomodulatory mechanisms. *Brain Res*. 2017;1673:102-10.
163. Kiyota T, Okuyama S, Swan RJ, Jacobsen MT, Gendelman HE, Ikezu T. CNS expression of anti-inflammatory cytokine interleukin-4 attenuates Alzheimer's disease-like pathogenesis in APP+PS1 bigenic mice. *FASEB J*. 2010;24(8):3093-102.
164. Murphy KM, Reiner SL. The lineage decisions of helper T cells. *Nat Rev Immunol*. 2002;2(12):933-44.
165. Li-Weber M, Krammer PH. Regulation of IL4 gene expression by T cells and therapeutic perspectives. *Nat Rev Immunol*. 2003;3(7):534-43.
166. Murray PJ. Understanding and exploiting the endogenous interleukin-10/STAT3-mediated anti-inflammatory response. *Curr Opin Pharmacol*. 2006;6(4):379-86.
167. Doll DN, Barr TL, Simpkins JW. Cytokines: their role in stroke and potential use as biomarkers and therapeutic targets. *Aging Dis*. 2014;5(5):294-306.
168. Fouda AY, Pillai B, Dhandapani KM, Ergul A, Fagan SC. Role of interleukin-10 in the neuroprotective effect of the Angiotensin Type 2 Receptor agonist, compound 21, after ischemia/reperfusion injury. *Eur J Pharmacol*. 2017;799:128-34.
169. Tukhovskaya EA, Turovsky EA, Turovskaya MV, Levin SG, Murashev AN, Zinchenko VP, et al. Anti-inflammatory cytokine interleukin-10 increases resistance to brain ischemia through modulation of ischemia-induced intracellular Ca²⁺ response. *Neurosci Lett*. 2014;571:55-60.
170. Liesz A, Ruger H, Purrucker J, Zorn M, Dalpke A, Mohlenbruch M, et al. Stress mediators and immune dysfunction in patients with acute cerebrovascular diseases. *PLoS One*. 2013;8(9):e74839.
171. Magalhoes CA, Carvalho MDG, Sousa LP, Caramelli P, Gomes KB. Alzheimer's disease and cytokine IL-10 gene polymorphisms: is there an association? *Arq Neuropsiquiatr*. 2017;75(9):649-56.
172. Pereira L, Font-Nieves M, Van den Haute C, Baekelandt V, Planas AM, Pozas E. IL-10 regulates adult neurogenesis by modulating ERK and STAT3 activity. *Front Cell Neurosci*. 2015;9:57.

-
173. Wang J, Xie L, Yang C, Ren C, Zhou K, Wang B, et al. Activated regulatory T cell regulates neural stem cell proliferation in the subventricular zone of normal and ischemic mouse brain through interleukin 10. *Front Cell Neurosci.* 2015;9.
174. Gelderblom M, Weymar A, Bernreuther C, Velden J, Arunachalam P, Steinbach K, et al. Neutralization of the IL-17 axis diminishes neutrophil invasion and protects from ischemic stroke. *Blood.* 2012;120(18):3793-802.
175. Aharoni R, Eilam R, Stock A, Vainshtein A, Shezen E, Gal H, et al. Glatiramer acetate reduces Th-17 inflammation and induces regulatory T-cells in the CNS of mice with relapsing-remitting or chronic EAE. *J Neuroimmunol.* 2010;225(1-2):100-11.
176. Aharoni R. Immunomodulation neuroprotection and remyelination - the fundamental therapeutic effects of glatiramer acetate: a critical review. *J Autoimmun.* 2014;54:81-92.
177. Yu Y, Ma X, Gong R, Zhu J, Wei L, Yao J. Recent advances in CD8. *Oncol Lett.* 2018;15(6):8187-94.



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE DISERTACIÓN PÚBLICA

Nº 00094

Matrícula: 2133801628

Correlación entre los cambios microambientales y celulares en los plexos coroideos con la neurogénesis inducida por Cop-1 en un modelo de isquemia cerebral focal con perfusión.

En la Ciudad de México, se presentaron a las 9:30 horas del día 12 del mes de diciembre del año 2019 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

DRA. HERLINDA BONILLA JAIME
DR. FAUSTO SANCHEZ MUÑOZ
DRA. JOSE JUAN ANTONIO IBARRA ARIAS
DRA. ROXANA HAYDEE RODRIGUEZ BARRERA
DR. JULIO CESAR ROJAS CASTAÑEDA

Bajo la Presidencia de la primera y con carácter de Secretario el último, se reunieron a la presentación de la Disertación Pública cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

DOCTORA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DE: MARIA YOLANDA CRUZ MARTINEZ

y de acuerdo con el artículo 78 fracción IV del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

Aprobar

Acto continuo, la presidenta del jurado comunicó a la interesada el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.



MARIA YOLANDA CRUZ MARTINEZ
ALUMNA

REVISÓ

MTRA. ROSALBA SERRANO DE LA PAZ
DIRECTORA DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTORA DE LA DIVISIÓN DE CBS

DRA. SARA LUCIA CAMARGO RICALDE

PRESIDENTA

DRA. HERLINDA BONILLA JAIME

VOCAL

DR. FAUSTO SANCHEZ MUÑOZ

VOCAL

DRA. JOSE JUAN ANTONIO IBARRA ARIAS

VOCAL

DRA. ROXANA HAYDEE RODRIGUEZ BARRERA

SECRETARIO

DR. JULIO CESAR ROJAS CASTAÑEDA